(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2005-514916
(P2005-514916A)
(43)公表日　平成17年5月26日(2005.5.26)

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N 15/00	ZNAA	2G045
C07K 14/52	C07K 14/52		4B024
C07K 16/24	C07K 16/24		4B064
C12N 1/15	C12N 1/15		4B065
C12N 1/19	C12N 1/19		4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 91 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2003-532644 (P2003-532644)
(86)(22)出願日　平成14年10月2日 (2002.10.2)
(85)翻訳文提出日　平成16年6月2日 (2004.6.2)
(86)国際出願番号　PCT/US2002/031471
(87)国際公開番号　WO2003/029426
(87)国際公開日　平成15年4月10日 (2003.4.10)
(31)優先権主張番号　60/327,122
(32)優先日　平成13年10月3日 (2001.10.3)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　591123609
イミュネックス・コーポレーション
ＩＭＭＵＮＥＸ　ＣＯＲＰＯＲＡＴＩＯＮ
アメリカ合衆国カリフォルニア州９１３２
０－１７９９，サウザンド・オークス，ワン・アムゲン・センター・ドライブ
(74)代理人　100089705
弁理士　社本　一夫
(74)代理人　100076691
弁理士　増井　忠弐
(74)代理人　100075270
弁理士　小林　泰
(74)代理人　100080137
弁理士　千葉　昭男

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒトおよびネズミサイトカインポリペプチド

(57)【要約】
本発明は、ＩＭＸ７１８９サイトカインおよびヒトサイトカインポリペプチドファミリーの新規メンバー、こうしたポリペプチドを作成する方法、並びに多能性幹細胞前駆体からの細胞の増殖および／または分化に関与する状態および疾患を治療するのに該ポリペプチドを用いる方法、並びにサイトカインポリペプチド活性を改変する化合物を同定する方法に関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ａ）アミノ酸Ａ～Ｂの間で始まり、そしてアミノ酸Ｙ～Ｚの間で終わるアミノ酸配列であって、Ａ、Ｂ、Ｙ、およびＺの値の組が：配列番号２または配列番号５のＡ＝３５、Ｂ＝４０、Ｙ＝５２、およびＺ＝５３；配列番号２または配列番号５のＡ＝７２、Ｂ＝７４、Ｙ＝９５、およびＺ＝９８；配列番号２または配列番号５のＡ＝９８、Ｂ＝１０１、Ｙ＝１２２、およびＺ＝１２３；並びに配列番号２または配列番号５のＡ＝１２３、Ｂ＝１２４、Ｙ＝１３６、およびＺ＝１３９からなる群より選択される、前記アミノ酸配列；
（ｂ）少なくとも２０の隣接アミノ酸を含んでなる、（ａ）のいずれかのアミノ酸配列の断片；
（ｃ）少なくとも３０の隣接アミノ酸を含んでなる、（ａ）のいずれかのアミノ酸配列の断片；
（ｄ）サイトカインポリペプチド活性を有する、（ａ）のいずれかのアミノ酸配列の断片；
（ｅ）ヘリックスＡ、ヘリックスＢ、ヘリックスＣ、および／またはヘリックスＤのアミノ酸配列を含んでなる、（ａ）のいずれかのアミノ酸配列の断片；
（ｆ）少なくとも２０のアミノ酸を含んでなり、そして（ａ）～（ｅ）のいずれかのアミノ酸配列とアミノ酸同一性を共有するアミノ酸配列であって、アミノ酸同一性パーセントが：少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７．５％、少なくとも９９％、および少なくとも９９．５％からなる群より選択される、前記アミノ酸配列；
（ｇ）（ｆ）のアミノ酸配列であって、（ｈ）の前記アミノ酸配列を含んでなるポリペプチドが（ａ）～（ｅ）のいずれかのアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドにもまた結合する抗体に結合する、前記アミノ酸配列；並びに
（ｈ）サイトカインポリペプチド活性を有する、（ｆ）または（ｇ）のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列から本質的になる単離ポリペプチドであって；
ＷＯ　００／７００４７（ＧｅｎｅＳｅｑ　ＡＡＢ３６６２７）、ＷＯ　０１／５３３１２（ＧｅｎｅＳｅｑ　ＡＡＭ４０２５０）、ＴｒＥＭＢＬデータベース寄託番号Ｑ９ＢＳＴ１およびＱ９ＮＷＫＯ、ＧｅｎＢａｎｋ寄託番号ＸＰ＿０４０８５２．１およびＢＡＡ９１３８０．１、ＴｒＥＭＢＬデータベース寄託番号Ｑ９Ｐ０Ｒ６、ＧｅｎＢａｎｋ寄託番号ＮＰ＿０５７５５６、ＷＯ　００／５５１７１（ＧｅｎｅＳｅｑ　ＡＡＢ２８００００）、並びにＷＯ　００／６１６２０（ＧｅｎｅＳｅｑ　ＡＡＢ５１６８４）に開示されるポリペプチドいずれのアミノ酸配列も含まない、前記単離ポリペプチド。
【請求項２】
（ａ）配列番号４のアミノ酸配列；
（ｂ）アミノ酸Ａ～Ｂの間で始まり、そしてアミノ酸Ｙ～Ｚの間で終わるアミノ酸配列であって、Ａ、Ｂ、Ｙ、およびＺの値の組が：配列番号４のＡ＝４０、Ｂ＝４５、Ｙ＝５７、およびＺ＝５８；配列番号４のＡ＝７７、Ｂ＝７９、Ｙ＝１００、およびＺ＝１０３；配列番号４のＡ＝１０３、Ｂ＝１０６、Ｙ＝１２７、およびＺ＝１２８；並びに配列番号４のＡ＝１２８、Ｂ＝１２９、Ｙ＝１４１、およびＺ＝１４４からなる群より選択される、前記アミノ酸配列；
（ｃ）少なくとも２０の隣接アミノ酸を含んでなる、（ａ）～（ｂ）のいずれかのアミノ酸配列の断片；
（ｄ）少なくとも３０の隣接アミノ酸を含んでなる、（ａ）～（ｂ）のいずれかのアミノ酸配列の断片；
（ｅ）サイトカインポリペプチド活性を有する、（ａ）～（ｂ）のいずれかのアミノ酸配列の断片；
（ｆ）ヘリックスＡおよび／またはヘリックスＤのアミノ酸配列を含んでなる、（ａ）～（ｂ）のいずれかのアミノ酸配列の断片；
（ｇ）少なくとも２０のアミノ酸を含んでなり、そして（ａ）～（ｆ）のいずれかのア

ミノ酸配列とアミノ酸同一性を共有するアミノ酸配列であって、アミノ酸同一性パーセントが：少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７．５％、少なくとも９９％、および少なくとも９９．５％からなる群より選択される、前記アミノ酸配列；

（ｈ）（ｇ）のアミノ酸配列であって、（ｇ）の前記アミノ酸配列を含んでなるポリペプチドが（ａ）～（ｆ）のいずれかのアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドにもまた結合する抗体に結合する、前記アミノ酸配列；並びに

（ｉ）サイトカインポリペプチド活性を有する、（ｇ）または（ｈ）のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなる単離ポリペプチドであって；

ＷＯ ００／７００４７（ＧｅｎｅＳｅｑ ＡＡＢ３６６２７）、ＷＯ ０１／５３３１２（ＧｅｎｅＳｅｑ ＡＡＭ４０２５０）、ＴｒＥＭＢＬデータベース寄託番号Ｑ９ＢＳＴ１およびＱ９ＮＷＫＯ、ＧｅｎＢａｎｋ寄託番号ＸＰ＿０４０８５２．１およびＢＡＡ９１３８０．１、ＴｒＥＭＢＬデータベース寄託番号Ｑ９Ｐ０Ｒ６、ＧｅｎＢａｎｋ寄託番号ＮＰ＿０５７５５６、ＷＯ ００／５５１７１（ＧｅｎｅＳｅｑ ＡＡＢ２８００００）、並びにＷＯ ００／６１６２０（ＧｅｎｅＳｅｑ ＡＡＢ５１６８４）に開示されるポリペプチドいずれのアミノ酸配列も含まない、前記単離ポリペプチド。

【請求項３】

（ａ）配列番号６、配列番号７、配列番号８、および配列番号９からなる群より選択されるアミノ酸配列；

（ｂ）アミノ酸Ａ～Ｂの間で始まり、そしてアミノ酸Ｙ～Ｚの間で終わるアミノ酸配列であって、Ａ、Ｂ、Ｙ、およびＺの値の組が：配列番号６のＡ＝７３、Ｂ＝９４、Ｙ＝１０８、およびＺ＝１１８；配列番号６のＡ＝１５３、Ｂ＝１５３、Ｙ＝１６１、およびＺ＝１７３；配列番号６のＡ＝１９０、Ｂ＝１９１、Ｙ＝２１２、およびＺ＝２１２；配列番号６のＡ＝２１３、Ｂ＝２１８、Ｙ＝２５３、およびＺ＝２５４；配列番号７のＡ＝４４、Ｂ＝４７、Ｙ＝８２、およびＺ＝８３；配列番号７のＡ＝１１４、Ｂ＝１２０、Ｙ＝１３２、およびＺ＝１５２；配列番号７のＡ＝１４０、Ｂ＝１６５、Ｙ＝１７６、およびＺ＝１７８；配列番号７のＡ＝１９５、Ｂ＝１９８、Ｙ＝２４０、およびＺ＝２４３；配列番号８のＡ＝５８７、Ｂ＝５８８、Ｙ＝６１３、およびＺ＝６１５；配列番号８のＡ＝６３９、Ｂ＝６４３、Ｙ＝６６４、およびＺ＝６６９；配列番号８のＡ＝６７３、Ｂ＝６７４、Ｙ＝７００、およびＺ＝７０２；配列番号８のＡ＝７１５、Ｂ＝７１５、Ｙ＝７２４、およびＺ＝７３０；配列番号９のＡ＝２７、Ｂ＝２９、Ｙ＝３９、およびＺ＝４１；配列番号９のＡ＝６６、Ｂ＝６８、Ｙ＝８０、およびＺ＝１０１；配列番号９のＡ＝１１１、Ｂ＝１１１、Ｙ＝１３３、およびＺ＝１４３；並びに配列番号９のＡ＝１４７、Ｂ＝１４８、Ｙ＝１７７、およびＺ＝１８７からなる群より選択される、前記アミノ酸配列；

（ｃ）少なくとも２０の隣接アミノ酸を含んでなる、（ａ）～（ｂ）のいずれかのアミノ酸配列の断片；

（ｄ）少なくとも３０の隣接アミノ酸を含んでなる、（ａ）～（ｂ）のいずれかのアミノ酸配列の断片；

（ｅ）サイトカインポリペプチド活性を有する、（ａ）～（ｂ）のいずれかのアミノ酸配列の断片；

（ｆ）ヘリックスＡおよび／またはヘリックスＤのアミノ酸配列を含んでなる、（ａ）～（ｂ）のいずれかのアミノ酸配列の断片；

（ｇ）少なくとも２０のアミノ酸を含んでなり、そして（ａ）～（ｆ）のいずれかのアミノ酸配列とアミノ酸同一性を共有するアミノ酸配列であって、アミノ酸同一性パーセントが：少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７．５％、少なくとも９９％、および少なくとも９９．５％からなる群より選択される、前記アミノ酸配列；

（ｈ）（ｇ）のアミノ酸配列であって、（ｇ）の前記アミノ酸配列を含んでなるポリペプチドが（ａ）～（ｆ）のいずれかのアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドにもまた結合する抗体に結合する、前記アミノ酸配列；および

（ｉ）サイトカインポリペプチド活性を有する、（ｇ）または（ｈ）のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなる単離ポリペプチド。

【請求項４】

サイトカインポリペプチド活性を有する、請求項１～３のいずれかのポリペプチド。

【請求項５】

請求項１～４のいずれかのポリペプチドをコードする単離核酸。

【請求項６】

（ａ）配列番号１のヌクレオチド２０３～６１９；

（ｂ）配列番号３のヌクレオチド１８７～６１８；および

（ｃ）（ａ）～（ｂ）のアレル変異体

からなる群より選択されるヌクレオチド配列から本質的になる、請求項５の核酸。

【請求項７】

配列番号１および配列番号３からなる群より選択されるヌクレオチド配列から本質的になる、請求項５の核酸。

【請求項８】

請求項５～７のいずれかの核酸に対応する、単離ゲノム核酸。

【請求項９】

請求項５～８のいずれかの核酸のヌクレオチド配列とヌクレオチド配列同一性を共有するヌクレオチド配列を含んでなる単離核酸であって、ヌクレオチド配列同一性パーセントが：少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７．５％、少なくとも９９％、および少なくとも９９．５％からなる群より選択され、サイトカインポリペプチド活性を有するポリペプチドをコードする、前記単離核酸。

【請求項１０】

請求項５～９のいずれかの核酸に中程度のストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズする、少なくとも１５ヌクレオチドの長さを有する単離核酸であって、サイトカインポリペプチド活性を有する、前記単離核酸。

【請求項１１】

請求項５～１０のいずれかに記載の核酸を少なくとも１つ含んでなる、発現ベクター。

【請求項１２】

請求項５～１０のいずれかに記載の核酸を少なくとも１つ含んでなる、組換え宿主細胞。

【請求項１３】

核酸が宿主細胞ゲノムに組み込まれている、請求項１２の組換え宿主細胞。

【請求項１４】

請求項５～１０のいずれかの核酸にコードされるポリペプチドを産生する方法であって、前記ポリペプチドの発現を促進する条件下で、組換え宿主細胞を培養することを含んでなり、該組換え宿主細胞が、請求項５～１０のいずれかに記載の核酸を少なくとも１つ含んでなる、前記方法。

【請求項１５】

前記ポリペプチドを精製することをさらに含んでなる、請求項１４の方法。

【請求項１６】

請求項１４の方法によって産生されるポリペプチド。

【請求項１７】

請求項１～４または請求項１６のいずれかのポリペプチドに結合する、単離抗体。

【請求項１８】

モノクローナル抗体である、請求項１７の抗体。

【請求項１９】

ヒト抗体である、請求項１７の抗体。

【請求項２０】

ヒト化抗体である、請求項１７の抗体。
【請求項２１】
請求項１～４または請求項１６のいずれかのポリペプチドの活性を阻害する、単離抗体。
【請求項２２】
請求項１～４または請求項１６のいずれかのポリペプチドの阻害剤を設計する方法であって、こうしたポリペプチドの三次元構造を決定し、基質のありうる結合部位の三次元構造を解析し、予測される反応部位を取り込んだ分子を合成し、そして分子のポリペプチド阻害活性を決定する工程を含んでなる、前記方法。
【請求項２３】
サイトカインポリペプチド活性を改変する化合物を同定する方法であって
（ａ）請求項１～４または請求項１６のいずれかのポリペプチドと試験化合物を混合し；そして
（ｂ）試験化合物が、前記ポリペプチドのサイトカインポリペプチド活性を改変するかどうかを決定する
ことを含んでなる、前記方法。
【請求項２４】
本発明のサイトカインポリペプチドの結合活性を阻害する化合物を同定する方法であって
（ａ）請求項１～４または請求項１６のいずれかのポリペプチドおよび前記ポリペプチドの結合パートナーと試験化合物を混合し；そして
（ｂ）試験化合物が、前記ポリペプチドの結合活性を阻害するかどうかを決定する
ことを含んでなる、前記方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、３５Ｕ．Ｓ．Ｃ．１１９（ｅ）に基づいて、米国仮出願第６０／３２７，１２２号、２００１年１０月３日提出の優先権を主張し、前記出願の開示は、完全に本明細書に援用される。
【０００２】
発明の分野
本発明は、ヒトおよびネズミＩＭＸ７１８９ポリペプチドなどのＩＭＸ７１８９サイトカインポリペプチド；「４アルファヘリックス束」（４ＡＨＢ）サイトカインに構造的類似性を有する新規ヒトポリペプチド；並びにこれらのＩＭＸ７１８９サイトカインポリペプチドおよび本発明の新規ヒトサイトカインを作成し、そして用いる方法に関する。
【背景技術】
【０００３】
発明の背景
サイトカインポリペプチドは、４つのアルファヘリックスの「束になった」配置に特徴付けられる三次元構造を有する、分泌ポリペプチドの関連する群である。この「４アルファヘリックス束」（４ＡＨＢ）ポリペプチドファミリーのメンバーにはまた、造血増殖因子、インターフェロン、およびホルモンも含まれる。４ＡＨＢサイトカインポリペプチドはすべて、多能性幹細胞前駆体から、造血細胞または免疫細胞などの細胞が増殖するかまたは発生するのを制御するのに関与し、サイトカインの異なる組み合わせが、Ｔ細胞、Ｂ細胞、赤血球、巨核球、マスト細胞、好酸球、好中球、単球、マクロファージ、樹状細胞、および破骨細胞などの異なる細胞種の形成に影響を及ぼす。しかし、これらのサイトカインのいくつかのサブグループはまた、造血細胞系または免疫細胞系外の細胞の生物学的活性にも影響を及ぼし、これらの受容体は異なる組織に広く発現されている（ＮｉｃｏｌａおよびＨｉｌｔｏｎ，１９９９，Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ５２：１－６５）。

【０００４】
ポリペプチドのサイトカインファミリーに共通の構造的特徴には、細胞膜を経由する、サイトカイン前駆体ポリペプチドの移動を指示して、分泌サイトカインを産生するか、または細胞膜外表面への移動を指示して、サイトカインの膜結合型を産生する、シグナル配列が含まれ、サイトカインの膜結合型は、その後、タンパク質分解的に切断されて、そして細胞から遊離する。４ＡＨＢサイトカインファミリーの大部分のメンバーは、単量体分子として活性であるが、いくつかは機能するホモ二量体を形成するか、または可溶性型のサイトカイン受容体と相互作用して、ヘテロ二量体分子を形成する（ＮｉｃｏｌａおよびＨｉｌｔｏｎ，１９９９，Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ５２：１－６５）。４ＡＨＢサイトカインの４つのアルファヘリックス、ヘリックスＡ～Ｄは、「上上下下（ｕｐ ｕｐ ｄｏｗｎ ｄｏｗｎ）」立体配置で配置されている（Ｋａｌｌｅｎら，１９９９，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７４：１１８５９－１１８６７）。インターロイキン－６（ＩＬ－６）サイトカインのＡヘリックスおよびＤヘリックスは、ＩＬ－６受容体アルファ鎖との疎水性結合相互作用を形成するのに重要な疎水性残基を含むことが見出されており、この疎水性残基の間に荷電残基が組み込まれていて、この荷電残基が受容体鎖上の荷電残基と塩架橋クラスターを形成して、水分子から近くの疎水性残基を遮蔽し、そしてサイトカイン－受容体相互作用を安定化すると考えられる（Ｇｒｏｅｔｚｉｎｇｅｒら，１９９７，ＰＲＯＴＥＩＮＳ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ，Ｆｕｎｃｔｉｏｎ，ａｎｄ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ２７：９６－１０９）。４ＡＨＢサイトカインファミリーの造血細胞増殖因子であるトロンボポエチン（ＴＰＯ）のＡヘリックスおよびＤヘリックス中の機能残基を同定する突然変異研究の結果（Ｊａｇｅｒｓｃｈｍｉｄｔら，１９９８，Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｊ ３３３：７２９－７３４）は、このサイトカイン－受容体相互作用モデルと一致する。

【０００５】
構造的に、４ＡＨＢサイトカインファミリーは、２つの群：より短いコア・アルファヘリックスおよびヘリックス間ループ中の二本鎖ベータシート構造を含む「短鎖」サイトカイン、並びに、より長いコア・アルファヘリックスおよび多くの場合、ループ領域中のより短いアルファヘリックスを含む「長鎖」サイトカインに分類可能である。４ＡＨＢサイトカインファミリーはまた、相互作用する受容体複合体（類）の種類（単数または複数）に基づいて、さらに分類可能である。例えば、４ＡＨＢサイトカインは、細胞内シグナル伝達分子のＪＡＫおよびＳＴＡＴファミリーの多様なメンバーを通じて、制御シグナルを伝播する、Ｉ型またはＩＩ型サイトカイン受容体に結合可能であるし、または固有のチロシンキナーゼ活性を持つ受容体に結合可能である（ＮｉｃｏｌａおよびＨｉｌｔｏｎ，１９９９，Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ５２：１－６５）；さらに、４ＡＨＢサイトカイン受容体の中には、多様な機能するコンホメーションが観察され、例えば、一本鎖受容体、ホモ二量体、アルファ「サイトカイン結合」鎖および他のサイトカインの受容体複合体にも存在（「共有」）可能なベータ「シグナル伝達」鎖のヘテロ二量体、および３以上の受容体鎖を含む受容体複合体などがある（Ｃｏｓｍａｎ，１９９３，Ｃｙｔｏｋｉｎｅ ５：９５－１０６）。

【０００６】
造血細胞および免疫細胞の分化において役割を果たすため、４ＡＨＢサイトカインポリペプチドは、広い範囲の生物学的過程、並びに関連する疾患状態および状態に関与する。例えば、４ＡＨＢサイトカイン、エリスロポエチン（ＥＰＯ）とその受容体（ＪＡＫ２およびＳＴＡＴ５を含む経路を活性化する細胞内シグナル伝達ドメインを含むホモ二量体）の相互作用は、成人において、赤血球前駆細胞の増殖および分化を刺激し、ＥＰＯを貧血治療に有用にする。４ＡＨＢサイトカイン、トロンボポエチン（ＴＰＯ）および顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）もまた、造血刺激活性を有する。４ＡＨＢサイトカインの他の生物学的影響には、神経細胞および角化細胞発生の制御、全身代謝の制御（例えば成長ホルモン（ＧＨ）、プロラクチン（ＰＲＬ）、およびレプチン／ＯＢに示される効果）；感染または傷害に対する炎症誘発反応の刺激、および先天性免疫の刺激（例えば顆粒球

－マクロファージ・コロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、ＩＬ－３、ＩＬ－５、ＩＬ－６、オンコスタチンＭ（ＯＳＭ）、および白血病阻害因子（ＬＩＦ））；抗ウイルス活性（インターフェロンアルファ、ベータ、およびガンマなどのインターフェロン類）；並びに獲得免疫の刺激およびＴｈ１細胞運命（ＩＬ－１２）またはＴｈ２細胞運命（例えばＩＬ－２、ＩＬ－４、およびＩＬ－１５）に向かうヘルパーＴ細胞の分化の駆動が含まれる（ＮｉｃｏｌａおよびＨｉｌｔｏｎ，１９９９，Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ５２：１－６５）。

【０００７】

多能性幹細胞前駆体からの細胞の増殖または発生に関与する状態および疾患のより有効な治療を発展させるため、４ＡＨＢサイトカインポリペプチドファミリーの以前は同定されていなかったメンバーに関する情報が必要である。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００８】

発明の概要

本発明は、ヒトＩＭＸ７１８９ポリペプチドが４ＡＨＢサイトカインであるという発見に基づき、そしてネズミＩＭＸ７１８９サイトカインおよび４ＡＨＢサイトカインに類似の構造を有するさらなる新規ヒトポリペプチドの発見に基づく。

【０００９】

本発明は：

（ａ）配列番号２のアミノ酸配列；

（ｂ）配列番号５のアミノ酸配列；

（ｃ）アミノ酸Ａ～Ｂの間で始まり、そしてアミノ酸Ｙ～Ｚの間で終わるアミノ酸配列であって、Ａ、Ｂ、Ｙ、およびＺの値の組が：配列番号２または配列番号５のＡ＝３５、Ｂ＝４０、Ｙ＝５２、およびＺ＝５３；配列番号２または配列番号５のＡ＝７２、Ｂ＝７４、Ｙ＝９５、およびＺ＝９８；配列番号２または配列番号５のＡ＝９８、Ｂ＝１０１、Ｙ＝１２２、およびＺ＝１２３；並びに配列番号２または配列番号５のＡ＝１２３、Ｂ＝１２４、Ｙ＝１３６、およびＺ＝１３９からなる群より選択される、前記アミノ酸配列；

（ｄ）少なくとも２０の隣接アミノ酸を含んでなる、（ａ）～（ｃ）のいずれかのアミノ酸配列の断片；

（ｅ）少なくとも３０の隣接アミノ酸を含んでなる、（ａ）～（ｃ）のいずれかのアミノ酸配列の断片；

（ｆ）サイトカインポリペプチド活性を有する、（ａ）～（ｃ）のいずれかのアミノ酸配列の断片；

（ｇ）ヘリックスＡおよび／またはヘリックスＤのアミノ酸配列を含んでなる、（ａ）～（ｃ）のいずれかのアミノ酸配列の断片；

（ｈ）少なくとも２０のアミノ酸を含んでなり、そして（ａ）～（ｇ）のいずれかのアミノ酸配列とアミノ酸同一性を共有するアミノ酸配列であって、アミノ酸同一性パーセントが：少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７．５％、少なくとも９９％、および少なくとも９９．５％からなる群より選択される、前記アミノ酸配列；

（ｉ）（ｈ）のアミノ酸配列であって、（ｈ）の前記アミノ酸配列を含んでなるポリペプチドが（ａ）～（ｇ）のいずれかのアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドにもまた結合する抗体に結合する、前記アミノ酸配列；および

（ｊ）サイトカインポリペプチド活性を有する、（ｈ）または（ｉ）のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列からなる、該アミノ酸配列から本質的になる、またはより好ましくは、該アミノ酸配列を含んでなる、単離ポリペプチドであって；

ＷＯ ００／７００４７（ＧｅｎｅＳｅｑ ＡＡＢ３６６２７）、ＷＯ ０１／５３３１２（ＧｅｎｅＳｅｑ ＡＡＭ４０２５０）、ＴｒＥＭＢＬデータベース寄託番号Ｑ９ＢＳＴ１およびＱ９ＮＷＫＯ、ＧｅｎＢａｎｋ寄託番号ＡＡＨ０４８１８、ＸＰ＿０４０８

５２．１およびＢＡＡ９１３８０．１、ＴｒＥＭＢＬデータベース寄託番号Ｑ９Ｐ０Ｒ６、ＧｅｎＢａｎｋ寄託番号ＮＰ＿０５７５５６、ＷＯ　００／５５１７１（ＧｅｎｅＳｅｑ　ＡＡＢ２８０００）、またはＷＯ　００／６１６２０（ＧｅｎｅＳｅｑ　ＡＡＢ５１６８４）に開示されるポリペプチドいずれのアミノ酸配列からなるのでもない、前記単離ポリペプチドを提供する。

【００１０】

本発明はまた：

（ａ）配列番号４のアミノ酸配列；

（ｂ）アミノ酸Ａ～Ｂの間で始まり、そしてアミノ酸Ｙ～Ｚの間で終わるアミノ酸配列であって、Ａ、Ｂ、Ｙ、およびＺの値の組が：配列番号４のＡ＝４０、Ｂ＝４５、Ｙ＝５７、およびＺ＝５８；配列番号４のＡ＝７７、Ｂ＝７９、Ｙ＝１００、およびＺ＝１０３；配列番号４のＡ＝１０３、Ｂ＝１０６、Ｙ＝１２７、およびＺ＝１２８；並びに配列番号４のＡ＝１２８、Ｂ＝１２９、Ｙ＝１４１、およびＺ＝１４４からなる群より選択される、前記アミノ酸配列；

（ｃ）少なくとも２０の隣接アミノ酸を含んでなる、（ａ）～（ｂ）のいずれかのアミノ酸配列の断片；

（ｄ）少なくとも３０の隣接アミノ酸を含んでなる、（ａ）～（ｂ）のいずれかのアミノ酸配列の断片；

（ｅ）サイトカインポリペプチド活性を有する、（ａ）～（ｂ）のいずれかのアミノ酸配列の断片；

（ｆ）ヘリックスＡおよび／またはヘリックスＤのアミノ酸配列を含んでなる、（ａ）～（ｂ）のいずれかのアミノ酸配列の断片；

（ｇ）少なくとも２０のアミノ酸を含んでなり、そして（ａ）～（ｆ）のいずれかのアミノ酸配列とアミノ酸同一性を共有するアミノ酸配列であって、アミノ酸同一性パーセントが：少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７．５％、少なくとも９９％、および少なくとも９９．５％からなる群より選択される、前記アミノ酸配列；

（ｈ）（ｇ）のアミノ酸配列であって、（ｇ）の前記アミノ酸配列を含んでなるポリペプチドが（ａ）～（ｆ）のいずれかのアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドにもまた結合する抗体に結合する、前記アミノ酸配列；および

（ｉ）サイトカインポリペプチド活性を有する、（ｇ）または（ｈ）のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列からなる、該アミノ酸配列から本質的になる、またはより好ましくは、該アミノ酸配列を含んでなる、単離ポリペプチドも提供する。

【００１１】

本発明はさらに：

（ａ）配列番号６、配列番号７、配列番号８、および配列番号９からなる群より選択されるアミノ酸配列；

（ｂ）アミノ酸Ａ～Ｂの間で始まり、そしてアミノ酸Ｙ～Ｚの間で終わるアミノ酸配列であって、Ａ、Ｂ、Ｙ、およびＺの値の組が：配列番号６のＡ＝７３、Ｂ＝９４、Ｙ＝１０８、およびＺ＝１１８；配列番号６のＡ＝１５３、Ｂ＝１５３、Ｙ＝１６１、およびＺ＝１７３；配列番号６のＡ＝１９０、Ｂ＝１９１、Ｙ＝２１２、およびＺ＝２１２；配列番号６のＡ＝２１３、Ｂ＝２１８、Ｙ＝２５３、およびＺ＝２５４；配列番号７のＡ＝４４、Ｂ＝４７、Ｙ＝８２、およびＺ＝８３；配列番号７のＡ＝１１４、Ｂ＝１２０、Ｙ＝１３２、およびＺ＝１５２；配列番号７のＡ＝１４０、Ｂ＝１６５、Ｙ＝１７６、およびＺ＝１７８；配列番号７のＡ＝１９５、Ｂ＝１９８、Ｙ＝２４０、およびＺ＝２４３；配列番号８のＡ＝５８７、Ｂ＝５８８、Ｙ＝６１３、およびＺ＝６１５；配列番号８のＡ＝６３９、Ｂ＝６４３、Ｙ＝６６４、およびＺ＝６６９；配列番号８のＡ＝６７３、Ｂ＝６７４、Ｙ＝７００、およびＺ＝７０２；配列番号８のＡ＝７１５、Ｂ＝７１５、Ｙ＝７２４、およびＺ＝７３０；配列番号９のＡ＝２７、Ｂ＝２９、Ｙ＝３９、およびＺ＝４１；配列番号９のＡ＝６６、Ｂ＝６８、Ｙ＝８０、およびＺ＝１０１；配列番号９のＡ＝１１

１、Ｂ＝１１１、Ｙ＝１３３、およびＺ＝１４３；並びに配列番号９のＡ＝１４７、Ｂ＝１４８、Ｙ＝１７７、およびＺ＝１８７からなる群より選択される、前記アミノ酸配列；

（ｃ）少なくとも２０の隣接アミノ酸を含んでなる、（ａ）～（ｂ）のいずれかのアミノ酸配列の断片；

（ｄ）少なくとも３０の隣接アミノ酸を含んでなる、（ａ）～（ｂ）のいずれかのアミノ酸配列の断片；

（ｅ）サイトカインポリペプチド活性を有する、（ａ）～（ｂ）のいずれかのアミノ酸配列の断片；

（ｆ）ヘリックスＡおよび／またはヘリックスＤのアミノ酸配列を含んでなる、（ａ）～（ｂ）のいずれかのアミノ酸配列の断片；

（ｇ）少なくとも２０のアミノ酸を含んでなり、そして（ａ）～（ｆ）のいずれかのアミノ酸配列とアミノ酸同一性を共有するアミノ酸配列であって、アミノ酸同一性パーセントが：少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７．５％、少なくとも９９％、および少なくとも９９．５％からなる群より選択される、前記アミノ酸配列；

（ｈ）（ｇ）のアミノ酸配列であって、（ｇ）の前記アミノ酸配列を含んでなるポリペプチドが（ａ）～（ｆ）のいずれかのアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドにもまた結合する抗体に結合する、前記アミノ酸配列；および

（ｉ）サイトカインポリペプチド活性を有する、（ｇ）または（ｈ）のアミノ酸配列

からなる群より選択されるアミノ酸配列からなる、該アミノ酸配列から本質的になる、またはより好ましくは、該アミノ酸配列を含んでなる、単離ポリペプチドを提供する。

【００１２】

本発明の他の側面は、本発明のポリペプチドをコードする単離核酸であって、好ましい態様は：

（ａ）配列番号１のヌクレオチド２０３～６１９；

（ｂ）配列番号３のヌクレオチド１８７～６１８；および

（ｃ）（ａ）～（ｂ）のアレル変異体

からなる群より選択されるヌクレオチド配列からなる、該ヌクレオチド配列から本質的になる、またはより好ましくは、該ヌクレオチド配列を含んでなる、単離核酸である。

【００１３】

本発明のさらなる好ましい態様は、配列番号１および配列番号３からなる群より選択されるヌクレオチド配列からなる、該ヌクレオチド配列から本質的になる、またはより好ましくは、該ヌクレオチド配列を含んでなる、単離核酸である。

【００１４】

本発明はまた、本発明の核酸に対応する、単離ゲノム核酸も提供する。

本発明の他の側面は、本発明のポリペプチドをコードする単離核酸、および本発明のポリペプチドをコードする核酸に中程度のストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズする、好ましくは少なくとも１５ヌクレオチドの長さを有する、単離核酸である。本発明の好ましい態様において、こうした核酸は、サイトカインポリペプチド活性を有するポリペプチドをコードするか、または本発明の核酸のヌクレオチド配列とヌクレオチド配列同一性を共有するヌクレオチド配列を含んでなり、ここで、ヌクレオチド配列同一性パーセントは：少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７．５％、少なくとも９９％、および少なくとも９９．５％からなる群より選択される。

【００１５】

本発明にさらに提供されるのは、本発明の核酸を少なくとも１つ含んでなる、発現ベクターおよび組換え宿主細胞、並びに前記核酸が宿主細胞ゲノムに組み込まれている、好ましい組換え宿主細胞である。

【００１６】

やはり提供するのは、本発明の核酸にコードされるポリペプチドを産生する方法であっ

て、前記ポリペプチドの発現を促進する条件下で、組換え宿主細胞を培養することを含んでなり、該組換え宿主細胞が、本発明の核酸を少なくとも１つ含んでなる、前記方法である。本発明が提供する好ましい方法は、前記ポリペプチドを精製することをさらに含んでなる。本発明の別の側面において、前記方法によって産生されるポリペプチドを提供する。

【００１７】

本発明のさらなる側面は、本発明のポリペプチドに結合する、単離抗体、好ましくはモノクローナル抗体、やはり好ましくはヒト抗体またはヒト化抗体であり、そして好ましくは前記ポリペプチドの活性を阻害する、前記単離抗体である。

【００１８】

本発明はさらに、本発明のポリペプチドの阻害剤を設計する方法であって、こうしたポリペプチドいずれかの三次元構造を決定し、基質のありうる結合部位の三次元構造を解析し、予測される反応部位を取り込んだ分子を合成し、そして分子のポリペプチド阻害活性を決定する工程を含んでなる、前記方法を提供する。

【００１９】

本発明の別の側面において、本発明のポリペプチドのペプチドアゴニストおよびアンタゴニストを同定する方法であって、本発明のポリペプチドに結合するペプチドを少なくとも１つ選択することを含んでなり、ペプチドが、酵母に基づくスクリーニング、合理的設計、タンパク質構造解析、ファージディスプレーライブラリー、大腸菌（Ｅ．　ｃｏｌｉ）ディスプレーライブラリー、リボソームライブラリー、ＲＮＡ－ペプチドライブラリー、および化学的ペプチドライブラリーのスクリーニングから選択される１以上の技術を含んでなる方法で選択される、前記方法を提供する。本発明のさらなる側面において、ペプチドは、複数のランダム化ペプチドから選択される。

【００２０】

本発明のさらなる側面において、本発明のサイトカインポリペプチドの活性を改変する化合物を同定する方法であって

（ａ）本発明のポリペプチドと試験化合物を混合し；そして

（ｂ）試験化合物が、前記ポリペプチドのサイトカインポリペプチド活性を改変するかどうかを決定する

ことを含んでなる、前記方法を提供する。

【００２１】

本発明の別の側面において、本発明のサイトカインポリペプチドの結合活性を阻害する化合物を同定する方法であって

（ａ）本発明のポリペプチドおよび前記ポリペプチドの結合パートナーと試験化合物を混合し；そして

（ｂ）試験化合物が、前記ポリペプチドの結合活性を阻害するかどうかを決定する

ことを含んでなる、前記方法を提供する。

【００２２】

好ましい態様において、結合パートナーは、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーである細胞表面受容体であり；より好ましくは、結合パートナーはサイトカイン受容体ファミリーのメンバーである。

【００２３】

本発明はまた、多能性幹細胞前駆体からの細胞の増殖および／または分化を増加させる方法であって、本発明のポリペプチドおよび前記ポリペプチドのアゴニストからなる群より選択される、少なくとも１つの化合物を提供することを含んでなる方法も提供し；該方法の好ましい態様は、本発明のポリペプチドを少なくとも１つ投与することによって、患者において前記活性を増加させることをさらに含んでなる。

【００２４】

本発明がさらに提供するのは、多能性幹細胞前駆体からの細胞の増殖および／または分化を減少させる方法であって、少なくとも１つの本発明のポリペプチドのアンタゴニスト

を提供することを含んでなる方法であり；該方法の好ましい態様は、本発明のポリペプチドのアンタゴニストを少なくとも１つ投与することによって、患者において前記活性を減少させることをさらに含んでなり、そしてさらに好ましい態様では、アンタゴニストは、前記ポリペプチドいずれかの活性を阻害する抗体である。

【００２５】

本発明はさらに、細胞増殖増加および／または細胞分化改変を通じて、サイトカイン受容体を所持する細胞、またはその発生的に拘束された子孫の数を増加させる方法であって、サイトカイン受容体を所持する前記細胞を、本発明のポリペプチドまたはそのアゴニストと接触させることを含んでなる、前記方法を提供する。好ましい態様において、サイトカイン受容体を所持する細胞は多能性細胞であり、そしてさらに好ましい態様において、サイトカイン受容体を所持する細胞は、造血系の細胞である。

【００２６】

本発明の他の側面において、サイトカイン受容体を所持する細胞、またはその発生的に拘束された子孫の細胞減少症を治療する方法であって、患者に、療法的に有効な量の本発明のポリペプチドまたはそのアゴニストを１以上投与することを含んでなる、前記方法を提供する。好ましい態様において、患者はヒト患者であり；そしてさらに好ましい態様において、細胞減少症は造血細胞に影響を及ぼす疾患である。サイトカイン受容体を所持する細胞、またはその発生的に拘束された子孫の増殖低下（ｈｙｐｏｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ）を治療する方法であって、患者に、療法的に有効な量の本発明のポリペプチドのアンタゴニストを１以上投与することを含んでなる、前記方法もまた提供する。好ましい態様において、患者はヒト患者であり；そしてさらに好ましい態様において、増殖低下は、癌性または転移性状態であり；そしてより好ましくは、増殖低下は、白血病などのリンパ増殖である。

【００２７】

本発明の範囲にやはり含まれるのは、エフェクター機能が増加した免疫細胞の特定のサブクラスを増加させることによって、病原体および／または腫瘍に対する免疫活性を増加させる方法であって、患者に、療法的に有効な量の本発明のポリペプチドまたはそのアゴニストを１以上投与することを含んでなる、前記方法である。好ましい態様において、患者はヒト患者であり；そしてさらに好ましい態様において、エフェクター機能増加は、ウイルス感染細胞または癌性細胞に対する細胞溶解リンパ球機能の増加である。

【課題を解決するための手段】

【００２８】

発明の詳細な説明

他の４ＡＨＢサイトカインに対するＩＭＸ７１８９および新規ヒトサイトカイン構造の類似性

我々は、特定のヒトタンパク質が、ヒト４ＡＨＢサイトカインに構造的に関連することを確定し、そして相同なネズミ４ＡＨＢサイトカインを同定し；これらのヒトおよびネズミサイトカインをＩＭＸ７１８９と名付けた。本発明のヒトおよびネズミサイトカインポリペプチドのアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号２および４に提供し、そしてこれらのＩＭＸ７１８９サイトカイン間のアミノ酸配列類似性を示す並列を、以下の実施例１中の表１に示す。やはり４ＡＨＢサイトカインに構造的に関連する、さらなる新規ヒトポリペプチドを、配列番号６～９に提供する。本明細書において、「本発明のサイトカインポリペプチド」は、ヒトおよびネズミＩＭＸ７１８９ポリペプチド（配列番号２および４）および配列番号６～９のポリペプチドからなるポリペプチド群を指す。

【００２９】

４ＡＨＢサイトカインポリペプチドファミリーのメンバーに共通の典型的な構造要素には、ＮからＣの順に、ヘリックスＡ、ループＡＢ、ヘリックスＢ、ループＢＣ、ヘリックスＣ、ループＣＤ、およびヘリックスＤと称する、ループに分離された４つの「コア」アルファヘリックスが含まれる。ＩＭＸ７１８９サイトカインポリペプチド配列（配列番号２および４）の４つのアルファヘリックスのおよその位置を以下の表に示す。ＧｅｎｅＦ

ｏｌｄプログラム（以下の実施例１により詳細に記載する）を用いて、ＩＬ－４などのサイトカインテンプレートポリペプチド構造の既知のアルファヘリックスに最も緊密に適合する、ＩＭＸ７１８９ポリペプチド中の領域を発見することによって、ＩＭＸ７１８９サイトカインポリペプチド内のこれらのヘリックスの位置を決定した。４ＡＨＢサイトカインに類似の構造を有する、４つのさらなる新規ヒトポリペプチドにおけるアルファヘリックスの位置を、以下の表にさらに示す。いくつかの場合、ヘリックスＢおよびヘリックスＣの予測される範囲間で重複があり；これはこれらのヘリックス間のループＢＣ領域から生じる可能性があり、このことから、いくつかのＧｅｎｅＦｏｌｄテンプレート構造には伸長したコンホメーションがあり、そして他のものにはヘリックス構造があると想定され、これは、ループＢＣ領域が、異なる４ＡＨＢサイトカインで異なるコンホメーションを有する可能性がある柔軟な領域であることと一致する。したがって、本発明のサイトカインポリペプチドおよび本明細書に開示する４つのさらなる新規ヒトポリペプチドは、他の４ＡＨＢサイトカインポリペプチドのものと一致する全部で４つのヘリックス構造を有する。

【００３０】

【表１】

	アルファヘリックスの位置							
	ヒト IMX7189（配列番号 2）				ネズミ IMX7189（配列番号 4）			
	以下の間で開始:		以下の間で終了:		以下の間で開始		以下の間で終了:	
	A	B	Y	Z	A	B	Y	Z
ヘリックスA	35	40	52	53	40	45	57	58
ヘリックスB	72	74	95	98	77	79	100	103
ヘリックスC	98	101	122	123	103	106	127	128
ヘリックスD	123	124	136	139	128	129	141	144

	IMX168745（配列番号 6）				IMX185787（配列番号 7）			
	A－Bで開始:		Y－Zで終了:		A－Bで開始:		Y－Zで終了:	
ヘリックス	A	B	Y	Z	A	B	Y	Z
A	73	94	108	118	44	47	82	83
B	153	153	161	173	114	120	132	152
C	190	191	212	212	140	165	176	178
D	213	218	253	254	195	198	240	243

	IMX188339（配列番号 8）				IMX192967（配列番号 9）			
	A－Bで開始:		Y－Zで終了:		A－Bで開始:		Y－Zで終了:	
ヘリックス	A	B	Y	Z	A	B	Y	Z
A	587	588	613	615	27	29	39	41
B	639	643	664	669	66	68	80	101
C	673	674	700	702	111	111	133	143
D	715	715	724	730	147	148	177	187

【００３１】

ヒトおよびネズミＩＭＸ７１８９サイトカインポリペプチド（配列番号２および４）はまた、アミノ酸配列において、以下の実施例１中の表１に示すように、線虫（Ｃａｅｎｏｒｈａｂｄｉｔｉｓ　ｅｌｅｇａｎｓ）（「ｃｅ」）およびキイロショウジョウバエ（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ　ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ）（「ｄｍ」）などの他の種由来のポリ

ペプチドにも類似である。表１に示す配列に加えて、ＩＭＸ７１８９サイトカインポリペプチドにアミノ酸配列類似性を有する２つのさらなる線虫ポリペプチド（ＴｒＥＭＢＬデータベース寄託番号Ｑ９ＸＵ４１およびＱ９ＸＷＸ７）がある。これらの線虫ポリペプチドおよびショウジョウバエポリペプチドの生物学的機能は、まだ決定されていないようであった。我々は、ＩＬ－４のアルファヘリックスとよく並列する領域内のヒトおよびネズミＩＭＸ７１８９サイトカイン、並びに線虫およびショウジョウバエポリペプチド間の配列類似性に基づいて、線虫ポリペプチドおよびショウジョウバエポリペプチドが、哺乳動物サイトカインに類似の機能を持つ４ＡＨＢポリペプチドである可能性があることを発見した。ショウジョウバエＱ９ＶＮＶ２ポリペプチド配列（配列番号１３）および表１の他のものの間の最も有意な相異であっても、ショウジョウバエＱ９ＶＮＶ２ポリペプチドが４ＡＨＢポリペプチドであることと矛盾しない：ショウジョウバエＱ９ＶＮＶ２において、ヒトＩＭＸ７１８９ポリペプチド（配列番号２）のアミノ酸９９および１００に対応するアミノ酸の間に、およそ１１アミノ酸の挿入があり、これはヘリックスＢおよびＣ間の柔軟なＢＣループ領域に挿入を配置し、こうした挿入によってショウジョウバエＱ９ＶＮＶ２ポリペプチドの４ＡＨＢ構造が破壊された可能性は低い。

【００３２】

当業者は、上述のＩＭＸ７１８９サイトカインポリペプチドおよび新規ヒトポリペプチドのドメインの境界がおよそのものであり、そしてこうしたドメインの正確な境界、例えばアルファヘリックスの境界（その目的に利用可能なコンピュータプログラムを用いることによって予測可能なもの）もまた、４ＡＨＢサイトカインポリペプチドファミリー内のメンバー間で異なる可能性があることを認識するであろう。

【００３３】

４ＡＨＢサイトカインファミリーのメンバーは分泌ポリペプチドであり、そしてＩＭＸ１６８７４５ポリペプチド（配列番号６）など大部分は、アミノ酸配列の検査に基づいて予測されるシグナル配列を有する。ヒトおよびネズミＩＭＸ７１８９サイトカインポリペプチドは、標準的なシグナル配列を持たないようであるが、ヒトＩＭＸ７１８９ポリペプチドをコードするｐＤＣ４１４Ｇベクターで、ＣＯＳ細胞をトランスフェクションする一過性発現実験によって、ヒトＩＭＸ７１８９ポリペプチドがトランスフェクションされたＣＯＳ細胞から分泌されることが示される。したがって、認識可能なシグナル配列の欠如にもかかわらず、４ＡＨＢサイトカインに構造において類似であるヒトＩＭＸ７１８９などのポリペプチドは、細胞から分泌可能である。

【００３４】

本発明のサイトカインポリペプチドの生物学的活性および機能

ＩＭＸ７１８９および本新規ヒトサイトカインポリペプチドと関連する典型的な生物学的活性または機能は、多能性幹細胞前駆体からの細胞の増殖の刺激および／または分化の刺激である。細胞増殖活性の刺激を有する本発明のサイトカインポリペプチドは、受容体ポリペプチドに結合する。受容体結合活性は、本発明のサイトカインポリペプチドのヘリックスＡおよびヘリックスＤを含んでなるドメインに関連する。したがって、受容体結合活性を必要とする使用のため、本発明の好ましいサイトカインポリペプチドには、ヘリックスＡおよびヘリックスＤを有し、そして細胞増殖活性の刺激を示すものが含まれる。本発明の好ましいサイトカインポリペプチドには、本発明の１以上のサイトカインポリペプチドの少なくとも１つのアルファヘリックス部分、および細胞増殖活性の刺激を有する、これらのポリペプチドいずれかの断片を含んでなるオリゴマーまたは融合ポリペプチドがさらに含まれる。本発明のサイトカインポリペプチドの細胞増殖活性の、受容体に依存する刺激は、例えば、受容体ポリペプチド鎖の発現を指示する核酸構築物でトランスフェクションしたＢＡＦ細胞を用いた細胞増殖アッセイにおいて、決定可能である（例えば、Ｋａｌｌｅｎら，１９９９，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７４：１１８５９－１１８６７の図６を参照されたい）。あるいは、本発明のサイトカインポリペプチドでの細胞の処理が、細胞内シグナル伝達経路の活性化に有する影響は、受容体ポリペプチド鎖のリン酸化、またはＪＡＫファミリーメンバーの標的などのシグナル伝達経路キナーゼの他の標的

のリン酸化を測定することによってアッセイ可能である（例えば、Ｋａｌｌｅｎら，　１９９９，　Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ　２７４：１１８５９－１１８６７の図２を参照されたい）。細胞増殖活性の刺激を有する、本発明のサイトカインポリペプチドは、好ましくは、Ｋａｌｌｅｎら，　１９９９，　Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ　２７４：１１８５９－１１８６７の図６Ａにおいて測定されるような、ＩＬ－６の細胞増殖活性の最大刺激の少なくとも１０％（より好ましくは少なくとも２５％、そして最も好ましくは少なくとも５０％）を有する。細胞内シグナル伝達活性の刺激を有する、本発明のサイトカインポリペプチドは、好ましくは、Ｋａｌｌｅｎら，　１９９９，　Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ　２７４：１１８５９－１１８６７の図２Ａにおいて測定されるような、ＩＬ－６の細胞内シグナル伝達経路成分活性の最大リン酸化の少なくとも１０％（より好ましくは少なくとも２５％、そして最も好ましくは少なくとも５０％）を有する。用語「サイトカインポリペプチド活性」は、本明細書において、以下の１以上のいずれかを含む：細胞増殖活性の刺激および細胞内シグナル伝達経路成分活性のリン酸化とともに、本発明のサイトカインポリペプチド（例えばヒトおよびネズミＩＭＸ７１８９）のｅｘ　ｖｉｖｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏ活性。本発明の個々のサイトカインポリペプチド、並びにこれらのポリペプチドの断片および他の誘導体が、これらの活性を示す度合いは、標準的アッセイ法、特に、Ｋａｌｌｅｎら，　１９９９，　Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ　２７４：１１８５９－１１８６７に開示されるものなどのアッセイによって、測定可能である。さらなる典型的なアッセイを本明細書に開示する；当業者は、他の類似の種類のアッセイを用いて、本発明のサイトカインポリペプチドの生物学的活性を測定可能であることを認識するであろう。

【００３５】

本発明のサイトカインポリペプチドの生物学的活性の別の側面は、このポリペプチドファミリーのメンバーが免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーである細胞表面受容体などの特定の結合パートナーに、そしてより好ましくは、サイトカイン受容体ファミリーのメンバーに結合する能力である。用語「結合パートナー」には、本明細書において、リガンド、受容体、基質、抗体、本発明の他のサイトカインポリペプチド、本発明の同一のサイトカインポリペプチド（同型相互作用または多量体形成の場合）、および結合パートナーおよびサイトカインポリペプチドの特定の部分間の接触または近接を通じて、本発明のサイトカインポリペプチドと相互作用する他の分子いずれかが含まれる。本発明のサイトカインポリペプチドのヘリックスＡおよびヘリックスＤは、サイトカイン－受容体相互作用に関与する可能性があるため、これらのヘリックス内の疎水性残基または荷電残基の突然変異は、受容体ポリペプチドへの本発明のサイトカインポリペプチドの結合を改変すると予測される；こうした突然変異は、サイトカイン－受容体結合を破壊する可能性があるが、この相互作用の強度を増加させる可能性もある。サイトカイン受容体複合体の１以上の成分に結合することによって、またはいくつかの成分に結合するが、他のものには結合しないことによって、本発明の改変されたサイトカインポリペプチドは、本発明の天然サイトカインポリペプチド（類）による結合を防止する可能性があり、そしてこうして優性ネガティブ形式で作用して、サイトカイン受容体への本発明のサイトカインポリペプチドの結合を介して仲介される生物学的活性を阻害するであろう（例えば、相互作用の表ＩおよびＩＩを参照されたい（Ｇｒｏｅｔｚｉｎｇｅｒら，　１９９７，　ＰＲＯＴＥＩＮＳ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ，　Ｆｕｎｃｔｉｏｎ，　ａｎｄ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　２７：９６－１０９））。本発明のサイトカインポリペプチドおよびその結合パートナー間の結合を検出するかまたは測定するのに適したアッセイが当業者に周知であり、そしてこうしたアッセイを本明細書に記載する。

【００３６】

本発明のサイトカインポリペプチドは、病因において、共通の特徴として、多能性幹細胞前駆体からの細胞の増殖および／または分化、あるいはこうした増殖および／または発生プロセスにおける欠陥を共有する疾患または状態に関与する。本発明のサイトカインポリペプチド、並びにその基質、リガンド、受容体、結合パートナー、およびまたは他の相互作用ポリペプチド間の相互作用の遮断または阻害は、本発明の側面であり、そしてこれ

らは本発明のサイトカインポリペプチド活性の阻害剤の使用を通じて、多能性幹細胞前駆体からの細胞の過剰な増殖および／または分化に関与する疾患および状態を治療するかまたは改良する（ａｍｅｌｉｏｒａｔｅ）方法を提供する。こうした阻害剤またはアンタゴニストの例を以下により詳細に記載する。多能性幹細胞前駆体からの細胞の不適切な増殖および／または分化に関与する状態に関しては、これらの状態を治療するかまたは改良する方法は、本発明の単離サイトカインポリペプチドまたはその活性断片もしくは融合ポリペプチドを提供することによって、あるいは本発明の内因性または外因性サイトカインポリペプチドを活性化する化合物（アゴニスト）を提供することによって、本発明のサイトカインポリペプチドの量または活性を増加させることを含んでなる。本発明のサイトカインポリペプチドのさらなる使用には、多能性幹細胞前駆体からの細胞の増殖または発生に関与する状態および疾患のための診断試薬、多能性幹細胞前駆体からの細胞の増殖および／または分化を研究するための研究試薬、あるいはサイトカイン受容体を発現している細胞に療法剤を搬送するキャリアー／標的化ポリペプチドとしてのものが含まれる。

【００３７】

本発明のサイトカインポリペプチド

本発明のサイトカインポリペプチドは、（Ａ）特定の構造ドメインを共有する可能性があるポリペプチドとして、当業者に同定されるのに十分な度合いの、そして／または（Ｂ）配列番号２、４、および６～９のサイトカインポリペプチドと共通の生物学的活性を有するのに十分な度合いの、そして／または（Ｃ）本発明の他のサイトカインポリペプチドにもまた特異的に結合する抗体に結合するのに十分な度合いの、配列番号２、４、および６～９のポリペプチドへのアミノ酸同一性または類似性を共有するポリペプチドである。本発明のサイトカインポリペプチドは、天然存在供給源から単離可能であり、または本発明の天然存在サイトカインポリペプチドと同じ構造を有するか、または本発明の天然存在サイトカインポリペプチドと異なる構造を有するように産生可能である。いずれかの種類の改変によって（例えば、限定されるわけではないが、アミノ酸の挿入、欠失、または置換；ポリペプチドのグリコシル化状態の変化；その三次元構造または自己会合状態を変化させる再フォールディングまたは異性化；および他のポリペプチドまたは分子との会合に対する変化）、本発明のサイトカインポリペプチドいずれかに由来するポリペプチドもまた、本発明のサイトカインポリペプチドである。したがって、本発明が提供するポリペプチドには、本明細書に記載する、本発明のサイトカインポリペプチドのものに類似のアミノ酸配列によって特徴付けられるが、修飾が天然に提供されるかまたは意図的に操作されている、ポリペプチドが含まれる。本発明のサイトカインポリペプチドと共通の生物学的活性を共有するポリペプチドは、サイトカインポリペプチド活性を有するポリペプチドである。本発明のサイトカインポリペプチドが示す生物学的活性の例には、限定なしに、多能性幹細胞前駆体からの細胞の増殖および／または分化の刺激が含まれる。

【００３８】

本発明は、本発明のサイトカインポリペプチドの全長および成熟型どちらも提供する。全長ポリペプチドは、最初に翻訳されるようなポリペプチドの完全一次アミノ酸配列を有するものである。全長ポリペプチドのアミノ酸配列は、例えば、ｃＤＮＡ分子の完全オープンリーディングフレーム（「ＯＲＦ」）の翻訳によって、得ることが可能である。単一の遺伝子座から、選択的スプライシングによって、または多数の翻訳開始部位の使用によって、多数のｍＲＮＡ型が産生される場合、その遺伝子座に、いくつかの全長ポリペプチドがコードされうる。ポリペプチドの「成熟型」は、シグナル配列の切断またはプロドメインを除去するタンパク質分解的切断などの、翻訳後プロセシング工程を経たポリペプチドを指す。例えば、多数の部位でのシグナル配列の切断によって、またはポリペプチドを切断するプロテアーゼの差別的制御によって、特定の全長ポリペプチドの多数の成熟型が産生可能である。こうしたポリペプチドの成熟型（類）は、全長ポリペプチドをコードする核酸分子を、適切な哺乳動物細胞または他の宿主細胞において発現することによって、得ることが可能である。ポリペプチドの成熟型の配列はまた、シグナル配列またはプロテアーゼ切断部位の同定を通じて、全長型のアミノ酸配列からも決定可能である可能性があ

る。本発明のサイトカインポリペプチドには、一部切除されている（ｔｒｕｎｃａｔｅｄ）が、生物学的に活性であるポリペプチド、例えばポリペプチドの天然存在可溶性型を生じることが可能な、選択的ｍＲＮＡプロセシングなどの、転写後または翻訳後プロセシング事象から生じるポリペプチドもまた含まれる。本発明内にやはり含まれるのは、ポリペプチドからの１以上の末端アミノ酸（一般的には１～５の末端アミノ酸）のタンパク質分解的除去による、異なる種類の宿主細胞における発現に際する、ＮまたはＣ末端の相違などの、タンパク質分解に起因しうる変異である。

【００３９】

本発明はさらに、結合する天然パターングリコシル化を含むまたは含まない本発明のサイトカインポリペプチドを含む。酵母または哺乳動物発現系（例えばＣＯＳ－１またはＣＨＯ細胞）で発現したポリペプチドは、発現系の選択に応じて、分子量およびグリコシル化パターンにおいて、天然ポリペプチドと類似である可能性も、または有意に異なる可能性もある。大腸菌などの細菌発現系における本発明のポリペプチドの発現は、非グリコシル化分子を提供する。さらに、既定の調製は、多数の異なってグリコシル化されたポリペプチド種を含む可能性がある。グリコシル基は、慣用法、特にグリコペプチダーゼを利用するものを通じて、除去可能である。一般的に、本発明のグリコシル化ポリペプチドは、モル過剰のグリコペプチダーゼ（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍ）とインキュベーションすることが可能である。

【００４０】

本発明のサイトカインポリペプチドおよびそれらをコードする核酸の種相同体もまた、本発明に提供する。本明細書において、「種相同体」は、既定のポリペプチドまたは核酸のものと起源の異なる種のものであるが、当業者に決定されるように、既定のポリペプチドまたは核酸に有意な配列類似性を持つポリペプチドまたは核酸である。種相同体は、本明細書に提供するアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドから適切なプローブまたはプライマーを作成し、そして望ましい種由来の適切な核酸供給源をスクリーニングすることによって単離および同定可能である。本発明はまた、本発明のサイトカインポリペプチドのアレル変異体およびそれらをコードする核酸；すなわち、アミノ酸またはヌクレオチド配列の相異が遺伝子多型（集団内の個体間のアレル変異）に起因しうる、こうしたポリペプチドおよび核酸の天然存在代替型も含む。

【００４１】

本発明のサイトカインポリペプチドの断片が本発明に含まれ、そして該断片は直線型であっても、または例えば、Ｓａｒａｇｏｖｉら，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １０：７７３－７７８（１９９２）およびＭｃＤｏｗｅｌｌら，Ｊ．Ａｍｅｒ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１４：９２４５－９２５３（１９９２）に記載されるように、既知の方法を用いて環状化してもよい。本発明のポリペプチドおよびポリペプチド断片、並びにそれらをコードする核酸は、本発明のサイトカインポリペプチドの長さの少なくとも２５％（より好ましくは少なくとも５０％、または少なくとも６０％、または少なくとも７０％、そして最も好ましくは少なくとも８０％）のアミノ酸またはヌクレオチド配列長を持つ、ポリペプチドおよび核酸を含み、そして配列ギャップを最小にしつつ、重複および同一性が最大になるように並列させた際にポリペプチドのアミノ酸配列を比較することによって、配列同一性が決定される場合、サイトカインポリペプチドまたはそれらをコードする核酸と、少なくとも６０％（より好ましくは少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７．５％、または少なくとも９９％、そして最も好ましくは少なくとも９９．５％）の配列同一性を有する。本発明にやはり含まれるのは、好ましくは少なくとも８、または少なくとも１０、または好ましくは少なくとも１５、またはより好ましくは少なくとも２０、またはさらにより好ましくは少なくとも３０、または最も好ましくは少なくとも４０の隣接するアミノ酸を含んでなるセグメントを含有するかまたはコードする、ポリペプチドおよびポリペプチド断片、並びにそれらをコードする核酸である。こうしたポリペプチドおよびポリペプチド断片はまた、配列ギャップを最小にしつつ、重複および同一性が最大

になるように並列させた際にポリペプチドのアミノ酸配列を比較することによって、配列同一性が決定される場合、本発明のサイトカインポリペプチドいずれかのこうしたセグメントいずれかと、少なくとも７０％（より好ましくは少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７．５％、または少なくとも９９％、そして最も好ましくは少なくとも９９．５％）の配列同一性を共有するセグメントを含有することも可能である。２つのアミノ酸または２つの核酸配列の同一性パーセントは、視覚的検査および数学的計算によって決定可能であるし、またはより好ましくは、コンピュータプログラムを用いて配列情報を比較することによって、比較を行う。典型的な好ましいコンピュータプログラムは、遺伝学コンピュータグループ（ＧＣＧ；ウィスコンシン州マディソン）ウィスコンシンパッケージ、バージョン１０．０プログラム、「ＧＡＰ」（Ｄｅｖｅｒｅｕｘら，１９８４，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１２：３８７）である。「ＧＡＰ」プログラムの好ましいデフォルトパラメータには：（１）ヌクレオチドに関する単一（ｕｎａｒｙ）比較マトリックス（同一に対し１および非同一に対し０の値を含む）、並びにＳｃｈｗａｒｔｚおよびＤａｙｈｏｆｆ監修，Ａｔｌａｓ ｏｆ Ｐｏｌｙｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ ａｎｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ，ｐｐ．３５３－３５８，１９７９に記載されるような、ＧｒｉｂｓｋｏｖおよびＢｕｒｇｅｓｓ，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１４：６７４５，１９８６の加重アミノ酸比較マトリックス；または他の匹敵する比較マトリックス；（２）アミノ酸配列の各ギャップに対する３０のペナルティおよび各ギャップ中の各記号に対しさらに１のペナルティ、またはヌクレオチド配列の各ギャップに対する５０のペナルティおよび各ギャップ中の各記号に対しさらに３のペナルティ；（３）末端ギャップに対するペナルティなし；および（４）長いギャップに対する最大ペナルティなし、が含まれる。配列比較の当業者に使用される他のプログラム、例えばＮａｔｉｏｎａｌ Ｌｉｂｒａｒｙ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅウェブサイトｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｇｏｒｆ／ｗｂｌａｓｔ２．ｃｇｉを介しての使用に利用可能なＢＬＡＳＴＮプログラム、バージョン２．０．９、またはＵＷ－ＢＬＡＳＴ ２．０アルゴリズムなどもまた、使用可能である。ＵＷ－ＢＬＡＳＴ ２．０の標準的デフォルトパラメータ設定は、以下のインターネットサイト：ｓａｐｉｅｎｓ．ｗｕｓｔｌ．ｅｄｕ／ｂｌａｓｔ／ｂｌａｓｔ／#Ｆｅａｔｕｒｅｓに記載される。さらに、該ＢＬＡＳＴアルゴリズムは、ＢＬＯＳＵＭ６２アミノ酸スコア化マトリックスを用い、そして使用可能な所望によるパラメーターは、以下のとおりである：（Ａ）組成上の複雑さが低いクエリー配列のセグメント（ＷｏｏｔｔｏｎおよびＦｅｄｅｒｈｅｎ（Ｃｏｍｐｕｔｅｒｓ ａｎｄ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１９９３）のＳＥＧプログラムによって決定されるようなもの；また、ＷｏｏｔｔｏｎおよびＦｅｄｅｒｈｅｎ，１９９６，Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎａｌｌｙ ｂｉａｓｅｄ ｒｅｇｉｏｎ ｉｎ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｄａｔａｂａｓｅ，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．２６６：５５４－７１も参照されたい）、または短い周期の内部反復からなるセグメント（ＣｌａｖｅｒｉｅおよびＳｔａｔｅｓ（Ｃｏｍｐｕｔｅｒｓ ａｎｄ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１９９３）のＸＮＵプログラムによって決定されるようなもの）をマスクするフィルターの包含、および（Ｂ）データベース配列に対するマッチを報告する、統計的有意性の閾値、またはＥスコア（ＫａｒｌｉｎおよびＡｌｔｓｃｈｕｌ（１９９０）の確率論モデルによれば、マッチが単なる偶然によって見出されると予期される確率；マッチに割り当てられた統計的有意性がこのＥスコア閾値より高ければ、該マッチは報告されないであろう）；好ましいＥスコア閾値は０．５であり、または優先性を増加させるため、０．２５、０．１、０．０５、０．０１、０．００１、０．０００１、１ｅ－５、１ｅ－１０、１ｅ－１５、１ｅ－２０、１ｅ－２５、１ｅ－３０、１ｅ－４０、１ｅ－５０、１ｅ－７５、または１ｅ－１００である。

【００４２】

本発明はまた、これらのポリペプチドの特定の断片またはドメインを含んでなる、本発

明のサイトカインポリペプチドの可溶性型も提供する。可溶性ポリペプチドは、発現される細胞から分泌されることが可能なポリペプチドである。分泌された可溶性ポリペプチドは、培地から、例えば遠心分離によって、所望のポリペプチドを発現する、損なわれていない（ｉｎｔａｃｔ）細胞を分離し、そして所望のポリペプチドの存在に関して培地（上清）をアッセイすることによって、同定（そして非可溶性膜結合対応物から区別）可能である。培地中の所望のポリペプチドの存在は、ポリペプチドが細胞から分泌され、そしてしたがって、該ポリペプチドの可溶性型であることを示す。本発明のサイトカインポリペプチドの可溶性型の使用は、多くの適用に好適である。可溶性ポリペプチドは細胞から分泌されるため、組換え宿主細胞からのポリペプチドの精製が容易になる。さらに、可溶性ポリペプチドは、一般的に、非経口投与に関して、そして多くの酵素的方法に関して、膜結合型より適している。

【００４３】

「アミノ酸配列から本質的になる単離ポリペプチド」は、該ポリペプチドが、前記アミノ酸配列に加えて、ポリペプチドのどちらかの端または両端に共有結合したさらなる成分を有することが可能であることを意味し、前記のさらなる成分は、好ましくは、ポリペプチドのどちらかの端または両端に共有結合した、１～１０，０００の間のさらなるアミノ酸、およびより好ましくは、ポリペプチドのどちらかの端または両端に共有結合した、１～１，０００の間のさらなるアミノ酸、および最も好ましくは、ポリペプチドのどちらかの端または両端に共有結合した、１～１００の間のさらなるアミノ酸である。好ましい態様において、ポリペプチドのどちらかの端または両端への、さらなるアミノ酸の共有結合は、天然存在でなく、また当該技術分野に開示されていない、新規の組み合わせたアミノ酸配列を生じる。

【００４４】

本発明の別の側面において、好ましいポリペプチドは、ヘリックスＡ、Ｂ、Ｃ、およびＤおよび／またはヘリックス間ループＡＢ、ＢＣ、およびＣＤなどの、本発明のサイトカインポリペプチドの構造の多様な組み合わせを含んでなる。したがって、本発明のポリペプチドおよびそれらをコードする核酸には、ヘリックスＡの２以上のコピー、ヘリックスＤの２以上のコピー、または各々の少なくとも１つのコピーを含んでなるかまたはコードするものが含まれる。本発明のさらなる態様は、ＮからＣの順序で：ヘリックスＡから本質的になるポリペプチドに共有結合した、ヘリックスＢから本質的になるポリペプチドに共有結合した、ヘリックスＣから本質的になるポリペプチドに共有結合した、ヘリックスＤから本質的になるポリペプチドからなる単離ＩＭＸ７１８９ポリペプチドであり、ＩＭＸ７１８９ポリペプチドの既定のヘリックスから本質的になるポリペプチドには、天然存在または修飾ヘリックス間ループアミノ酸配列、例えば、１以上のアミノ酸の保存的置換が施されている、ヘリックス間ループ配列が含まれることが可能である。本発明の単離ＩＭＸ７１８９ポリペプチドは、特に、ＷＯ　００／７００４７（ＧｅｎｅＳｅｑ　ＡＡＢ３６６２７）、ＷＯ　０１／５３３１２（ＧｅｎｅＳｅｑ　ＡＡＭ４０２５０）、ＴｒＥＭＢＬデータベース寄託番号Ｑ９ＢＳＴ１およびＱ９ＮＷＫＯ、ＧｅｎＢａｎｋ寄託番号ＸＰ＿０４０８５２．１およびＢＡＡ９１３８０．１、ＴｒＥＭＢＬデータベース寄託番号Ｑ９Ｐ０Ｒ６、ＧｅｎＢａｎｋ寄託番号ＮＰ＿０５７５５６、ＷＯ　００／５５１７１（ＧｅｎｅＳｅｑ　ＡＡＢ２８０００）、またはＷＯ　００／６１６２０（ＧｅｎｅＳｅｑ　ＡＡＢ５１６８４）に開示されるポリペプチドのアミノ酸配列からなるのではない。

【００４５】

当業者は、既知の技術を用いて、ペプチドまたはＤＮＡ配列中にさらなる修飾を施すことが可能である。ポリペプチド配列中の目的の修飾には、選択したアミノ酸の改変、置換、交換、挿入、または欠失が含まれる可能性がある。例えば、１以上のシステイン残基を欠失させるかまたは別のアミノ酸と交換して、分子のコンホメーションを改変することが可能であり、この改変は、フォールディングまたは再生に際して、正しくない分子内ジスルフィド架橋の形成を防ぐことを伴いうる。こうした改変、置換、交換、挿入または欠失のための技術は、当業者に周知である（例えば米国特許第４，５１８，５８４号を参照さ

れたい）。別の例として、ポリペプチドのＮ－グリコシル化部位を修飾して、グリコシル化を妨げてもよく、これによって哺乳動物および酵母発現系における炭水化物減少類似体（ａｎａｌｏｇ）の発現が可能になる。真核ポリペプチドのＮ－グリコシル化部位はアミノ酸トリプレットＡｓｎ－Ｘ－Ｙにより特徴付けられ、ここでＸはＰｒｏ以外のいかなるアミノ酸でもよく、そしてＹはＳｅｒまたはＴｈｒである。これらのトリプレットをコードするヌクレオチド配列に対する適切な置換、付加または欠失の結果、Ａｓｎ側鎖での炭水化物残基の付着が防止されるであろう。例えば、Ａｓｎが異なるアミノ酸によって交換されるように選択される、単一のヌクレオチドの改変は、Ｎ－グリコシル化部位を不活性化するのに十分である。あるいは、ＳｅｒまたはＴｈｒを別のアミノ酸、例えばＡｌａと交換してもよい。ポリペプチドのＮ－グリコシル化部位を不活性化するための既知の方法には、米国特許第５，０７１，９７２号およびＥＰ　２７６，８４６に記載されるものが含まれる。本発明の範囲内のさらなる変異体には、グリコシル基、脂質、リン酸、アセチル基等の他の化学部分と共有または凝集コンジュゲートを形成することによって修飾され、誘導体を生成しうるポリペプチドが含まれる。共有誘導体は、アミノ酸側鎖上の官能基に、あるいはポリペプチドのＮ末端またはＣ末端に、化学部分を連結することによって、調製可能である。付着している診断用（検出可能）剤または療法剤を含んでなるコンジュゲートが本明細書に意図される。好ましくは、こうした改変、置換、交換、挿入または欠失は、ポリペプチドまたはその実質的な同等物の所望の活性を保持する。１つの例は、天然型と本質的に同一の結合親和性で結合する変異体である。結合親和性は、例えば米国特許第５，５１２，４５７号に記載されるように、そして本明細書に示すように、慣用法によって測定可能である。

【００４６】

他の有用な誘導体には、Ｎ末端またはＣ末端融合体としての組換え培養における合成によるなどの、他のポリペプチド若しくはポリペプチド類と該ポリペプチドとの共有または凝集コンジュゲートが含まれる。融合ポリペプチドの例を、オリゴマーと関連して以下に論じる。さらに、融合ポリペプチドは、精製および同定を容易にするため付加するペプチドを含んでなることが可能である。こうしたペプチドには、例えば、ポリ－Ｈｉｓまたは米国特許第５，０１１，９１２号およびＨｏｐｐら，　Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　６：１２０４，　１９８８に記載される抗原性同定ペプチドが含まれる。こうしたペプチドの１つはＦＬＡＧ（登録商標）ペプチドであり、該ペプチドは抗原性が高く、そして特異的なモノクローナル抗体が可逆的に結合するエピトープを提供し、発現した組換えポリペプチドの迅速なアッセイおよび容易な精製を可能にする。４Ｅ１１と称されるネズミハイブリドーマは、米国特許第５，０１１，９１２号に記載されるように、特定の二価金属陽イオンの存在下でＦＬＡＧ（登録商標）ペプチドに結合するモノクローナル抗体を産生する。４Ｅ１１ハイブリドーマ細胞株は、寄託番号第ＨＢ９２５９号でアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託されている。ＦＬＡＧ（登録商標）ペプチドに結合するモノクローナル抗体は、Ｅａｓｔｍａｎ　Ｋｏｄａｋ　Ｃｏ．，　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｉｍａｇｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　Ｄｉｖｉｓｉｏｎ、コネティカット州ニューヘブンより入手可能である。

【００４７】

本発明に含まれるのは、本発明のサイトカインポリペプチド、本発明のサイトカインポリペプチドの１以上の断片、または本明細書に開示するような本発明のサイトカインポリペプチドの誘導体または変異体型のいずれかを含有するオリゴマーまたは融合ポリペプチドである。特定の態様において、オリゴマーは本発明の可溶性サイトカインポリペプチドを含んでなる。オリゴマーは、二量体、三量体、またはより高次のオリゴマーを含む、共有結合または非共有結合多量体型であってもよい。本発明の１つの側面において、オリゴマーはポリペプチド成分の結合能を維持し、そしてしたがって、二価、三価等の結合部位を提供する。別の態様において、本発明は、ポリペプチドに融合しているペプチドであって、オリゴマー化を促進する特性を有する前記ペプチド部分間の共有または非共有相互作用を介して連結している、本発明の多数のサイトカインポリペプチドを含んでなるオリゴ

マーに関する。以下により詳細に記載するように、付着するポリペプチドのオリゴマー化を促進することが可能なペプチドの中に、ロイシンジッパーおよび抗体由来の特定のポリペプチドがある。

【００４８】

本発明のサイトカインポリペプチドの変異体が膜貫通ドメインを含むように構築される態様では、該変異体は、Ｉ型膜ポリペプチドを形成するであろう。本発明の膜貫通サイトカインポリペプチドを、リガンドが知られている受容体ポリペプチドの細胞外ドメインに融合させることが可能である。その後、こうした融合ポリペプチドを操作して、本発明の膜貫通サイトカインポリペプチドに誘発される細胞内シグナル伝達経路を制御することが可能である。また、細胞膜を貫通する本発明のサイトカインポリペプチドを、細胞表面受容体のアゴニストまたはアンタゴニスト、あるいは細胞接着分子と融合させて、サイトカインの細胞内効果をさらに調節することも可能である。本発明の別の側面において、他のインターロイキンまたはサイトカインポリペプチドを、本発明のサイトカインポリペプチドの好ましい断片および他の融合ポリペプチドドメインの間に配置することが可能である。

【００４９】

免疫グロブリンに基づくオリゴマー。ポリペプチド結合部位の結合価を増加させることを含む多くの目的のため、本発明のポリペプチドまたはその断片を、免疫グロブリンなどの分子に融合させてもよい。例えば、本発明のサイトカインポリペプチドの断片を、直接、またはリンカー配列を通じて、免疫グロブリンのＦｃ部分に融合させることが可能である。ポリペプチドを二価型にするため、こうした融合は、ＩｇＧ分子のＦｃ部分に対しての融合であることが可能である。他の免疫グロブリンアイソタイプもまた用いて、こうした融合体を生成することが可能である。例えば、ポリペプチド－ＩｇＭ融合は、本発明のポリペプチドの十価型を生成するであろう。本明細書において、用語「Ｆｃポリペプチド」には、抗体のＦｃ領域のＣＨドメインのいずれかまたはすべてを含んでなるＦｃ領域で構成される、ポリペプチドの天然型および突然変異タンパク質（ｍｕｔｅｉｎ）型が含まれる。二量体化を促進するヒンジ領域を含有する、こうしたポリペプチドの一部切除型もまた含まれる。好ましいＦｃポリペプチドは、ヒトＩｇＧ１抗体由来のＦｃポリペプチドを含んでなる。１つの代替物として、免疫グロブリン由来のポリペプチドを用いて、オリゴマーを調製する。抗体由来ポリペプチドの多様な部分（Ｆｃドメインを含む）に融合している特定の異種ポリペプチドを含んでなる融合ポリペプチドの調製は、例えば、Ａｓｈｋｅｎａｚｉら（ＰＮＡＳ ＵＳＡ ８８：１０５３５，１９９１）；Ｂｙｒｎら（Ｎａｔｕｒｅ，３４４：６７７，１９９０）；並びにＨｏｌｌｅｎｂａｕｇｈおよびＡｒｕｆｆｏ（“Ｃｏｎｓｔｒｕｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ Ｆｕｓｉｏｎ Ｐｏｌｙｐｅｐｔｉｄｅｓ”，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ中，Ｓｕｐｐｌ．４，１０．１９．１－１０．１９．１１ページ，１９９２）に記載されている。免疫グロブリンに基づくオリゴマーの調製法および使用法は、当該技術分野に周知である。本発明の１つの態様は、本発明のポリペプチドを抗体由来のＦｃポリペプチドに融合することによって生成される２つの融合ポリペプチドを含んでなる二量体に関する。ポリペプチド／Ｆｃ融合ポリペプチドをコードする遺伝子融合体を適切な発現ベクターに挿入する。組換え発現ベクターで形質転換した宿主細胞でポリペプチド／Ｆｃ融合ポリペプチドを発現し、そして抗体分子によく似た形で集合させ、その結果、Ｆｃ部分間に鎖間ジスルフィド結合が形成され、二価分子を生じるのを可能にする。ＰＣＴ出願ＷＯ ９３／１０１５１に記載される１つの適切なＦｃポリペプチドは、ヒトＩｇＧ１抗体のＦｃ領域のＮ末端ヒンジ領域から天然Ｃ末端に渡る一本鎖ポリペプチドである。別の有用なＦｃポリペプチドは、米国特許第５，４５７，０３５号およびＢａｕｍら（ＥＭＢＯ Ｊ．１３：３９９２－４００１，１９９４）に記載されるＦｃ突然変異タンパク質である。この突然変異タンパク質のアミノ酸配列は、アミノ酸１９がＬｅｕからＡｌａに変化し、アミノ酸２０がＬｅｕからＧｌｕに変化し、そしてアミノ酸２２がＧｌｙからＡｌａに変化していることを除けば、ＷＯ ９３／１０１５１

に示される天然Ｆｃ配列のものと同一である。該突然変異タンパク質は、Ｆｃ受容体に対し、減少した親和性を示す。Ｆｃ部分を含んでなる上述の融合ポリペプチド（およびそれから形成されるオリゴマー）は、ポリペプチドＡまたはポリペプチドＧカラム上のアフィニティークロマトグラフィーによる容易な精製という利点を提供する。他の態様において、本発明のポリペプチドを、抗体重鎖または軽鎖の可変部に対して置換してもよい。融合ポリペプチドが抗体の重鎖および軽鎖両方で作成されている場合、４つものサイトカイン細胞外領域を持つオリゴマーを形成することが可能である。

【００５０】

ペプチドリンカーに基づくオリゴマー。あるいは、オリゴマーは、ペプチドリンカー（スペーサーペプチド）を含み、または含まず、多数の本発明のサイトカインポリペプチドを含んでなる融合ポリペプチドである。適切なペプチドリンカーの中には、米国特許第４，７５１，１８０号および第４，９３５，２３３号に記載されるものがある。いかなる適切な慣用的技術を用いて、所望のペプチドリンカーをコードするＤＮＡ配列を、本発明のＤＮＡ配列間に、そして該配列と同じ読み枠で挿入してもよい。例えば、リンカーをコードする、化学的に合成したオリゴヌクレオチドを、配列間に連結してもよい。特定の態様において、融合ポリペプチドは、ペプチドリンカーによって分離された、２～４の本発明の可溶性サイトカインポリペプチドを含んでなる。適切なペプチドリンカー、他のポリペプチドとの組み合わせ、およびその使用は、当業者に周知である。

【００５１】

ロイシンジッパー。本発明のオリゴマーを調製するための別の方法は、ロイシンジッパーの使用を伴う。ロイシンジッパードメインは、該ドメインが見られるポリペプチドのオリゴマー化を促進するペプチドである。ロイシンジッパーは、元々、いくつかのＤＮＡ結合ポリペプチドで同定され（Ｌａｎｄｓｃｈｕｌｚら，　Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４０：１７５９，　１９８８）、そして以来、多様な異なるポリペプチドで見出されてきている。既知のロイシンジッパードメインの中には、二量体化または三量体化する天然存在ペプチドおよび誘導体がある。ジッパードメイン（本明細書において、オリゴマー化ドメインまたはオリゴマー形成ドメインとも称する）は、しばしば、他のアミノ酸が組み入れられた４または５のロイシン残基を持つ、７アミノ酸反復を含んでなる。ロイシンジッパーの使用およびロイシンジッパーを用いたオリゴマー調製は、当該技術分野に周知である。

【００５２】

全体でまたは部分で、ポリペプチド活性を保持すると期待され、そしてしたがって、スクリーニングまたは他の免疫学的方法論に有用である可能性がある、ポリペプチド配列の他の断片および誘導体もまた、本明細書の開示が与えられていれば、当業者によって、作成可能である。こうした修飾は、本発明に含まれると考えられる。

【００５３】

本発明のサイトカインポリペプチドをコードする核酸

本発明内に含まれるのは、本発明のサイトカインポリペプチドをコードする核酸である。これらの核酸は、適切な供給源からゲノムまたはｃＤＮＡ分子を単離することを含む、いくつかの方法で同定可能である。アミノ酸配列から「逆翻訳（ｂａｃｋ－ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎ）」することによって、またはコードＤＮＡ配列が同定されているポリペプチドとアミノ酸同一性を持つ領域を同定することによって、核酸単離のためのプローブまたはプライマーとして、あるいはデータベース検索のためのクエリー配列として使用しようとする、本明細書に記載するアミノ酸配列に対応するヌクレオチド配列を得ることが可能である。周知のポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）法を使用して、本発明のサイトカインポリペプチドまたは本発明のサイトカインポリペプチド断片の所望の組み合わせをコードするＤＮＡ配列を単離し、そして増幅することが可能である。ＤＮＡ断片の組み合わせの所望の末端を定義するオリゴヌクレオチドを、５’および３’プライマーとして使用する。オリゴヌクレオチドは、発現ベクターに、増幅されたＤＮＡ断片の組み合わせを挿入するのを容易にするため、制限エンドヌクレアーゼの認識部位を、さらに含有してもよい。ＰＣＲ技術は、Ｓａｉｋｉら，　Ｓｃｉｅｎｃｅ　２３９：４８７（１９８８）；Ｒｅｃｏ

mbinant DNA Methodology, Wuら監修, Academic Press, Inc., サンディエゴ（１９８９）, pp.１８９－１９６；およびPCR Protocols：A Guide to Methods and Applications, Innisら監修, Academic Press, Inc.（１９９０）に記載される。

【００５４】

本発明の核酸分子には、一本鎖および二本鎖型両方のＤＮＡおよびＲＮＡと共に対応する相補配列が含まれる。ＤＮＡには、例えば、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ、化学的に合成したＤＮＡ、ＰＣＲによって増幅したＤＮＡ、およびその組み合わせが含まれる。本発明の核酸分子には、全長遺伝子またはｃＤＮＡ分子と共に、その断片の組み合わせが含まれる。本発明の核酸は、優先的にヒト供給源由来であるが、本発明は非ヒト種由来のものもまた含む。

【００５５】

「単離核酸分子」は、天然存在供給源から単離されている核酸の場合、核酸が単離された生物のゲノムに存在する隣接遺伝子配列から分離されている核酸である。例えば、ＰＣＲ産物、ｃＤＮＡ分子、またはオリゴヌクレオチドなどの、テンプレートから酵素的に、または化学的に合成された核酸の場合、こうしたプロセスから生じる核酸は、単離核酸と理解される。単離核酸分子は、別個の断片の形の、またはより大きい核酸構築物の成分としての、核酸分子を指す。１つの好ましい態様において、核酸は、実質的に、混入する内因性成分を含まない。核酸分子は、好ましくは、少なくとも１度は、実質的に純粋な形で、そして標準的生化学法（Sambrookら, Molecular Cloning：A Laboratory Manual, 第２版, Cold Spring Harbor Laboratory, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー（１９８９）に概略されるものなど）によって、その成分ヌクレオチド配列の同定、操作および回収を可能にする量または濃度で単離されているＤＮＡまたはＲＮＡに由来している。こうした配列は、好ましくは、真核遺伝子に典型的には存在する、内部非翻訳配列、またはイントロンに中断されない、オープンリーディングフレームの形で提供され、そして／または構築される。非翻訳ＤＮＡ配列が、オープンリーディングフレームの５’または３’に存在することが可能であり、ここでは該ＤＮＡは、コード領域の操作または発現に干渉しない。

【００５６】

「ヌクレオチド配列から本質的になる単離核酸」は、該核酸が、前記ヌクレオチド配列に加えて、核酸分子のどちらかの端または両端に共有結合したさらなる物質を有することが可能であることを意味し、前記のさらなる物質は、好ましくは、核酸分子のどちらかの端または両端に共有結合した、１～１００，０００の間のさらなるヌクレオチド、およびより好ましくは、核酸分子のどちらかの端または両端に共有結合した、１～１，０００の間のさらなるヌクレオチド、および最も好ましくは、核酸分子のどちらかの端または両端に共有結合した、１０～１００の間のさらなるヌクレオチドである。好ましい態様において、核酸分子のどちらかの端または両端への、さらなるヌクレオチドの共有結合は、天然存在でなく、また当該技術分野に開示されていない、新規の組み合わせたヌクレオチド配列を生じる。ヌクレオチド配列から本質的になる単離核酸は、前記ヌクレオチド配列を含んでなる発現ベクターまたは他の構築物であることが可能である。

【００５７】

本発明にはまた、中程度にストリンジェントな条件下、そしてより好ましくは非常にストリンジェントな条件下で、本明細書に記載する本発明のサイトカインポリペプチドをコードする核酸にハイブリダイズする核酸も含まれる。ハイブリダイゼーション条件の選択に影響を与える基本的なパラメーターおよび適切な条件を考案するための手引きは、Sambrook, Fritsch, およびManiatis（１９８９, Molecular Cloning：A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州コー

ルドスプリングハーバー，第９章および第１１章；およびＣｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，１９９５，Ａｕｓｕｂｅｌら監修，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ，セクション２．１０および６．３－６．４）によって示されており、そして例えばＤＮＡの長さおよび／または塩基組成に基づいて、一般の当業者によって容易に決定可能である。中程度にストリンジェントな条件を達成する１つの方法は、５ｘＳＳＣ、０．５％ ＳＤＳ、１．０ｍＭ ＥＤＴＡ（ｐＨ８．０）を含有する前洗浄溶液、約５０％ホルムアミド、６ｘＳＳＣのハイブリダイゼーション緩衝液、および約５５℃のハイブリダイゼーション温度（または約４２℃のハイブリダイゼーション温度を伴う、約５０％ホルムアミドを含有するものなどの他の類似のハイブリダイゼーション溶液）、並びに約６０℃、０．５ｘＳＳＣ、０．１％ ＳＤＳ中の洗浄条件の使用を伴う。一般的に、高ストリンジェントな条件は、上記のようなハイブリダイゼーション条件と定義されるが、およそ６８℃、０．２ｘＳＳＣ、０．１％ ＳＤＳでの洗浄を伴うと定義される。ハイブリダイゼーション緩衝液および洗浄緩衝液において、ＳＳＰＥ（１ｘＳＳＰＥは、０．１５Ｍ ＮａＣｌ、１０ｍＭ NaH_2PO_4、および１．２５ｍＭ ＥＤＴＡ、ｐＨ７．４である）をＳＳＣ（１ｘＳＳＣは、０．１５Ｍ ＮａＣｌおよび１５ｍＭクエン酸ナトリウムである）の代わりに使用することが可能であり；洗浄はハイブリダイゼーション完了後、１５分間行う。当業者に知られるように、そして以下にさらに記載するように、ハイブリダイゼーション反応および二重鎖安定性を支配する基本原理を適用することによって、所望の度合いのストリンジェンシーを達成するのに必要であるように、洗浄温度および洗浄塩濃度を調整可能であることを理解すべきである（例えばＳａｍｂｒｏｏｋら、１９８９を参照されたい）。核酸が、未知の配列の標的核酸にハイブリダイズする場合、ハイブリッド長は、ハイブリダイズする核酸のものと仮定される。既知の配列の核酸がハイブリダイズする場合、ハイブリッド長は、核酸の配列を並列し、そして最適配列相補性の単数または複数の領域を同定することによって、決定可能である。長さ５０塩基対未満であると予測されるハイブリッドのハイブリダイゼーション温度は、ハイブリッドの融解温度（Ｔｍ）より５～１０℃低くあるべきであり、Ｔｍは、以下の等式にしたがって決定される。長さ１８塩基対未満のハイブリッドに関しては、Ｔｍ（℃）＝２（Ａ＋Ｔ塩基数）＋４（Ｇ＋Ｃ塩基数）である。長さ１８塩基対を超えるハイブリッドに関しては、Ｔｍ（℃）＝８１．５＋１６．６（$\log_{10}$［Na^+］）＋０．４１（％Ｇ＋Ｃ）－（６００／Ｎ）であり、式中、Ｎはハイブリッド中の塩基数であり、そして［Na^+］はハイブリダイゼーション緩衝液中のナトリウムイオン濃度である（１ｘＳＳＣでは［Na^+］＝０．１６５Ｍ）。好ましくは、上により詳細に記載するように、こうしたハイブリダイズする核酸は各々、少なくとも１５ヌクレオチド（またはより好ましくは少なくとも１８ヌクレオチド、または少なくとも２０ヌクレオチド、または少なくとも２５ヌクレオチド、または少なくとも３０ヌクレオチド、または少なくとも４０ヌクレオチド、または最も好ましくは少なくとも５０ヌクレオチド）の長さを有するか、またはハイブリダイズする本発明の核酸の長さの少なくとも２５％（より好ましくは少なくとも５０％、または少なくとも６０％、または少なくとも７０％、そして最も好ましくは少なくとも８０％）の長さを有し、そして配列ギャップを最小にしつつ、重複および同一性が最大になるように並列させた際にハイブリダイズする核酸配列を比較することによって、配列同一性が決定される場合、ハイブリダイズする本発明の核酸と、少なくとも６０％（より好ましくは少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７．５％、または少なくとも９９％、そして最も好ましくは少なくとも９９．５％）の配列同一性を有する。

【００５８】

本発明はまた、本明細書に開示する核酸配列に対応する遺伝子も提供する。「対応する遺伝子」または「対応するゲノム核酸」は、転写されて、ｃＤＮＡ核酸配列が由来するｍＲＮＡを産生するゲノム領域であり、そしてこうした遺伝子の制御された発現に必要なゲノムの隣接領域を含むことが可能である。したがって、対応する遺伝子には、限定される

わけではないが、コード配列、５’および３’非翻訳領域、選択的スプライシングされるエクソン、イントロン、プロモーター、エンハンサー、およびサイレンサーまたはサプレッサー要素が含まれる可能性がある。対応するゲノム核酸には、本発明のサイトカインポリペプチドのコード配列の開始コドンに対応するゲノム配列の第一のヌクレオチドの上流のゲノム核酸配列の１００００塩基対（より好ましくは５０００塩基対、さらにより好ましくは２５００塩基対、そして最も好ましくは１０００塩基対）、および本発明のサイトカインポリペプチドのコード配列の終止コドンに対応するゲノム配列の最後のヌクレオチドの下流のゲノム核酸配列の１００００塩基対（より好ましくは５０００塩基対、さらにより好ましくは２５００塩基対、そして最も好ましくは１０００塩基対）が含まれることが可能である。対応する遺伝子またはゲノム核酸は、本明細書に開示する配列情報を用いて、既知の方法にしたがい、単離することが可能である。こうした方法には、適切なゲノムライブラリーまたはゲノム材料の他の供給源における、遺伝子の同定および／または増幅のための、開示される配列情報からのプローブまたはプライマーの調製が含まれる。「単離遺伝子」または「単離ゲノム核酸」は、ゲノム核酸を単離する生物のゲノムに存在する、隣接するゲノム配列から分離されているゲノム核酸である。

【００５９】

本発明のサイトカインポリペプチドを作成し、そして精製する方法

本発明のサイトカインポリペプチドを作成する方法を以下に記載する。本発明のポリペプチドおよび断片の発現、単離および精製は、限定されるわけではないが以下の方法を含む、いかなる適切な技術によって達成してもよい。本発明の単離核酸を、ｐＤＣ４０９ベクター（Ｇｉｒｉら，　１９９０，　ＥＭＢＯ　Ｊ．，　１３：２８２１）または誘導体ｐＤＣ４１２ベクター（Ｗｉｌｅｙら，　１９９５，　Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　３：６７３）などの発現調節配列に、機能可能であるように連結可能である。ｐＤＣ４００シリーズのベクターは、ＣＶ－１または２９３細胞などの一過性哺乳動物発現系に有用である。あるいは、本発明の単離核酸を、ｐＤＣ３１２、ｐＤＣ３１６、またはｐＤＣ３１７ベクターなどの発現ベクターに連結可能である。ｐＤＣ３００シリーズのベクターはすべて、ＳＶ４０複製起点、ＣＭＶプロモーター、アデノウイルス三分割（ｔｒｉｐａｒｔｉｔｅ）リーダー、およびＳＶ４０ポリＡおよび終結シグナルを含有し、そしてＣＨＯ細胞またはその誘導体などの安定哺乳動物発現系に有用である。ｐＭＴ２またはｐＥＤ発現ベクター（Ｋａｕｆｍａｎら，　１９９１，　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．　１９，　４４８５－４４９０；およびＰｏｕｗｅｌｓら，　１９８５，　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｖｅｃｔｏｒｓ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，　Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，　ニューヨーク）およびＧＡＴＥＷＡＹベクター（ｌｉｆｅｔｅｃｈ．ｃｏｍ／Ｃｏｎｔｅｎｔ／Ｔｅｃｈ－Ｏｎｌｉｎｅ／ｍｏｌｅｃｕｌａｒ＿ｂｉｏｌｏｇｙ／ｍａｎｕａｌｓ＿ｐｐｓ／１１７９７０１６．ｐｄｆ；Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ；メリーランド州ロックビル）などの他の発現調節配列およびクローニング技術もまた、ポリペプチドを組換え的に産生するのに使用可能である。ＧＥＴＥＷＡＹ系において、ａｔｔＰ配列を含有するｐＤＯＮＲ２０１などのＧＡＴＥＷＡＹベクターとのインテグラーゼ反応を通じて、ａｔｔＢ配列が隣接した本発明の単離核酸を組換え可能である。これは、本発明の単離核酸を含有するＧＡＴＥＷＡＹ系のエントリーベクターを提供する。このエントリーベクターは、上述のｐＤＣ４００およびｐＤＣ３００シリーズのものなどの、他の適切に調製した発現調節配列と、さらに組換え可能である。多くの適切な発現調節配列が当該技術分野に知られる。組換えポリペプチドを発現する一般的な方法もまた、Ｒ．　Ｋａｕｆｍａｎ，　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ　１８５，　５３７－５６６（１９９０）に記載される。本明細書において、「機能可能であるように連結した」は、本発明の核酸および発現調節配列が、構築物、ベクター、または細胞内で、適切な分子（例えばポリメラーゼ）が存在する場合、核酸にコードされるポリペプチドが発現されるような方式で、位置していることを意味する。本発明の１つの態様として、少なくとも１つの発現調節配列が、組換え宿主細胞またはその子孫において、本発明の核酸に、機能可能であるように連結しており、核酸および／または発現調節配列が、例えば形質転換またはトランスフェ

クションによって、あるいは他の適切な方法いずれかによって、宿主細胞に導入されている。本発明の別の態様として、少なくとも１つの発現調節配列が、本発明のポリペプチドをコードする核酸配列に、機能可能であるように連結しているように、組換え宿主細胞のゲノムに組み込まれる。本発明のさらなる態様において、少なくとも１つの発現調節配列が、ｉｎ ｖｉｔｒｏまたは組換え宿主細胞いずれかにおいて、転写因子などのトランス作用因子の作用を通じて、本発明の核酸に機能可能であるように連結される。

【００６０】

さらに、適切なシグナルペプチド（天然または異種）をコードする配列を、発現ベクターに取り込んでもよい。シグナルペプチドまたはリーダーの選択は、組換えポリペプチドを産生しようとする宿主細胞の種類などの要因に応じる可能性がある。例えば、哺乳動物宿主細胞で機能する、異種シグナルペプチドの例には、米国特許第４，９６５，１９５号に記載されるインターロイキン－７（ＩＬ－７）のシグナル配列；Ｃｏｓｍａｎら，Ｎａｔｕｒｅ ３１２：７６８（１９８４）に記載されるインターロイキン－２受容体のシグナル配列；ＥＰ ３６７，５６６に記載されるインターロイキン－４受容体シグナルペプチド；米国特許第４，９６８，６０７号に記載されるＩ型インターロイキン－１受容体シグナルペプチド；およびＥＰ ４６０，８４６に記載されるＩＩ型インターロイキン－１受容体シグナルペプチドが含まれる。シグナルペプチド（分泌リーダー）のＤＮＡ配列を、インフレームで本発明の核酸配列に融合させ、ＤＮＡがまず転写され、そしてｍＲＮＡがシグナルペプチドを含んでなる融合ポリペプチドに翻訳されるようにしてもよい。意図される宿主細胞で機能するシグナルペプチドは、細胞膜へのポリペプチドの挿入を促進し、そして最も好ましくは、その宿主細胞からのポリペプチドの細胞外分泌を促進する。シグナルペプチドは、好ましくは、ポリペプチドの膜への挿入、または細胞からのポリペプチドの分泌に際し、ポリペプチドから切断される。当業者はまた、シグナルペプチドが切断される、単数または複数の位は、コンピュータプログラムに予測されるものと異なる可能性があり、そして組換えポリペプチドを発現するのに使用する宿主細胞の種類などの要因にしたがって、多様である可能性があることも認識するであろう。ポリペプチド調製は、１より多い部位でのシグナルペプチドの切断から生じる、異なるＮ末端アミノ酸を有するポリペプチド分子の混合物を含む可能性がある。

【００６１】

哺乳動物細胞内にＤＮＡを導入するための確立された方法が、記載されている（Ｋａｕｆｍａｎ，Ｒ．Ｊ．，Ｌａｒｇｅ Ｓｃａｌｅ Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ，１９９０，ｐｐ．１５－６９）。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ脂質試薬（Ｇｉｂｃｏ／ＢＲＬ）またはＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ－Ｐｌｕｓ脂質試薬などの商業的に入手可能な試薬を用いた、さらなるプロトコルを用いて、細胞をトランスフェクションすることが可能である（Ｆｅｌｇｎｅｒら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８４：７４１３－７４１７，１９８７）。さらに、エレクトロポレーションを用い、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，第２版 Ｖｏｌ．１－３，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，１９８９）におけるもののような慣用法を用いて、哺乳動物細胞をトランスフェクションすることが可能である。安定形質転換体の選択は、例えば細胞傷害性薬剤に対する耐性など、当該技術分野に知られる方法を用いて、行うことが可能である。Ｋａｕｆｍａｎら，Ｍｅｔｈ．ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ １８５：４８７－５１１，１９９０は、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）耐性などのいくつかの選択計画を記載する。ＤＨＦＲ選択に適した株は、ＤＨＦＲ不全であるＣＨＯ株ＤＸ－Ｂ１１である（ＵｒｌａｕｂおよびＣｈａｓｉｎ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７７：４２１６－４２２０，１９８０）。ＤＨＦＲ ｃＤＮＡを発現しているプラスミドを株ＤＸ－Ｂ１１に導入することが可能であり、そしてプラスミドを含有する細胞のみが適切な選択培地中で増殖可能である。発現ベクターに組込み可能な選択可能マーカーの他の例には、Ｇ４１８およびハイグロマイシンＢなどの、抗生物質に対する耐性を与えるｃＤＮＡが含まれる。該ベク

ターを宿する細胞を、これらの化合物に対する耐性に基づいて選択可能である。

【００６２】

あるいは、本発明のサイトカイン遺伝子産物は、相同組換え、または「遺伝子ターゲティング」技術を介して、得ることが可能である。こうした技術は、ゲノム上の特定のあらかじめ決定した部位において、外因性転写調節要素（ＣＭＶプロモーター等）の導入を使用して、目的の内因性核酸配列の発現を誘導する（例えば米国特許第５，２７２，０７１号を参照されたい）。宿主染色体またはゲノムへの組込み位置は、遺伝子の既知の位置および配列がわかっていれば、当業者によって容易に決定可能である。好ましい態様において、本発明は、増幅可能遺伝子と組み合わせた外因性転写調節要素を導入して、宿主細胞から遺伝子配列自体を単離する必要なしに、増加した量の遺伝子産物を産生することもまた意図する。

【００６３】

いくつかの細胞種が、ポリペプチドの発現に適した宿主細胞として作用することが可能である。哺乳動物宿主細胞には、例えば、サル腎臓細胞のＣＯＳ－７株（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１６５１）（Ｇｌｕｚｍａｎら，　Ｃｅｌｌ　２３：１７５，　１９８１）、Ｌ細胞、Ｃ１２７細胞、３Ｔ３細胞（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　１６３）、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞または血清不癌培地上で増殖するＶｅｇｇｉｅ　ＣＨＯおよび関連細胞株などの誘導体（Ｒａｓｍｕｓｓｅｎら，　１９９８，　Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２８：　３１）、ＨｅＬａ細胞、ＢＨＫ（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１０）細胞株、アフリカミドリザル（Ａｆｒｉｃａｎ　ｇｒｅｅｎ　ｍｏｎｋｅｙ）腎臓細胞株ＣＶ１（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　７０）由来であるＣＶ１／ＥＢＮＡ細胞株（ＭｃＭａｈａｎら，　ＥＭＢＯ　Ｊ．　１０：２８２１，　１９９１）、２９３、２９３　ＥＢＮＡまたはＭＳＲ　２９３などのヒト胚性腎臓細胞、ヒト上皮Ａ４３１細胞、ヒトＣｏｌｏ２０５細胞、他の形質転換霊長類細胞株、正常二倍体細胞、初代組織のｉｎ　ｖｉｔｒｏ培養由来の細胞株、初代外植片、ＨＬ－６０、Ｕ９３７、ＨａＫまたはＪｕｒｋａｔ細胞が含まれる。多様なシグナル伝達またはレポーターアッセイにおいてポリペプチドを使用することが望ましいならば、所望により、例えば、ＨｅｐＧ２／３Ｂ、ＫＢ、ＮＩＨ３Ｔ３またはＳ４９などの哺乳動物細胞株を、ポリペプチドの発現に使用可能である。あるいは、酵母などのより低次の真核生物において、または細菌などの原核生物において、ポリペプチドを産生可能である。適切な酵母には、サッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）、シゾサッカロミセス・ポンベ（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｐｏｍｂｅ）、クロイベロミセス属（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ）株、カンジダ属（Ｃａｎｄｉｄａ）、または異種ポリペプチドを発現可能ないかなる酵母株も含まれる。適切な細菌株には、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）、枯草菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ）、ネズミチフス菌（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ）、または異種ポリペプチドを発現可能ないかなる細菌株も含まれる。ポリペプチドを酵母または細菌で作成する場合、機能するポリペプチドを得るため、そこで産生されるポリペプチドを、例えば適切な部位でのリン酸化またはグリコシル化によって、修飾することが望ましい可能性がある。こうした共有結合は、既知の化学的または酵素的方法を用いて、達成可能である。ポリペプチドはまた、本発明の単離核酸を、１以上の昆虫発現ベクターの適切な調節配列に、機能可能であるように連結し、そして昆虫発現系を使用することによって、産生することも可能である。バキュロウイルス／昆虫細胞発現系の材料および方法は、例えばＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、米国カリフォルニア州サンディエゴからキットの形で（ＭａｘＢａｃ（登録商標）キット）商業的に入手可能であるし、そしてこうした方法は、ＳｕｍｍｅｒｓおよびＳｍｉｔｈ，　Ｔｅｘａｓ　Ａｇｒｉｃｕｌｔｕｒａｌ　Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔ　Ｓｔａｔｉｏｎ　Ｂｕｌｌｅｔｉｎ　Ｎｏ．１５５５（１９８７）、並びにＬｕｃｋｏｗおよびＳｕｍｍｅｒｓ，　Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　６：４７（１９８８）に記載されるように周知である。細胞不含翻訳系もまた、本明細書に開示する核酸構築物由来のＲＮＡを用いて、ポリペプチドを産生するのに使用可能である。好ましくは、少なくとも１つの発現調節配列に機能可能であるように連結して

いる、本発明の単離核酸を含んでなる宿主細胞は、「組換え宿主細胞」である。

【００６４】

本発明のポリペプチドは、組換えポリペプチド発現に適した培養条件下で、形質転換宿主細胞を培養することによって、調製可能である。生じた発現ポリペプチドを次いで、多様な塩での選択的沈殿、ゲルろ過およびイオン交換クロマトグラフィーなどの、既知の精製法を用いて、こうした培養（すなわち培地または細胞抽出物）から精製することが可能である。ポリペプチドの精製はまた、ポリペプチドに結合するであろう剤を含有するアフィニティーカラム；コンカナバリンＡ－アガロース、ヘパリン－ｔｏｙｏｐｅａｒｌ（登録商標）またはＣｉｂａｃｒｏｍブルー３ＧＡセファロース（登録商標）のようなアフィニティー樹脂上の１以上のカラム工程；フェニルエーテル、ブチルエーテル、またはプロピルエーテルのような樹脂を用いた疎水性相互作用クロマトグラフィーを伴う１以上の工程；あるいは本発明のサイトカインポリペプチドの１以上のエピトープに特異的に結合する抗体を用いた免疫アフィニティークロマトグラフィーも含むことが可能である。あるいは、本発明のポリペプチドはまた、精製を容易にするであろう型で発現することも可能である。例えば、融合ポリペプチドとして発現することが可能であり、すなわち、マルトース結合ポリペプチド（ＭＢＰ）、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、チオレドキシン（ＴＲＸ）、ポリＨｉｓペプチド、および／またはその断片と融合させることが可能である。こうした融合ポリペプチドの発現および精製のためのキットは、それぞれ、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ（マサチューセッツ州ビバリー）、Ｐｈａｒｍａｃｉａ（ニュージャージー州ピスカタウェイ）およびＩｎＶｉｔｒｏｇｅｎから、商業的に入手可能である。ポリペプチドはまた、エピトープでタグ付けして、そして続いて、こうしたエピトープに対して向けられる特異的抗体を用いることによって、精製することも可能である。１つのこうしたエピトープ（「Ｆｌａｇ（登録商標）」）は、Ｋｏｄａｋ（コネティカット州ニューヘブン）から商業的に入手可能である。最後に、疎水性逆相高性能液体クロマトグラフィー（ＲＰ－ＨＰＬＣ）媒体、例えばペンダントメチルまたは他の脂肪族基を有するシリカゲルを使用する、１以上のＲＰ－ＨＰＬＣ工程を使用して、ポリペプチドをさらに精製することが可能である。多様な組み合わせの前述の精製工程のいくつかまたはすべてを使用して、実質的に均一な単離組換えポリペプチドを提供することもまた可能である。こうして精製したポリペプチドは、他の哺乳動物ポリペプチドを実質的に含まず、そして本発明にしたがって、「単離ポリペプチド」と定義される；本発明のこうした単離ポリペプチドには、本発明のサイトカインポリペプチドに結合する単離抗体、断片、変異体、結合パートナー等が含まれる。本発明のポリペプチドはまた、該ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含有する体細胞または生殖細胞によって特徴付けられる、トランスジェニック動物の産物として、例えば、トランスジェニックウシ、ヤギ、ブタ、またはヒツジのミルクの成分として、発現することも可能である。

【００６５】

本発明のポリペプチドに対して生成したモノクローナル抗体などの、本発明のポリペプチドの結合ポリペプチドを含んでなるアフィニティーカラムを利用して、発現したポリペプチドをアフィニティー精製することもまた、可能である。これらのポリペプチドは、慣用的な技術を用いて、例えば利用するアフィニティーマトリックスに応じて、高塩溶出緩衝液中で、そしてその後、使用のため、より低塩の緩衝液中に透析することによって、またはｐＨもしくは他の成分を変化させることによって、アフィニティーカラムからはずす（ｒｅｍｏｖｅ）ことが可能であるし、あるいは本発明から得られるポリペプチドなどの、アフィニティー部分の天然存在基質を用いて、競合的にはずすことが可能である。本発明のこの側面において、本発明の抗ポリペプチド抗体、または本発明のポリペプチドと相互作用可能な他のポリペプチドなどの、ポリペプチド結合ポリペプチドは、その表面上に本発明のポリペプチドを発現する細胞を同定するか、分離するかまたは精製するのに適した、カラムクロマトグラフィーマトリックスなどの固相支持体または類似の支持体に結合させることが可能である。固相接触表面への本発明のポリペプチド結合ポリペプチドの付着は、いかなる手段によって達成してもよく、例えば、磁気微小球体を、これらのポリペ

プチド結合ポリペプチドでコーティングし、そして磁場を通じてインキュベーション容器中に保持してもよい。細胞混合物の懸濁物を、こうしたポリペプチド結合ポリペプチドを有する固相と接触させる。表面上に本発明のポリペプチドを有する細胞は、固定ポリペプチド結合ポリペプチドに結合し、そしてその後、未結合細胞は洗い流される。このアフィニティー結合法は、溶液から、こうしたポリペプチド発現細胞を精製するか、スクリーニングするか、または分離するのに有用である。陽性に選択された細胞を固相から遊離させる方法は、当該技術分野に知られ、そして例えば、酵素の使用を含む。こうした酵素は、好ましくは細胞に対し非毒性および非傷害性であり、そして好ましくは細胞表面結合パートナーを切断するよう指示される。あるいは、本発明のポリペプチド発現細胞を含有すると推測される細胞混合物を、まず、ビオチン化した本発明のポリペプチド結合ポリペプチドとインキュベーションすることが可能である。その後、アビジンでコーティングしたビーズを充填したカラムに、生じた混合物を通過させ、それによりアビジンに対するビオチンの高い親和性によって、ポリペプチドが結合した細胞がビーズに結合する。アビジンでコーティングしたビーズの使用は当該技術分野に知られる。Ｂｅｒｅｎｓｏｎら，　Ｊ．Ｃｅｌｌ．　Ｂｉｏｃｈｅｍ．，　１０Ｄ：２３９（１９８６）を参照されたい。未結合物質の洗浄および結合細胞の遊離は慣用法を用いて行う。

【００６６】

ポリペプチドはまた、既知の慣用的な化学合成によっても産生可能である。合成手段によって、本発明のポリペプチドを構築する方法は当業者に知られる。合成によって構築されたポリペプチド配列は、本発明のサイトカインポリペプチドと一次、二次または三次構造および／またはコンホメーション特性を共有するため、サイトカインポリペプチド活性を含め、本発明のサイトカインポリペプチドと共通の生物学的特性を所持する可能性がある。したがって、これらは、療法化合物のスクリーニングにおいて、そして抗体発展のための免疫学的方法において、天然の精製ポリペプチドの生物学的に活性である置換体または免疫学的な置換体として、使用可能である。

【００６７】

所望の純度は、ポリペプチドの意図される使用に応じる。例えば、ポリペプチドをｉｎｖｉｖｏで投与しようとするとき、比較的高い純度が望ましい。こうした場合、ポリペプチドは、ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）による解析に際し、他のポリペプチドに相当するポリペプチドバンドが検出不能であるように精製される。当業者は、異なるグリコシル化、異なる翻訳後プロセシング等のため、該ポリペプチドに相当する多数のバンドがＳＤＳ－ＰＡＧＥによって視覚化される可能性があることを認識するであろう。最も好ましくは、本発明のポリペプチドは、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによる解析の際、単一のポリペプチドバンドによって示されるように、実質的に均一に精製される。ポリペプチドバンドは、銀染色、クーマシーブルー染色によって、または（ポリペプチドが放射標識されている場合）オートラジオグラフィーによって、視覚化可能である。

【００６８】

本発明のサイトカインポリペプチドのアンタゴニストおよびアゴニスト

本発明のサイトカインポリペプチドを中和するか、または本発明のサイトカインポリペプチドをコードする遺伝子の発現（転写または翻訳いずれか）を阻害する方法いずれかを用いて、本発明のサイトカインポリペプチドの生物学的活性を減少させることが可能である。特定の態様において、アンタゴニストは、細胞への少なくとも１つの本発明のサイトカインポリペプチドの結合を阻害し、それによって、細胞へのこうした本発明のサイトカインポリペプチドの結合によって誘導される生物学的活性を阻害する。本発明の特定の他の態様において、アンタゴニストを設計して、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の内因性発現のレベルを減少させることが可能であり、例えばこうしたサイトカインｍＲＮＡ転写物の翻訳を阻害するかまたは妨げる、周知のアンチセンスまたはリボザイムアプローチ；こうしたサイトカイン遺伝子の転写を阻害する三重ヘリックスアプローチ；あるいは、前記サイトカイン遺伝子またはその内因性プロモーターもしくはエンハンサー要素を不活性化するかまたは「ノックアウト」する、標的化相同組換えを用いる。こうしたア

ンチセンス、リボザイム、および三重ヘリックスアンタゴニストを設計して、損なわれたサイトカイン遺伝子活性、または適切な場合、突然変異体サイトカイン遺伝子活性いずれかを減少させるかまたは阻害することが可能である。本発明のポリペプチド活性のペプチドアゴニストおよびアンタゴニストもまた、同定し、そして利用することが可能である（例えば本明細書に援用されるＷＯ　００／２４７８２およびＷＯ　０１／８３５２５を参照されたい）。こうした分子を産生し、そして使用する技術は、当業者に周知である。

【００６９】

アンチセンスＲＮＡおよびＤＮＡ分子は、標的とするｍＲＮＡにハイブリダイズし、そしてポリペプチド翻訳を妨げることによって、ｍＲＮＡの翻訳を直接遮断するよう作用する。アンチセンスアプローチは、本発明のサイトカインポリペプチドに対応するｍＲＮＡに相補的なオリゴヌクレオチド（ＤＮＡまたはＲＮＡいずれか）の設計を伴う。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、相補的標的遺伝子ｍＲＮＡ転写物に結合し、そして翻訳を妨げるであろう。絶対の相補性は、好ましいが、必要ではない。本明細書に称するような、核酸の部分に「相補的な」配列は、核酸とハイブリダイズし、安定な二重鎖（または適切な場合、三重鎖）を形成することが可能であるのに十分な相補性を有する配列を意味する。したがって、二本鎖アンチセンス核酸の場合、二重鎖ＤＮＡの一本鎖を試験してもよいし、または三重鎖形成をアッセイしてもよい。ハイブリダイズする能力は、アンチセンス核酸の相補性の度合いおよび長さ両方に応じるであろう。好ましいオリゴヌクレオチドは、メッセージの５’端、例えば、ＡＵＧ開始コドンまでおよび該開始コドンを含む、５’非翻訳配列に相補的である。しかし、サイトカイン遺伝子転写物の５’または３’非翻訳、非コード領域、あるいはコード領域に相補的なオリゴヌクレオチドをアンチセンスアプローチで使用して、本発明のサイトカインポリペプチドをコードする内因性ｍＲＮＡの翻訳を阻害することが可能である。アンチセンス核酸は、少なくとも長さ６ヌクレオチドでなければならず、そして好ましくは、長さ６～約５０ヌクレオチドの範囲のオリゴヌクレオチドである。特定の側面において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも１０ヌクレオチド、少なくとも１７ヌクレオチド、少なくとも２５ヌクレオチドまたは少なくとも５０ヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖のＤＮＡまたはＲＮＡまたはキメラ混合物またはその誘導体または修飾型であってもよい。本発明のキメラオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、または混合オリゴヌクレオチド／オリゴヌクレオシドは、いくつかの異なる種類であることが可能である。これらには、ヌクレオチドの「ギャップ」セグメントが連結ヌクレオシドの５’および３’「ウィング」セグメントの間に位置する第一の種類、並びに「ギャップ」セグメントがオリゴマー化合物の３’または５’末端いずれかに位置する第二の「オープン端」型が含まれる（例えば米国特許第５，９８５，６６４号を参照されたい）。第一の種類のオリゴヌクレオチドはまた、当該技術分野において、「ギャップマー」またはギャップ化オリゴヌクレオチドとしても知られる。第二の種類のオリゴヌクレオチドはまた、当該技術分野において、「ヘミマー」または「ウィングマー」としても知られる。オリゴヌクレオチドは、塩基部分、糖部分、またはリン酸主鎖で修飾して、例えば分子の安定性、ハイブリダイゼーション等を改善することが可能である。オリゴヌクレオチドは、ペプチド（例えば宿主細胞受容体をｉｎ　ｖｉｖｏで標的とするため）、または細胞膜を横切る輸送を促進する剤（例えばＬｅｔｓｉｎｇｅｒら，１９８９，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ．Ｓ．Ａ．８６：６５５３－６５５６；Ｌｅｍａｉｔｒｅら，１９８７，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ８４：６４８－６５２；ＰＣＴ公報第ＷＯ８８／０９８１０号を参照されたい）、あるいはハイブリダイゼーション誘発切断剤または挿入剤（ｉｎｔｅｒｃａｌａｔｉｎｇ ａｇｅｎｔ）（例えばＺｏｎ，１９８８，Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．５：５３９－５４９を参照されたい）などの他の付随する基を含んでもよい。アンチセンス分子は、サイトカイン転写物をｉｎ　ｖｉｖｏで発現する細胞に搬送しなければならない。アンチセンスＤＮＡまたはＲＮＡを細胞に搬送するために、いくつかの方法が開発されてきている；例えば、アンチセンス分子を、組織または細胞由来部位に直接注入してもよいし、または所望の細胞を標的とするよう設計された、修飾アンチセンス分子（例えば標的細胞

表面上に発現される受容体または抗原に特異的に結合するペプチドまたは抗体に連結したアンチセンス）を、全身投与してもよい。しかし、内因性ｍＲＮＡの翻訳を抑制するのに十分なアンチセンス細胞内濃度を達成するのは、しばしば困難である。したがって、好ましいアプローチは、アンチセンスオリゴヌクレオチドが強いｐｏｌＩＩＩまたはｐｏｌＩＩプロモーターの調節下に置かれる組換えＤＮＡ構築物を利用する。患者において、標的細胞をトランスフェクションするための、こうした構築物の使用は、内因性サイトカイン遺伝子転写物と相補的塩基対を形成して、そしてそれによって、サイトカインｍＲＮＡの翻訳を妨げる一本鎖ＲＮＡの十分な量の転写を生じるであろう。例えば、ベクターが細胞に取り込まれ、そしてアンチセンスＲＮＡの転写を指示するように、ベクターをｉｎ ｖｉｖｏで導入することが可能である。こうしたベクターは、転写され、所望のアンチセンスＲＮＡを産生することが可能でありさえすれば、エピソームにとどまっても、または染色体に組み込まれてもよい。こうしたベクターは、当該技術分野で標準的な組換えＤＮＡ技術法によって、構築することが可能である。ベクターは、哺乳動物細胞における複製および発現で用いられる、プラスミド、ウイルス、または当該技術分野に知られる他のものであってもよい。

【００７０】

サイトカインｍＲＮＡ転写物を触媒的に切断するよう設計されたリボザイム分子もまた、ｍＲＮＡの翻訳および本発明のサイトカインポリペプチドの発現を防止するのに使用可能である（例えば、ＰＣＴ国際公報ＷＯ９０／１１３６４および米国特許第５，８２４，５１９号を参照されたい）。本発明で使用可能なリボザイムには、ハンマーヘッドリボザイム（ＨａｓｅｌｏｆｆおよびＧｅｒｌａｃｈ，１９８８，Ｎａｔｕｒｅ，３３４：５８５－５９１）、テトラヒメナ・サーモフィラ（Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ Ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌａ）に天然に存在し（ＩＶＳ、またはＬ－１９ ＩＶＳ ＲＮＡとして知られる）、そしてＴｈｏｍａｓ Ｃｅｃｈおよび共同研究者らに詳細に記載されている（国際特許出願第ＷＯ ８８／０４３００号；ＢｅｅｎおよびＣｅｃｈ，１９８６，Ｃｅｌｌ，４７：２０７－２１６）ものなどのＲＮＡエンドリボヌクレアーゼ（以後、「Ｃｅｃｈ型リボザイム」）が含まれる。アンチセンスアプローチにおけるように、リボザイムは、修飾オリゴヌクレオチドで構成されていてもよく（例えば改善された安定性、標的化などのため）、そしてｉｎ ｖｉｖｏでサイトカインポリペプチドを発現する細胞に搬送しなければならない。搬送の好ましい方法は、トランスフェクションされた細胞が、十分な量のリボザイムを産生し、本発明のサイトカインポリペプチドをコードする内因性メッセージを破壊し、そしてこうしたポリペプチドの翻訳を阻害するであろうように、強い恒常的ｐｏｌＩＩＩまたはｐｏｌＩＩプロモーターの調節下にあるリボザイム「コード」ＤＮＡ構築物を用いることを伴う。リボザイムは、アンチセンス分子と異なり、触媒性であるため、有効であるために、より低い細胞内濃度しか必要とされない。

【００７１】

あるいは、標的遺伝子の制御領域（すなわち標的遺伝子プロモーターおよび／またはエンハンサー）に相補的なデオキシリボヌクレオチド配列を標的として、標的ＩＭＸ７１８９サイトカイン遺伝子の転写を妨げる三重ヘリックス構造を形成することによって、本発明のサイトカインの内因性遺伝子発現を減少させることが可能である（一般的には、Ｈｅｌｅｎｅ，１９９１，Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓ．６（６），５６９－５８４；Ｈｅｌｅｎｅら，１９９２，Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，６６０，２７－３６；およびＭａｈｅｒ，１９９２，Ｂｉｏａｓｓａｙｓ １４（１２），８０７－８１５を参照されたい）。

【００７２】

本発明のアンチセンスＲＮＡおよびＤＮＡ、リボザイム、並びに三重ヘリックス分子は、ＤＮＡおよびＲＮＡ分子合成のための、当該技術分野に知られる方法いずれかによって、調製可能である。これらには、例えば固相ホスホロアミダイト化学合成などの、当該技術分野に周知の、オリゴデオキシリボヌクレオチドおよびオリゴリボヌクレオチドを化学的に合成する技術が含まれる。オリゴヌクレオチドは、当該技術分野に知られる標準法に

よって、例えば自動化ＤＮＡ合成装置（Ｂｉｏｓｅａｒｃｈ、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓなどから商業的に入手可能なものなど）の使用によって、合成可能である。例えば、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは、Ｓｔｅｉｎら，１９８８，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１６：３２０９の方法によって、合成可能である。メチルホスホネートオリゴヌクレオチドは、制御孔ガラスポリマー支持体（Ｓａｒｉｎら，１９８８，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８５：７４４８－７４５１）の使用によって、調製可能である。あるいは、ＲＮＡ分子は、アンチセンスＲＮＡ分子をコードするＤＮＡ配列のｉｎ ｖｉｔｒｏおよびｉｎ ｖｉｖｏ転写によって、生成可能である。こうしたＤＮＡ配列は、Ｔ７またはＳＰ６ポリメラーゼプロモーターなどの適切なＲＮＡポリメラーゼプロモーターを取り込んだ、非常に多様なベクターに取り込むことが可能である。あるいは、用いるプロモーターに応じて、恒常的にまたは誘導性に、アンチセンスＲＮＡを合成する、アンチセンスｃＤＮＡ構築物を、細胞株に安定して導入することが可能である。

【００７３】

内因性標的遺伝子発現はまた、標的化相同組換えを用いて、標的遺伝子またはそのプロモーターを不活性化するかまたは「ノックアウト」することによって、減少させることも可能である（例えばＳｍｉｔｈｉｅｓら，１９８５，Ｎａｔｕｒｅ ３１７，２３０－２３４；ＴｈｏｍａｓおよびＣａｐｅｃｃｈｉ，１９８７，Ｃｅｌｌ ５１，５０３－５１２；Ｔｈｏｍｐｓｏｎら，１９８９，Ｃｅｌｌ ５，３１３－３２１を参照されたい）。例えば、内因性標的遺伝子（標的遺伝子のコード領域または制御領域いずれか）に相同なＤＮＡが隣接する、突然変異体非機能標的遺伝子（または完全に無関係なＤＮＡ配列）を、選択可能マーカーおよび／または陰性選択可能マーカーを伴い、または伴わずに用いて、標的遺伝子をｉｎ ｖｉｖｏで発現する細胞をトランスフェクションすることが可能である。標的化相同組換えを介した、ＤＮＡ構築物の挿入は、標的遺伝子の不活性化を生じる。こうしたアプローチは、ＥＳ（胚性幹）細胞への修飾を用いて、不活性な標的遺伝子を持つ動物子孫を生成することが可能な場合の農業分野において（例えばＴｈｏｍａｓおよびＣａｐｅｃｃｈｉ、１９８７、並びにＴｈｏｍｐｓｏｎ、１９８９、上記を参照されたい）、または「ＲＮＡ干渉」（「ＲＮＡｉ」）技術（Ｇｒｉｓｈｏｋ，Ｔａｂａｒａ，およびＭｅｌｌｏ，２０００，Ｇｅｎｅｔｉｃ ｒｅｑｕｉｒｅｍｅｎｔｓ ｆｏｒ ｉｎｈｅｒｉｔａｎｃｅ ｏｆ ＲＮＡｉ ｉｎ Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８７（５４６２）：２４９４－２４９７）、または導入遺伝子の導入（Ｄｅｒｎｂｕｒｇら，２０００，Ｔｒａｎｓｇｅｎｅ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ｃｏｓｕｐｐｒｅｓｓｉｏｎ ｉｎ ｔｈｅ Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ ｇｅｒｍ ｌｉｎｅ，Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．１４（１３）：１５７８－１５８３）を用いて、特定の標的遺伝子の発現を阻害する、線虫などのモデル生物において、特に適している。このアプローチは、組換えＤＮＡ構築物が、直接投与されるか、またはウイルスベクターなどの適切なベクターを用いて、ｉｎ ｖｉｖｏで必要な部位を標的とするのであれば、ヒトで使用するために、適応させることが可能である。

【００７４】

本明細書に開示する核酸配列に対応する遺伝子（類）の、増進した、減少した、または修飾された発現を有する生物を提供する。遺伝子発現の所望の変化は、該遺伝子から転写されるｍＲＮＡに結合し、そして／または該ｍＲＮＡを切断する、アンチセンス核酸またはリボザイムの使用を通じて達成することが可能である（ＡｌｂｅｒｔおよびＭｏｒｒｉｓ，１９９４，Ｔｒｅｎｄｓ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｓｃｉ．１５（７）：２５０－２５４；Ｌａｖａｒｏｓｋｙら，１９９７，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．６２（１）：１１－２２；およびＨａｍｐｅｌ，１９９８，Ｐｒｏｇ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．５８：１－３９）。好ましくは、形質転換細胞およびその子孫内に安定して維持される遺伝子構築物で、細胞を形質転換することによって産生される、本明細書に開示する核酸配列に対応する遺伝子（類）を多コピー有するトランスジェニック動物を提供する。遺伝子発現レベルを増加させるかま

たは減少させる、あるいは遺伝子発現の時間的または空間的パターンを変化させる、修飾遺伝子調節領域を有する、トランスジェニック動物もまた、提供する（欧州特許第０　６４９　４６４　Ｂ１を参照されたい）。さらに、本明細書に開示する核酸配列に対応する遺伝子（類）が、対応する遺伝子（類）への外来性配列の挿入を通じて、あるいは対応する遺伝子（類）のすべてまたは一部の欠失を通じて、部分的にまたは完全に不活性化されている、生物を提供する。部分的または完全遺伝子不活性化は、転位因子の挿入、好ましくは、その後の不正確な切除を通じて達成する（Ｐｌａｓｔｅｒｋ，　１９９２，　Ｂｉｏｅｓｓａｙｓ　１４（９）：６２９－６３３；Ｚｗａａｌら，　１９９３，　Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ　９０（１６）：７４３１－７４３５；Ｃｌａｒｋら，　１９９４，　Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ　９１（２）：７１９－７２２）か、あるいは相同組換えを通じて達成し、好ましくは、陽性／陰性遺伝子選択戦略によって検出することが可能である（Ｍａｎｓｏｕｒら，　１９８８，　Ｎａｔｕｒｅ　３３６：３４８－３５２；米国特許第５，４６４，７６４号；第５，４８７，９９２号；第５，６２７，０５９号；第５，６３１，１５３号；第５，６１４，３９６号；第５，６１６，４９１号；および第５，６７９，５２３号）。改変された遺伝子発現を持つ、これらの生物は、好ましくは真核生物であり、そしてより好ましくは哺乳動物である。こうした生物は、対応する遺伝子（類）に関与する障害の研究のための非ヒトモデルの開発に、そして対応する遺伝子（類）のポリペプチド産物（類）と相互作用する分子の同定のためのアッセイ系の開発に、有用である。

【００７５】

本発明にやはり含まれるのは、（１）サイトカイン変異体が、なおそのパートナー（類）に結合するが、改変された結合部位に特定の小分子が収まり、そしてその相互作用を遮断するであろうように、または（２）特定の小分子が存在しない限り、サイトカイン変異体がもはやそのパートナー（類）に結合しないであろうように、コンホメーションが改変されている、パートナー結合部位を持つ、本発明のサイトカインポリペプチドの変異体である（例えばＢｉｓｈｏｐら，　２０００，　Ｎａｔｕｒｅ　４０７：３９５－４０１を参照されたい）。本発明のこうした改変サイトカインポリペプチドをコードする核酸を、本明細書に記載する方法にしたがって、生物に導入して、そして対応するサイトカインポリペプチドをコードする内因性核酸配列を交換することが可能である。こうした方法は、生物に、全身または局所方式で、小分子化合物を投与することによって、本発明の特定のサイトカインポリペプチドとその結合パートナーとの相互作用が制御されるのを可能にする。

【００７６】

本発明のサイトカインポリペプチド自体はまた、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏ法で、本発明のサイトカインの生物学的活性を阻害するのにも使用可能である。本発明に含まれるのは、断片として、または融合ポリペプチドの成分として発現した際、天然サイトカインポリペプチド機能の「優性ネガティブ」阻害剤として作用する、本発明のサイトカインポリペプチドの突然変異領域である。例えば、本発明の改変ポリペプチド領域を用いて、内因性結合パートナーへの本発明のサイトカインポリペプチドの結合を阻害することが可能である。こうした使用は、効果的にサイトカインポリペプチド相互作用を遮断し、そしてサイトカインポリペプチド活性を阻害するであろう。さらに、本発明のサイトカインポリペプチドと結合する抗体は、しばしば、サイトカインポリペプチド活性を阻害し、そしてアンタゴニストとして作用する。例えば、本発明のサイトカインポリペプチドの１以上のエピトープ、または本発明のサイトカインポリペプチドの保存変異体のエピトープ、または本発明のサイトカインポリペプチドのペプチド断片を特異的に認識する抗体を、本発明において用いて、サイトカインポリペプチド活性を阻害可能である。こうした抗体には、限定されるわけではないが、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（ｍＡＢ）、ヒト化またはキメラ抗体、一本鎖抗体、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ’）２断片、Ｆａｂ発現ライブラリーに産生される断片、抗イディオタイプ（抗Ｉｄ）抗体、および上記いずれかのエピトープ結合断片が含まれる。あるいは、本発明の精製および修飾サイトカイン

ポリペプチドを投与して、本発明のサイトカインポリペプチドおよび膜結合でないサイトカイン結合パートナー間の相互作用を調節可能である。こうしたアプローチは、サイトカインが影響を及ぼす生理活性の修飾の代替法を可能にするであろう。

【００７７】

別の側面において、本発明は、本発明のサイトカインポリペプチド活性の増加が有益である疾患の症状を治療するかまたは改良するための、本発明のサイトカインポリペプチド活性のアゴニストの使用をさらに含む。好ましい側面において、本発明は、本発明のサイトカイン核酸またはサイトカインポリペプチドを含んでなる組成物を、ｉｎ ｖｉｔｒｏの細胞、ｅｘ ｖｉｖｏの細胞、ｉｎ ｖｉｖｏの細胞、および／または脊椎動物または哺乳動物などの多細胞生物に投与することを含む。本発明のサイトカインの好ましい療法型は、上述のように可溶性型である。本発明のさらに別の側面において、組成物は、疾患を治療する宿主生物において、本発明のサイトカインポリペプチドを発現するためのサイトカイン・コード核酸を投与することを含んでなる。これに関して特に好ましいのは、本発明のサイトカインポリペプチドの異常な（例えば減少した）内因性活性と関連する機能不全の治療のためのヒト患者における発現である。さらに、本発明は、本発明のサイトカインポリペプチド内因性活性を増加させることが見出された化合物の細胞および／または生物への投与を含む。サイトカインポリペプチド活性を増加させる化合物の一例は、アゴニスト性抗体、好ましくはモノクローナル抗体であって、本発明のサイトカインポリペプチドまたは結合パートナーに結合し、恒常的細胞内シグナル伝達（または「リガンド模倣」）を引き起こすことによって、または本発明のサイトカインポリペプチドの活性の天然阻害剤の結合を防止することによって、本発明のサイトカインポリペプチドの活性を増加させうる、前記抗体である。

【００７８】

療法剤開発への別のアプローチは、ペプチドライブラリースクリーニングである。タンパク質リガンドとその受容体の相互作用は、しばしば、比較的広い干渉面で起こる。しかし、ヒト成長ホルモンおよびその受容体に関して立証されるように、干渉の２、３の重要な残基のみが、大部分の結合エネルギーに寄与する（Ｃｌａｃｋｓｏｎら，　１９９５，　Ｓｃｉｅｎｃｅ　２６７：３８３－３８６）。タンパク質リガンドの大部分は、正しいトポロジーで結合エピトープを提示するのみであるか、または結合に関係しない機能を提供する。したがって、「ペプチド」長（２～９０アミノ酸）でしかない分子が、受容体タンパク質または本発明のポリペプチドなどの大きいタンパク質リガンドでさえありうるタンパク質の結合パートナーに結合可能である。こうしたペプチドは、巨大タンパク質リガンドの生理活性を模倣可能である（「ペプチドアゴニスト」）し、または、競合的結合を通じて、巨大タンパク質リガンドの生理活性を阻害可能である（「ペプチドアンタゴニスト」）。本発明のポリペプチドの典型的なペプチドアゴニストおよびアンタゴニストは、天然存在分子のドメインを含んでなることが可能であるし、またはランダム化配列を含んでなることが可能である。ペプチド配列を指すのに用いる用語「ランダム化」は、完全にランダムな配列（例えばファージディスプレー法またはＲＮＡ－ペプチドスクリーニングによって選択されるもの）および天然存在分子の１以上の残基が、天然存在分子のその位で現れないアミノ酸残基と交換されている配列を指す。ファージディスプレーペプチドライブラリーは、こうしたペプチドアゴニストおよびアンタゴニストを同定する強力な方法として現れてきた。例えば、Ｓｃｏｔｔら，　１９９０，　Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４９：３８６；Ｄｅｖｌｉｎら，　１９９０，　Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４９：４０４；米国特許第５，２２３，４０９号；米国特許第５，７３３，７３１号；米国特許第５，４９８，５３０号；米国特許第５，４３２，０１８号；米国特許第５，３３８，６６５号；米国特許第５，９２２，５４５号；ＷＯ　９６／４０９８７；およびＷＯ　９８／１５８３３を参照されたい（これらの文献は各々、完全に本明細書に援用される）。こうしたライブラリーにおいて、繊維状ファージのコートタンパク質との融合によって、ランダムペプチド配列をディスプレーする。典型的には、ディスプレーされたペプチドを、抗体に固定された、受容体の細胞外ドメインに対して、アフィニティー溶出する。アフィニティー精製および再

増殖の連続周期によって、保持されたファージを濃縮することが可能である。最適に結合するペプチドを配列決定して、ペプチドの１以上の構造的に関連するファミリー内で、重要な残基を同定することが可能である。ペプチド配列はまた、アラニンスキャニングまたはＤＮＡレベルでの突然変異誘発によって、どの残基が安全に交換可能であるかも示唆可能である。突然変異誘発ライブラリーを生成し、そしてスクリーニングして、最適な結合剤の配列をさらに最適化することが可能である（Ｌｏｗｍａｎ，　１９９７，　Ａｎｎ．Ｒｅｖ．　Ｂｉｏｐｈｙｓ．　Ｂｉｏｍｏｌ．　Ｓｔｒｕｃｔ．　２６：４０１－４２４）。可溶性ペプチド混合物をスクリーニングする、別の生物学的アプローチは、発現および分泌に酵母を用いて（Ｓｍｉｔｈら，　１９９３，　Ｍｏｌ．　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．　４３：７４１－７４８）、好ましい療法特性を持つペプチドに関して検索する。以後、この方法および関連法を「酵母に基づくスクリーニング」と称する。ペプチドライブラリーはまた、ｌａｃリプレッサーのカルボキシ末端に融合させて、そして大腸菌で発現させることが可能である。大腸菌に基づく別の方法は、ペプチドグリカン会合リポタンパク質（ＰＡＬ）との融合によって、細胞外膜上でのディスプレーを可能にする。以後、これらの方法および関連法を集合的に「大腸菌ディスプレー」と称する。別の方法において、リボソーム遊離前に、ランダムＲＮＡの翻訳を停止し、会合するＲＮＡがまだ付着しているポリペプチドライブラリーを生じる。以後、これらの方法および関連法を集合的に「リボソームディスプレー」と称する。他の方法は、ＲＮＡに連結されたペプチドを使用し；例えばＰＲＯｆｕｓｉｏｎ技術、Ｐｈｙｌｏｓ，　Ｉｎｃ．（例えばＲｏｂｅｒｔｓおよびＳｚｏｓｔａｋ，　１９９７，　Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ　９４：１２２９７－１２３０３を参照されたい）がある。以後、これらの方法および関連法を集合的に「ＲＮＡ－ペプチドスクリーニング」と称する。ペプチドが、ポリエチレンロッドまたは溶媒浸透性樹脂などの、安定な非生物学的材料上に固定されている、化学的に得られるペプチドライブラリーが開発されてきている。別の化学的に得られるペプチドライブラリーは、フォトリソグラフィーを使用して、ガラススライド上に固定されたペプチドをスキャンする。以後、これらの方法および関連法を集合的に「化学的ペプチドスクリーニング」と称する。化学的ペプチドスクリーニングは、Ｄアミノ酸および他の非天然類似体とともに、非ペプチド要素の使用を可能にする点で、好適である可能性がある。生物学的方法および化学的方法はどちらも、ＷｅｌｌｓおよびＬｏｗｍａｎ，　１９９２，　Ｃｕｒｒ．　Ｏｐｉｎ．　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．　３：３５５－３６２に概説されている。

【００７９】

既知の生理活性ペプチドの場合、好ましい療法特性を持つペプチドリガンドの合理的設計を達成可能である。こうしたアプローチにおいて、段階的にペプチド配列に変化を加え、そしてペプチドの生理活性または予測される生物物理的特性（例えば溶液構造）に対する置換の影響を決定する。以後、これらの技術を集合的に「合理的設計」と称する。こうした技術の１つにおいて、一度に１つの残基をアラニンと交換する、一連のペプチドを作成する。この技術は、一般的に「アラニンウォーク」または「アラニンスキャン」と称される。２つの残基（連続または間隔をあけたもの）を交換する際、「二重アラニンウォーク」と称される。生じたアミノ酸置換を、単独でまたは組み合わせて用いて、好ましい療法特性を持つ新規ペプチド実体を生じることが可能である。タンパク質－タンパク質相互作用の構造解析もまた、ペプチドが巨大タンパク質リガンドの結合活性を模倣することを示唆するのに使用可能である。こうした解析において、結晶構造は巨大タンパク質リガンドの重要な残基の同一性および相対的配向を示唆することが可能であり、そこからペプチドを設計可能である（例えばＴａｋａｓａｋｉら，　１９９７，　Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈ．　１５：１２６６－１２７０を参照されたい）。以後、これらの方法および関連法を「タンパク質構造解析」と称する。これらの解析法はまた、受容体タンパク質およびファージディスプレーによって選択されたペプチド間の相互作用を調べるのに使用可能であり、結合親和性を増加させる、ペプチドのさらなる修飾を示唆することが可能である。

【００８０】
本発明のポリペプチドのペプチドアゴニストおよびアンタゴニストをビヒクル分子に共有結合させることが可能である。用語「ビヒクル」は、療法タンパク質の分解を防止し、そして／または半減期を増加させ、毒性を減少させ、免疫原性を減少させ、または生物学的活性を増加させる分子を注す。典型的なビヒクルには、Ｆｃドメインまたは直鎖ポリマー（例えばポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリリジン、デキストランなど）；分枝鎖ポリマー（例えば米国特許第４，２８９，８７２号；米国特許第５，２２９，４９０号；ＷＯ　９３／２１２５９を参照されたい）；脂質；コレステロール基（例えばステロイド）；炭水化物またはオリゴ糖（例えばデキストラン）；あるいは天然タンパク質または合成タンパク質いずれか、サルベージ受容体に結合するポリペプチドまたはペプチドが含まれる。

【００８１】
本発明のサイトカインポリペプチドに対する抗体
本発明のポリペプチドと免疫反応性である抗体を本明細書に提供する。こうした抗体は、抗体の抗原結合部位を介して（非特異的結合と対照的に）、ポリペプチドに特異的に結合する。本発明において、特異的に結合する抗体は、本発明のサイトカインポリペプチド、相同体、および変異体を特異的に認識して、そしてこれらの分子と結合するが、他の分子とは結合しないであろうものである。１つの好ましい態様において、抗体は、本発明のポリペプチドに特異的であり、そして他のポリペプチドとは交差反応しない。このような方式で、上述のような本発明のサイトカインポリペプチド、断片、変異体、融合ポリペプチドなどを、それと免疫反応性である抗体を産生する際の「免疫原」として使用することが可能である。

【００８２】
より具体的には、ポリペプチド、断片、変異体、融合ポリペプチドなどは、抗体の形成を誘発する抗原決定基またはエピトープを含有する。これらの抗原決定基またはエピトープは、直鎖でもまたはコンホメーション的（ｃｏｎｆｏｒｍａｔｉｏｎａｌ）（断続的）でもどちらでもよい。直鎖エピトープは、該ポリペプチドのアミノ酸の単一の部分で構成されるが、コンホメーション的エピトープまたは断続的エピトープは、ポリペプチドフォールディングに際してごく近接する、ポリペプチド鎖の異なる領域由来のアミノ酸部分で構成される（ＪａｎｅｗａｙおよびＴｒａｖｅｒｓ，　Ｉｍｍｕｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　３：９（Ｇａｒｌａｎｄ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｉｎｃ．，　第２版，　１９９６））。フォールディングしたポリペプチドは複雑な表面を有するため、利用可能なエピトープの数は非常に多い；が、ポリペプチドのコンホメーションおよび立体障害のため、実際にエピトープに結合する抗体の数は、利用可能なエピトープの数より少ない（ＪａｎｅｗａｙおよびＴｒａｖｅｒｓ，　Ｉｍｍｕｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　２：１４（Ｇａｒｌａｎｄ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｉｎｃ．，　第２版，　１９９６））。エピトープは、当該技術分野に知られるいかなる方法によって同定してもよい。したがって、本発明の１つの側面は、本発明のポリペプチドの抗原性エピトープに関する。こうしたエピトープは、以下にさらに詳細に記載するように、抗体、特にモノクローナル抗体を作成するのに有用である。さらに、本発明のポリペプチドに由来するエピトープは、アッセイにおいて研究試薬として、そしてポリクローナル血清または培養ハイブリドーマの上清などの物質から、特異的に結合する抗体を精製するために、使用可能である。こうしたエピトープまたはその変異体は、固相合成、ポリペプチドの化学的切断または酵素的切断、あるいは組換えＤＮＡ技術の使用など、当該技術分野に周知の技術を用いて、産生可能である。

【００８３】
本発明のポリペプチドのエピトープによって誘発可能な抗体に関しては、エピトープが単離されていてもまたはポリペプチドの一部のままであっても、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体のどちらも、慣用的技術によって調製可能である。例えば、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，　Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ：Ａ　Ｎｅｗ　Ｄｉｍｅｎｓｉｏｎ　ｉｎ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ａｎａｌｙｓｅｓ，　Ｋｅｎｎｅｔら（監

修），Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ，ニューヨーク（１９８０）；およびＡｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，ＨａｒｌｏｗおよびＬａｎｄ（監修），Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，ニューヨーク州コールドスプリングハーバー（１９８８）；ＫｏｈｌｅｒおよびＭｉｌｓｔｅｉｎ（米国特許第４，３７６，１１０号）；ヒトＢ細胞ハイブリドーマ技術（Ｋｏｚｂｏｒら，１９８４，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３３：３００１－３００５；Ｃｏｌｅら，１９８３，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８０：２０２６－２０３０）；およびＥＢＶハイブリドーマ技術（Ｃｏｌｅら，１９８５，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ．Ｉｎｃ．，ｐｐ．７７－９６）を参照されたい。本発明のポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株もまた、本明細書に意図される。こうしたハイブリドーマは、慣用的技術によって産生しそして同定することが可能である。本発明のｍＡｂを産生するハイブリドーマは、ｉｎ ｖｉｔｒｏまたはｉｎ ｖｉｖｏで培養可能である。ｉｎ ｖｉｖｏでは高力価でｍＡｂが産生されるため、これが現在好ましい産生法である。こうしたハイブリドーマ細胞株を産生するための１つの方法は、動物をポリペプチドで免疫し；免疫された動物から脾臓細胞を採取し；前記脾臓細胞を骨髄腫細胞株に融合させ、それによってハイブリドーマ細胞を生成し；そしてポリペプチドに結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を同定することを含んでなる。当業者に知られる他の技術、例えばファージディスプレー法またはリボソームディスプレー法を用いて、本発明のサイトカインポリペプチドの特定のエピトープに特異的な抗体を産生可能である。

【００８４】

抗体産生のため、１以上の以下：本発明のサイトカインポリペプチド、前記サイトカインポリペプチドの断片、前記サイトカインポリペプチドの機能的同等物、または前記サイトカインポリペプチドの突然変異体型を注射することによって、多様な宿主動物を免疫することが可能である。こうした宿主動物には、限定されるわけではないが、ウサギ、モルモット、マウス、およびラットが含まれる。宿主種に応じて、多様なアジュバントを用いて、免疫学的反応を増加させることが可能であり、こうしたアジュバントには、限定されるわけではないが、フロイント（完全および不完全）、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲル、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオンなどの界面活性物質、ペプチド、油エマルジョン、キーホールリンペット（ｋｅｙｈｏｌｅ ｌｉｍｐｅｔ）ヘモシアニン、ジニトロフェノール、並びにＢＣＧ（カルメット・ゲラン桿菌（ｂａｃｃｉｌｌｅ Ｃａｌｍｅｔｔｅ－Ｇｕｅｒｉｎ））および坐瘡プロピオンバクテリウム（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｐａｒｖｕｍ）などの潜在的に有用なヒトアジュバントが含まれる。モノクローナル抗体は、慣用的技術によって回収可能である。こうしたモノクローナル抗体は、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、およびそのいかなるサブクラスも含む、いかなる免疫グロブリンクラスのものであってもよい。

【００８５】

さらに、適切な生物学的活性のヒト抗体分子由来の遺伝子と、適切な抗原特異性のマウス抗体分子由来の遺伝子を共にスプライシングすることによる、「キメラ抗体」の産生のために開発された技術が使用可能である（Ｔａｋｅｄａら，１９８５，Ｎａｔｕｒｅ，３１４：４５２－４５４；Ｍｏｒｒｉｓｏｎら，１９８４，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ８１：６８５１－６８５５；Ｂｏｕｌｉａｎｎｅら，１９８４，Ｎａｔｕｒｅ ３１２：６４３－６４６；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒら，１９８５，Ｎａｔｕｒｅ ３１４：２６８－２７０）。キメラ抗体は、異なる部分が異なる動物種に由来する分子であり、ブタｍＡｂに由来する可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有するものなどである。本発明のモノクローナル抗体にはまた、ネズミモノクローナル抗体のヒト化型も含まれる。こうしたヒト化抗体は、既知の技術によって調製可能であり、そして抗体をヒトに投与した際、減少した免疫原性という利点を提供する。１つの態様において、ヒト化モノクローナル抗体は、ネズミ抗体の可変領域（またはその抗原結

合部位のみ）およびヒト抗体由来の定常領域を含んでなる。あるいは、ヒト化抗体断片は、ネズミモノクローナル抗体の抗原結合部位およびヒト抗体由来の可変領域断片（抗原結合部位を欠く）を含んでなることが可能である。キメラおよびさらなる操作モノクローナル抗体の産生法には、Ｒｉｅｃｈｍａｎｎら（Ｎａｔｕｒｅ ３３２：３２３，１９８８）、Ｌｉｕら（ＰＮＡＳ ８４：３４３９，１９８７）、Ｌａｒｒｉｃｋら（Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ７：９３４，１９８９）、並びにＷｉｎｔｅｒおよびＨａｒｒｉｓ（ＴＩＰＳ １４：１３９，Ｃａｎ，１９９３）に記載されるものが含まれる。ヒト化抗体に有用な技術は、米国特許６，０５４，２９７にも論じられる。トランスジェニック的に抗体を生成する方法は、ＧＢ ２，２７２，４４０、米国特許第５，５６９，８２５号および第５，５４５，８０６号、並びに関連特許に見出すことが可能である。好ましくは、ヒトで使用するため、抗体はヒト抗体またはヒト化抗体であり；こうしたヒト抗体またはヒト化抗体を生成する技術もまた周知であり、そして例えばＭｅｄａｒｅｘ Ｉｎｃ．（ニュージャージー州プリンストン）およびＡｂｇｅｎｎｉｘ Ｉｎｃ．（カリフォルニア州フレモント）から商業的に入手可能である。別の好ましい態様において、ヒト抗体可変ドメインのファージディスプレーライブラリーをスクリーニングすることによって、ヒトで使用するための完全ヒト抗体を産生する（Ｖａｕｇｈａｎら，１９９８，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１６（６）：５３５－５３９；および米国特許第５，９６９，１０８号）。

【００８６】

特異的エピトープを認識する抗原結合抗体断片は、既知の技術によって生成可能である。例えば、こうした断片には、限定されるわけではないが：抗体分子のペプシン消化によって産生可能なＦ（ａｂ’）２断片、および（ａｂ’）２断片のジスルフィド架橋を還元することによって生成可能なＦａｂ断片が含まれる。あるいは、Ｆａｂ発現ライブラリーを構築し（Ｈｕｓｅら，１９８９，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４６：１２７５－１２８１）、所望の特異性を持つモノクローナルＦａｂ断片の迅速でそして容易な同定を可能にしてもよい。一本鎖抗体の産生に関して記載される技術（米国特許第４，９４６，７７８号；Ｂｉｒｄ，１９８８，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４２：４２３－４２６；Ｈｕｓｔｏｎら，１９８８，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５：５８７９－５８８３；およびＷａｒｄら，１９８９，Ｎａｔｕｒｅ ３３４：５４４－５４６）を適応させ、サイトカイン遺伝子産物に対する一本鎖抗体を産生することもまた可能である。一本鎖抗体は、アミノ酸架橋を介してＦｖ領域の重鎖および軽鎖断片を連結して一本鎖ポリペプチドを生じることによって形成される。こうした一本鎖抗体はまた、例えばＨＩＶ感染における遺伝子治療に関して、Ｍａｒａｓｃｏら（Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ２３１：２２３－２３８，１９９９）に記載されるように、細胞内でも（すなわち「細胞内発現抗体（ｉｎｔｒａｂｏｄｉｅｓ）」として）有用である可能性がある。さらに、当業者に周知の技術を用いて、今度は本発明のサイトカインポリペプチドに対する抗体を利用して、前記サイトカインポリペプチドを「模倣」し、そしてサイトカインポリペプチドの結合パートナーに結合可能な抗イディオタイプ抗体を生成することが可能である（例えばＧｒｅｅｎｓｐａｎ ＆ Ｂｏｎａ，１９９３，ＦＡＳＥＢ Ｊ ７（５）：４３７－４４４；およびＮｉｓｓｉｎｏｆｆ，１９９１，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４７（８）：２４２９－２４３８を参照されたい）。

【００８７】

本発明のポリペプチドと免疫反応性である抗体には、二重特異性抗体（すなわち第一の抗原結合ドメインを介して本発明のポリペプチドと免疫反応性であり、そしてまた、第二の抗原結合ドメインを介して異なるポリペプチドとも免疫反応性である抗体）が含まれる。多様な二重特異性抗体が調製され、そしてｉｎ ｖｉｔｒｏおよびｉｎ ｖｉｖｏ両方で有用であることが見出されてきている（例えば米国特許５，８０７，７０６；並びにＣａｏおよびＳｕｒｅｓｈ，１９９８，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ ９：６３５－６４４を参照されたい）。二重特異性抗体を調製する多くの方法が当該技術分野に知られ、これらには、２つの異なるハイブリドーマを融合させることによって形成するク

アドローマ（ｑｕａｄｒｏｍａ）などのハイブリッドーハイブリドーマ、並びにハイブリドーマをリンパ球と融合させることによって形成するトリオーマの使用が含まれる（ＭｉｌｓｔｅｉｎおよびＣｕｅｌｌｏ，１９８３，Ｎａｔｕｒｅ ３０５：５３７－５４０；米国特許４，４７４，８９３；および米国特許６，１０６，８３３）。米国特許６，０６０，２８５は、二重特異性抗体の産生法を開示し、この方法において、少なくとも、第一の特異性を有する抗体の軽鎖の遺伝子および重鎖可変部分の遺伝子を、第二の特異性を有する抗体を分泌するハイブリドーマ細胞にトランスフェクションする。抗体断片の化学的カップリングもまた、２つの異なる抗原に対する特異性を有する抗原結合分子を調製するのに用いられてきている（Ｂｒｅｎｎａｎら，１９８５，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２９：８１－８３；Ｇｌｅｎｎｉｅら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１９８７，１３９：２３６７－２３７５；および米国特許６，０１０，９０２）。二重特異性抗体はまた、例えばＫｏｓｔｅｌｎｙら（Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４８：１５４７－４５５３；１９９２）に記載されるように、ＦｏｓおよびＪｕｎタンパク質（優先的にヘテロ二量体を形成する）由来のロイシンジッパー部分を用いることによって、組換え手段を介しても産生可能である。米国特許５，５８２，９９６は、二重特異性抗体産生において、ヘテロ二量体形成を促進するための相補的相互作用ドメイン（ロイシンジッパー部分または他の錠および鍵相互作用ドメイン構造など）の使用を開示する。四価二重特異性分子は、米国特許５，９５９，０８３に記載されるように、抗体のＦ（ａｂ’）２断片の重鎖をコードするＤＮＡを、第二のＦ（ａｂ’）２分子の重鎖をコードするＤＮＡ（ＣＨ１ドメインがＣＨ３ドメインと交換されている）、または抗体の一本鎖ＦＶ断片をコードするＤＮＡいずれかと融合させることによって調製可能である。生じた融合遺伝子の哺乳動物細胞における発現は、対応する軽鎖の遺伝子と共に、選択される抗原に対して特異性を有する、四価二重特異性分子を生じる。二特異的抗体はまた、米国特許５，８０７，７０６に記載されるようにも産生可能である。一般的に、該方法は、第一のポリペプチドの界面で、隆起（小さいアミノ酸側鎖をより大きい側鎖と交換することによって構築する）を、そして第二のポリペプチドの界面で、対応する空洞（大きいアミノ酸側鎖をより小さいものと交換することによって調製する）を導入することを伴う。さらに、一本鎖可変断片（ｓＦｖ）は、２つの可変ドメインを共有結合することによって調製され；生じた抗体断片は、２つの可変ドメイン間の柔軟なリンカーの長さに応じて、二量体または三量体を形成可能である（Ｋｒｏｔｔら，１９９７，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ １０：４２３－４３３）。

【００８８】

こうした抗体を同定可能なスクリーニング法が周知であり、そして例えば免疫アフィニティークロマトグラフィーを伴う可能性がある。抗体は、アゴニスト（すなわちリガンド模倣）特性に関してスクリーニング可能である。こうした抗体は、本発明の細胞表面サイトカインポリペプチドに結合した際、サイトカイン結合パートナーが細胞表面サイトカインポリペプチドに結合した際に誘導される生物学的影響と類似の生物学的影響（例えば生物学的シグナルの伝達）を誘導する。アゴニスト性抗体を用いて、サイトカインが仲介する細胞刺激経路または細胞間コミュニケーションを誘導可能である。二重特異性抗体は、２つの別個のアッセイを用いるか、または二重特異性抗体が、第一の抗原および第二の抗原（後者は検出可能部分にカップリングされている）間の架橋として働くアッセイを用いてスクリーニングすることによって、同定可能である。第一の抗原結合ドメインを介して、本発明のサイトカインポリペプチドに結合する二重特異性抗体は、診断適用に、そして多能性幹細胞前駆体からの細胞の増殖または発生に関与する状態および疾患を治療するのに、有用であろう。

【００８９】

本発明のサイトカインポリペプチドが前記サイトカインの結合パートナーに結合するのを遮断可能な抗体を用いて、こうした結合から生じ、サイトカインが仲介する細胞間コミュニケーションまたは細胞刺激を、阻害可能である。こうした遮断抗体は、サイトカイン結合パートナーを発現している特定の細胞への、本発明のサイトカインポリペプチドの結

合を阻害する能力に関して、抗体を試験することによるなど、任意の適切なアッセイ法を用いて同定することも可能である。あるいは、遮断抗体は、標的細胞への可溶性サイトカインの結合から生じる生物学的影響を阻害する能力に関するアッセイにおいて、同定可能である。例えば、サイトカイン結合パートナーが仲介する細胞刺激経路を阻害する能力に関して、抗体をアッセイすることが可能である。こうした抗体は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ法で使用可能であるし、またはｉｎ　ｖｉｖｏで投与して、抗体を生成した実体によって仲介される生物学的活性を阻害することが可能である。このように、細胞表面結合パートナー受容体と本発明のサイトカインポリペプチドの相互作用によって（直接または間接的に）引き起こされるかまたは悪化される障害を治療することが可能である。療法は、サイトカイン結合パートナーが仲介する生物学的活性を阻害するのに有効な量の遮断抗体を、哺乳動物にｉｎ　ｖｉｖｏ投与することを伴う。一般的に、こうした療法の使用には、モノクローナル抗体が好ましい。１つの態様において、抗原結合抗体断片を使用する。本発明のサイトカインポリペプチドに対して向けられる抗体、および生理学的に許容しうる希釈剤、賦形剤、またはキャリアーを含んでなる組成物を、本明細書に提供する。本発明のサイトカインポリペプチドを含有する組成物に関して、こうした組成物の適切な成分を以下に記載する。

【００９０】

本明細書にやはり提供するのは、抗体に付着した検出可能（例えば診断用）剤または療法剤を含んでなるコンジュゲートである。こうした剤の例を上に提示する。該コンジュゲートは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ法またはｉｎ　ｖｉｖｏ法に使用を見出す。本発明の抗体はまた、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏいずれかの、本発明のポリペプチドまたは断片の存在を検出するアッセイにおいても使用可能である。抗体はまた、免疫アフィニティークロマトグラフィーによって、本発明のポリペプチドまたは断片を精製する際にも使用可能である。

【００９１】

本発明のサイトカインポリペプチド活性のアッセイ

本発明の精製サイトカインポリペプチド（ポリペプチド、ポリペプチド、断片、変異体、オリゴマー、および他の型を含む）は、多様なアッセイで有用である。例えば、本発明のサイトカイン分子を用いて、本発明のサイトカインポリペプチドの結合パートナーを同定可能であり、この結合パートナーをまた用いて、細胞内コミュニケーション、細胞刺激、または免疫細胞活性を調節可能である。あるいは、これらを用いて、細胞内コミュニケーション、細胞刺激経路、または免疫細胞活性を調節する、非結合パートナー分子または物質が同定可能である。

【００９２】

結合パートナーを同定するアッセイ。本発明のサイトカインポリペプチドおよびその断片を用いて、結合パートナーを同定可能である。例えば、これらは、慣用的結合アッセイなどの、いかなる適切なアッセイにおいても、候補結合パートナーに結合する能力に関して、試験可能である。例えば、本発明のサイトカインポリペプチドを検出可能試薬（例えば放射性核種、発色団、比色反応または蛍光定量反応を触媒する酵素等）で標識してもよい。標識ポリペプチドを、候補結合パートナーを発現している細胞と接触させる。その後、細胞を洗浄して、未結合標識ポリペプチドを取り除き、そして標識の性質にしたがって選択した、適切な技術によって、細胞に結合した標識の存在を決定する。

【００９３】

結合アッセイ法の１つの例は、以下のとおりである。候補結合パートナーｃＤＮＡを含有する組換え発現ベクターを構築する。１０ｃｍ^{2}プレート中のＣＶ１－ＥＢＮＡ－１細胞にこの組換え発現ベクターをトランスフェクションする。ＣＶ－１／ＥＢＮＡ－１細胞（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１０４７８）はＣＭＶ極初期エンハンサー／プロモーターから駆動されるＥＢＶ核抗原１を恒常的に発現する。ＣＶ１－ＥＢＮＡ－１は、ＭｃＭａｈａｎら（ＥＭＢＯ　Ｊ．　１０：２８２１，　１９９１）に記載されるように、アフリカミドリザル腎臓細胞株ＣＶ－１（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　７０）由来であった。トランスフェクトさ

れた細胞を２４時間培養し、そして各プレート中の細胞をその後、２４ウェルプレートに分ける。さらに４８時間培養した後、トランスフェクトされた細胞（約４ｘ１０^{4}細胞／ウェル）をＢＭ－ＮＦＤＭで洗浄する。ＢＭ－ＮＦＤＭは５０ｍｇ／ｍｌ脱脂粉乳が添加されている結合培地（２５ｍｇ／ｍｌウシ血清アルブミン、２ｍｇ／ｍｌアジ化ナトリウム、２０ｍＭ Ｈｅｐｅｓ ｐＨ７．２を含むＲＰＭＩ１６４０）である。該細胞をその後、多様な濃度の、例えば、上述のように作成した可溶性ポリペプチド／Ｆｃ融合ポリペプチドと、３７℃で１時間インキュベーションする。細胞をその後、洗浄し、そして結合培地中で、穏やかに攪拌しながら、一定の飽和濃度の^{125}Ｉマウス抗ヒトＩｇＧと３７℃で１時間インキュベーションする。徹底した洗浄の後、トリプシン処理を介して細胞を解離させる。上記で使用したマウス抗ヒトＩｇＧは、ヒトＩｇＧのＦｃ領域に対して向けられ、そしてＪａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏｒｅｓｅａｒｃｈ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．、ペンシルバニア州ウェストグローブから得ることが可能である。標準的クロラミン－Ｔ法を用い、抗体を放射ヨウ素標識する。該抗体は、細胞に結合しているいかなるポリペプチド／ＦｃポリペプチドのＦｃ部分にも結合するであろう。すべてのアッセイにおいて、Ｆｃ融合ポリペプチド／Ｆｃの非存在下で^{125}Ｉ抗体の非特異的結合をアッセイすると共に、Ｆｃ融合ポリペプチドおよび２００倍のモル過剰の非標識マウス抗ヒトＩｇＧ抗体の存在下でもアッセイした。細胞結合^{125}Ｉ抗体は、Ｐａｃｋａｒｄ Ａｕｔｏｇａｍｍａカウンター上で定量化した。親和性計算（Ｓｃａｔｃｈａｒｄ，Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．５１：６６０，１９４９）はＭｉｃｒｏｖａｘコンピュータ上で実行されるＲＳ／１（ＢＢＮ Ｓｏｆｔｗａｒｅ、マサチューセッツ州ボストン）上で生み出される。結合はまた、シンチレーション近接アッセイ（Ｕｄｅｎｆｒｉｅｎｄら，１９８５，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ８２：８６７２－８６７６）、均質時間分解蛍光法（Ｐａｒｋら，１９９９，Ａｎａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍ ２６９：９４－１０４）、蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）法（Ｃｌｅｇｇ ＲＭ，１９９５，Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ６：１０３－１１０）、あるいは結合したポリペプチドが潜在的な結合パートナーに曝露された際、例えばＢｉａｃｏｒｅＡＢ（スウェーデン・ウプサラ）に供給されるようなバイオセンサーを用いて、表面プラズモン共鳴のいかなる変化も測定する方法などの高処理スクリーニング法によく適した方法を用いても検出可能である。本発明のサイトカインポリペプチドへの結合に関してアッセイ可能な化合物には、限定されるわけではないが、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（ミズーリ州セントルイス）、Ａｒｑｕｌｅ（マサチューセッツ州ウォバーン）、Ｅｎｚｙｍｅｄ（アイオワ州アイオワシティー）、Ｍａｙｂｒｉｄｇｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．（英国・コーンウォール州トレビレット）、ＭＤＳ Ｐａｎｌａｂｓ（ワシントン州ボセル）、Ｐｈａｒｍａｃｏｐｅｉａ（ニュージャージー州プリンストン）、およびＴｒｅｇａ（カリフォルニア州サンディエゴ）などの企業から－しばしば大きいコンビナトリアルケミストリー化合物「ライブラリー」の一部として－商業的に入手可能なものなどの、小有機分子が含まれる。これらのアッセイを用いてスクリーニングするのに好ましい小有機分子は、通常、１０Ｋ分子量未満であり、そして細胞侵入（ｐｅｎｅｔｒａｔｉｏｎ）を増進し、分解に抵抗し、そして／またはその生理学的半減期を延長する、いくつかの物理化学的および薬理学的特性を所持することが可能である（Ｇｉｂｂｓ，Ｊ．，１９９４，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，Ｃｅｌｌ ７９（２）：１９３－１９８）。天然産物、無機化学薬品、並びにタンパク質および毒素などの生物学的に活性である物質を含む化合物もまた、本発明のサイトカインポリペプチドに結合する能力に関して、これらの方法を用いてアッセイすることが可能である。

【００９４】

酵母２ハイブリッドまたは「相互作用トラップ」アッセイ。本発明のサイトカインポリペプチドが、別のポリペプチドに結合するか、または潜在的に結合する（例えば、受容体－リガンド相互作用におけるように）場合、本発明のサイトカインポリペプチドをコードする核酸はまた、相互作用トラップアッセイ（例えばＧｙｕｒｉｓら，Ｃｅｌｌ

７５：７９１－８０３（１９９３）に記載されるものなど）で使用して、結合が起こる他のポリペプチドをコードする核酸を同定するか、または結合相互作用の阻害剤を同定することも可能である。これらの結合相互作用に関与するポリペプチドはまた、結合相互作用のペプチドまたは小分子阻害剤またはアゴニストに関して、スクリーニングするのにも使用可能である。

【００９５】

競合的結合アッセイ。別の種類の適切な結合アッセイは、競合的結合アッセイである。例えば、変異体の生物学的活性は、候補結合パートナーへの結合に関して、変異体が、天然ポリペプチドと競合する能力をアッセイすることによって、決定可能である。競合的結合アッセイは、慣用的方法論によって実行可能である。競合的結合アッセイに使用可能な試薬には、放射標識した本発明のサイトカインポリペプチド、および前記サイトカイン（内因性または組換え）を細胞表面に発現する、損なわれていない（ｉｎｔａｃｔ）細胞が含まれる。例えば、放射標識可溶性サイトカイン断片を用いて、細胞表面受容体への結合に関して、可溶性サイトカイン変異体と競合させることが可能である。損なわれていない細胞の代わりに、Ｆｃ部分とポリペプチドＡまたはポリペプチドＧ（固相上）の相互作用を通じて固相に結合した、可溶性結合パートナー／Ｆｃ融合ポリペプチドを代用可能である。ポリペプチドＡおよびポリペプチドＧを含有するクロマトグラフィーカラムには、Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，　Ｉｎｃ．、ニュージャージー州ピスカタウェイから利用可能なものが含まれる。

【００９６】

細胞間コミュニケーション、細胞刺激、または免疫細胞活性の調節剤を同定するアッセイ。細胞間コミュニケーション、細胞刺激または免疫細胞活性に対する本発明のサイトカインポリペプチドの影響を操作して、標的細胞におけるこれらの活性を調節することが可能である。例えば、開示する本発明のサイトカインポリペプチド、開示する本発明のサイトカインポリペプチドをコードする核酸、あるいはこうしたポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストを細胞または細胞群に投与して、細胞コミュニケーション、細胞刺激、または標的細胞における活性を誘導するか、増進するか、抑制するか、または停止させることが可能である。こうした方式で使用可能な本発明のサイトカインポリペプチド、アゴニストまたはアンタゴニストの同定は、当業者に知られる多様なアッセイを介して実行可能である。こうしたアッセイに含まれるのは、本発明のサイトカインポリペプチドが細胞間コミュニケーション、細胞刺激または活性に影響を及ぼす能力を評価するものである。こうしたアッセイは、例えば、本発明のサイトカインポリペプチドの存在下での免疫細胞相互作用の解析を伴うであろう。こうしたアッセイにおいて、前記サイトカインポリペプチドの存在下でコミュニケーションまたは細胞刺激の比率を測定し、そしてその後、こうしたコミュニケーションまたは細胞刺激が、候補アゴニストまたはアンタゴニストあるいは別のサイトカインポリペプチドの存在下で改変されるかどうかを決定するであろう。本発明のこの側面の典型的なアッセイには、サイトカイン分泌アッセイ、Ｔ細胞同時刺激アッセイ、並びに抗原提示細胞およびＴ細胞を伴う混合リンパ球反応が含まれる。これらのアッセイは、当業者に周知である。

【００９７】

別の側面において、本発明は、試験化合物が、細胞の細胞間コミュニケーションまたは細胞刺激活性に影響を及ぼす能力を検出する方法を提供する。この側面において、該方法は：（１）本発明のサイトカインポリペプチドまたはその断片を含む試験化合物と第一の群の標的細胞を、用いる特定のアッセイに適した条件下で接触させ；（２）標的細胞間の細胞間コミュニケーションまたは細胞刺激の純率を測定し；そして（３）試験化合物の非存在下、試験化合物が存在しない以外は、第一の群の標的細胞と同一の条件下で、サイトカインポリペプチドまたはその断片と接触させた対照細胞間の細胞間コミュニケーションまたは細胞刺激の純率を観察することを含んでなる。この態様において、対照細胞における細胞間コミュニケーションまたは細胞刺激の純率を、本発明のサイトカインポリペプチドと試験化合物の両方で処理した細胞のものと比較する。比較によって、細胞間コミュニ

ケーションまたは細胞刺激のエフェクターが同定可能であるような、細胞間コミュニケーションまたは細胞刺激の純率の相異が提供されるであろう。試験化合物は、細胞間コミュニケーションまたは細胞刺激を活性化するかまたは上方制御することによって、あるいは阻害するかまたは下方制御することによって、エフェクターとして機能可能であり、そしてこの方法を通じて検出可能である。

【００９８】

細胞増殖、細胞死、細胞分化、および細胞接着アッセイ。本発明のポリペプチドは、サイトカイン、細胞増殖（誘導または阻害いずれか）、または細胞分化（誘導または阻害いずれか）活性を示す可能性があり、あるいは特定の細胞集団で他のサイトカイン産生を誘導する可能性がある。現在までに発見された多くのポリペプチド因子は、１以上の因子依存細胞増殖アッセイにおいて、こうした活性を示してきており、そしてしたがって、該アッセイは、細胞刺激活性の好適な確認として役立つ。本発明のポリペプチドの活性は、限定なしに、３２Ｄ、ＤＡ２、ＤＡ１Ｇ、Ｔ１０、Ｂ９、Ｂ９／１１、ＢａＦ３、ＭＣ９／Ｇ、Ｍ＋（プレＢ　Ｍ＋）、２Ｅ８、ＲＢ５、ＤＡ１、１２３、Ｔ１１６５、ＨＴ２、ＣＴＬＬ２、ＴＦ－１、Ｍｏ７ｅおよびｃｍｋを含む細胞株に関するいくつかの日常的な因子依存細胞増殖アッセイのいずれか１つによって立証される。本発明のサイトカインポリペプチドの活性は、他の手段の中でも、以下の方法によって測定可能である：

Ｔ細胞または胸腺細胞増殖のためのアッセイには、限定なしに：Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｃｏｌｉｇａｎら監修，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ（ｐｐ．３．１－３．１９：Ｉｎ ｖｉｔｒｏ ａｓｓａｙｓ ｆｏｒ ｍｏｕｓｅ ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ ｆｕｎｃｔｉｏｎ；第７章：Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃ ｓｔｕｄｉｅｓ ｉｎ ｈｕｍａｎｓ）；Ｔａｋａｉら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３７：３４９４－３５００，１９８６；Ｂｅｒｔａｇｎｏｌｌｉら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４５：１７０６－１７１２，１９９０；Ｂｅｒｔａｇｎｏｌｌｉら，Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ １３３：３２７－３４１，１９９１；Ｂｅｒｔａｇｎｏｌｌｉら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４９：３７７８－３７８３，１９９２；Ｂｏｗｍａｎら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５２：１７５６－１７６１，１９９４に記載されるものが含まれる。

【００９９】

脾臓細胞、リンパ節細胞または胸腺細胞のサイトカイン産生および／または増殖に関するアッセイには、限定なしに：ＫｒｕｉｓｂｅｅｋおよびＳｈｅｖａｃｈ，１９９４，Ｐｏｌｙｃｌｏｎａｌ Ｔ ｃｅｌｌ ｓｔｉｍｕｌａｔｉｏｎ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ中，Ｃｏｌｉｇａｎら監修 Ｖｏｌ．１ ｐｐ．３．１２．１－３．１２．１４，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，トロント；およびＳｃｈｒｅｉｂｅｒ，１９９４，Ｍｅｓｕｒｅｍｅｎｔ ｏｆ ｍｏｕｓｅ ａｎｄ ｈｕｍａｎ ｉｎｔｅｒｆｅｒｏｎ ｇａｍｍａ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ中，Ｃｏｌｉｇａｎら監修 Ｖｏｌ １ ｐｐ．６．８．１－６．８．８，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，トロントに記載されるものが含まれる。

【０１００】

造血およびリンパ球新生細胞の増殖および分化に関するアッセイには、限定なしに：Ｂｏｔｔｏｍｌｙら，１９９１，Ｍｅａｓｕｒｅｍｅｎｔ ｏｆ ｈｕｍａｎ ａｎｄ ｍｕｒｉｎｅ ｉｎｔｅｒｌｅｕｋｉｎ ２ ａｎｄ ｉｎｔｅｒｌｅｕｋｉｎ ４，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ中，Ｃｏｌｉｇａｎら監修 Ｖｏｌ １ ｐｐ．６．３．１－６．３．１２，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，トロント；ｄｅＶｒｉｅｓら，Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ １７３：１２０５－１２１１，１９９１；Ｍｏｒｅａｕら，Ｎａｔｕｒｅ ３３６：６９０－６９２，１９８８；Ｇｒｅｅｎｂｅｒｇｅｒら，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８０：２９３１－２９３８，１９８３；Ｎｏｒｄａｎ，１９９１，

Measurement of mouse and human interleukin 6, Current Protocols in Immunology中, Coliganら監修 Vol 1 pp.6.6.1－6.6.5, John Wiley and Sons, トロント；Smithら, Proc Natl Acad Sci USA 83：1857－1861, 1986；Bennettら, 1991, Measurement of human interleukin 11, Current Protocols in Immunology中, Coliganら監修, Vol 1 pp.6.15.1 John Wiley and Sons, トロント；Ciarlettaら, 1991, Measurement of mouse and human Interleukin 9, Current Protocols in Immunology中, Coliganら監修, Vol 1 pp.6.13.1, John Wiley and Sons, トロントに記載されるものが含まれる。

【0101】

抗原に対するT細胞クローン反応に関するアッセイ（とりわけ、増殖およびサイトカイン産生を測定することによる、APC－T細胞相互作用に影響を与えると共にT細胞への影響を指示するポリペプチドを同定するであろうもの）には、限定なしに：Current Protocols in Immunology, Coliganら監修, Greene Publishing Associates and Wiley－Interscience（第3章：In vitro assays for mouse lymphocyte function；第6章：Cytokines and their cellular receptors；第7章：Immunologic studies in humans）；Weinbergerら, Proc Natl Acad Sci USA 77：6091－6095, 1980；Weinbergerら, Eur. J. Immun. 11：405－411, 1981；Takaiら, J. Immunol. 137：3494－3500, 1986；Takaiら, J. Immunol. 140：508－512, 1988に記載されるものが含まれる。

【0102】

胸腺細胞または脾臓細胞細胞傷害性に関するアッセイには、限定なしに：Current Protocols in Immunology, Coliganら監修, Greene Publishing Associates and Wiley－Interscience（第3章, In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1－3.19；第7章, Immunologic studies in Humans）；Herrmannら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78：2488－2492, 1981；Herrmannら, J. Immunol. 128：1968－1974, 1982；Handaら, J. Immunol. 135：1564－1572, 1985；Takaiら, J. Immunol. 137：3494－3500, 1986；Takaiら, J. Immunol. 140：508－512, 1988；Herrmannら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78：2488－2492, 1981；Herrmannら, J. Immunol. 128：1968－1974, 1982；Handaら, J. Immunol. 135：1564－1572, 1985；Takaiら, J. Immunol. 137：3494－3500, 1986；Bowmanら, J. Virology 61：1992－1998；Takaiら, J. Immunol. 140：508－512, 1988；Bertagnolliら, Cellular Immunology 133：327－341, 1991；Brownら, J. Immunol. 153：3079－3092, 1994に記載されるものが含まれる。

【０１０３】

Ｔ細胞依存免疫グロブリン反応およびアイソタイプスイッチングに関するアッセイ（とりわけ、Ｔ細胞依存抗体反応を調節し、そしてＴｈ１／Ｔｈ２プロフィールに影響を及ぼすポリペプチドを同定するであろうもの）には、限定なしに：Ｍａｌｉｓｚｅｗｓｋｉ，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ １４４：３０２８－３０３３，１９９０；並びにＭｏｎｄおよびＢｒｕｎｓｗｉｃｋ，１９９４，Ａｓｓａｙｓ ｆｏｒ Ｂ ｃｅｌｌ ｆｕｎｃｔｉｏｎ：ｉｎ ｖｉｔｒｏ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ中，Ｃｏｌｉｇａｎら監修，Ｖｏｌ １ ｐｐ．３．８．１－３．８．１６，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，トロントに記載されるものが含まれる。

【０１０４】

混合リンパ球反応（ＭＬＲ）アッセイ（とりわけ、主にＴｈ１およびＣＴＬ反応を生じるポリペプチドを同定するであろうもの）には、限定なしに：Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｃｏｌｉｇａｎら監修，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ（第３章、Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ ａｓｓａｙｓ ｆｏｒ Ｍｏｕｓｅ Ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ Ｆｕｎｃｔｉｏｎ ３．１－３．１９；第７章、Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃ ｓｔｕｄｉｅｓ ｉｎ Ｈｕｍａｎｓ）；Ｔａｋａｉら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３７：３４９４－３５００，１９８６；Ｔａｋａｉら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４０：５０８－５１２，１９８８；Ｂｅｒｔａｇｎｏｌｌｉら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４９：３７７８－３７８３，１９９２に記載されるものが含まれる。

【０１０５】

樹状細胞依存アッセイ（とりわけ、未処置Ｔ細胞を活性化する樹状細胞に発現されるポリペプチドを同定するであろうもの）には、限定なしに：Ｇｕｅｒｙら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ １３４：５３６－５４４，１９９５；Ｉｎａｂａら，Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ １７３：５４９－５５９，１９９１；Ｍａｃａｔｏｎｉａら，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ １５４：５０７１－５０７９，１９９５；Ｐｏｒｇａｄｏｒら，Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ １８２：２５５－２６０，１９９５；Ｎａｉｒら，Ｊ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ６７：４０６２－４０６９，１９９３；Ｈｕａｎｇら，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６４：９６１－９６５，１９９４；Ｍａｃａｔｏｎｉａら，Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ １６９：１２５５－１２６４，１９８９；Ｂｈａｒｄｗａｊら，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ ９４：７９７－８０７，１９９４；およびＩｎａｂａら，Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ １７２：６３１－６４０，１９９０に記載されるものが含まれる。

【０１０６】

リンパ球生存／アポトーシスに関するアッセイ（とりわけ、スーパー抗原誘導後のアポトーシスを防ぐポリペプチドおよびリンパ球恒常性を制御するポリペプチドを同定するであろうもの）には、限定なしに：Ｄａｒｚｙｎｋｉｅｗｉｃｚら，Ｃｙｔｏｍｅｔｒｙ １３：７９５－８０８，１９９２；Ｇｏｒｃｚｙｃａら，Ｌｅｕｋｅｍｉａ ７：６５９－６７０，１９９３；Ｇｏｒｃｚｙｃａら，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５３：１９４５－１９５１，１９９３；Ｉｔｏｈら，Ｃｅｌｌ ６６：２３３－２４３，１９９１；Ｚａｃｈａｒｃｈｕｋ，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ １４５：４０３７－４０４５，１９９０；Ｚａｍａｉら，Ｃｙｔｏｍｅｔｒｙ １４：８９１－８９７，１９９３；Ｇｏｒｃｚｙｃａら，Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ １：６３９－６４８，１９９２に記載されるものが含まれる。

【０１０７】

Ｔ細胞拘束および発生の初期段階に影響を与えるポリペプチドに関するアッセイには、限定なしに：Ａｎｔｉｃａら，Ｂｌｏｏｄ ８４：１１１－１１７，１９９４；Ｆｉｎｅら，Ｃｅｌｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ １５５：１１１－１２２，１９９４；Ｇａｌｙら，Ｂｌｏｏｄ ８５：２７７０－２７７８，１９９５；Ｔｏｋｉら，Ｐｒｏ

c Natl Acad Sci. USA 88：7548－7551, 1991に記載されるものが含まれる。

【0108】

胚性幹細胞分化に関するアッセイ（とりわけ、胚性分化造血に影響を与えるポリペプチドを同定するであろうもの）には、限定なしに：Johanssonら Cellular Biology 15：141－151, 1995；Kellerら, Molecular and Cellular Biology 13：473－486, 1993；McClanahanら, Blood 81：2903－2915, 1993に記載されるものが含まれる。

【0109】

幹細胞生存および分化に関するアッセイ（とりわけ、リンパ造血を制御するポリペプチドを同定するであろうもの）には、限定なしに：Methylcellulose colony forming assays, Freshney, 1994, Culture of Hematopoietic Cells中, Freshneyら監修 pp. 265－268, Wiley－Liss, Inc., ニューヨーク州ニューヨーク；Hirayamaら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89：5907－5911, 1992；Primitive hematopoietic colony forming cells with high proliferative potential, McNieceおよびBriddell, 1994, Culture of Hematopoietic Cells中, Freshneyら監修 pp. 23－39, Wiley－Liss, Inc., ニューヨーク州ニューヨーク；Nebenら, Experimental Hematology 22：353－359, 1994；Ploemacher, 1994, Cobblestone area forming cell assay, Culture of Hematopoietic Cells中, Freshneyら監修 pp. 1－21, Wiley－Liss, Inc., ニューヨーク州ニューヨーク；Spooncerら, 1994, Long term bone marrow cultures in the presence of stromal cells, Culture of Hematopoietic Cells中, Freshneyら監修 pp. 163－179, Wiley－Liss, Inc., ニューヨーク州ニューヨーク；Sutherland, 1994, Long term culture initiating cell assay, Culture of Hematopoietic Cells中, Freshneyら監修 Vol pp. 139－162, Wiley－Liss, Inc., ニューヨーク州ニューヨークに記載されるものが含まれる。

【0110】

組織生成活性に関するアッセイには、限定なしに：国際特許公報第WO95／16035号（骨、軟骨、腱）；国際特許公報第WO95／05846号（神経、ニューロン性）；国際特許公報第WO91／07491号（皮膚、内皮）に記載されるものが含まれる。創傷治癒活性に関するアッセイには、限定なしに：EaglsteinおよびMertz, J. Invest. Dermatol 71：382－84（1978）に修飾されるような、Winter, Epidermal Wound Healing, pp. 71－112（MaibachおよびRovee監修）, Year Book Medical Publishers, Inc., シカゴに記載されるものが含まれる。

【0111】

細胞運動および接着に関するアッセイには、限定なしに：Current Protocols in Immunology, Coliganら監修, Greene Publishing Associates and Wiley－Interscience（第6.12章, Measurement of alpha and b

eta chemokines 6.12.1－6.12.28）；Taubら J. Clin. Invest. 95：1370－1376, 1995；Lindら APMIS 103：140－146, 1995；Mullerら Eur. J. Immunol. 25：1744－1748；Gruberら J Immunol. 152：5860－5867, 1994；Johnstonら J Immunol. 153：1762－1768, 1994に記載されるものが含まれる。

【0112】

受容体－リガンド活性に関するアッセイには、限定なしに：Current Protocols in Immunology, Coliganら監修, Greene Publishing Associates and Wiley－Interscience（第7.28章, Measurement of cellular adhesion under static conditions 7.28.1－7.28.22）, Takaiら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84：6864－6868, 1987；Biererら, J. Exp. Med. 168：1145－1156, 1988；Rosensteinら, J. Exp. Med. 169：149－160 1989；Stoltenborgら, J. Immunol. Methods 175：59－68, 1994；Stittら, Cell 80：661－670, 1995に記載されるものが含まれる。

【0113】

本発明のサイトカインポリペプチドおよび核酸の診断用および他の使用

本発明が提供する本発明のサイトカインポリペプチドをコードする核酸は、多くの診断または他の有用な目的に使用可能である。本発明の核酸は、解析、性質決定または療法使用のために組換えポリペプチドを発現するため；対応するポリペプチドを（恒常的に、または組織分化もしくは発生の特定の時期に、または疾患状態において）優先的に発現する組織のマーカーとして；サザンゲル上の分子量マーカーとして；染色体を同定するかまたは関連遺伝子位をマッピングするための染色体マーカーまたはタグとして（標識した場合）；潜在的な遺伝子障害を同定するために患者における内因性ＤＮＡ配列と比較するため；ハイブリダイズしそしてしたがって新規関連ＤＮＡ配列を発見するためのプローブとして；遺伝子フィンガープリンティングのためのＰＣＲプライマーを導くための情報供給源として；他の新規核酸を発見する過程において、既知の配列を「取り去る（ｓｕｂｔｒａｃｔ－ｏｕｔ）」ためのプローブとして；発現パターンの検査用のものを含む、「遺伝子チップ」または他の支持体に付着するオリゴマーを選択し、そして作成するため；ＤＮＡ免疫技術を用いて、抗ポリペプチド抗体を作成するため；抗ＤＮＡ抗体を作成するかまたは別の免疫反応を誘発するための抗原として、そして遺伝子治療のために使用可能である。本発明のサイトカインポリペプチドおよび断片化ポリペプチドの使用には、限定されるわけではないが、以下が含まれる：ポリペプチドを精製し、そしてその活性を測定すること；搬送剤；療法試薬および研究用試薬；分子量および等電点電気泳動マーカー；ペプチド断片化用の対照；未知のポリペプチドの同定；並びに抗体の調製。これらの使用に適したいずれかの核酸またはすべての核酸は、製品として商品化するため、試薬等級またはキット形式に発展させることが可能である。上に列挙する使用を実行する方法は、当業者に周知である。こうした方法を開示する参考文献には、限定なしに、“Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ”, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Sambrook, J., E.F. FritschおよびT. Maniatis監修, 1989、および“Methods in Enzymology：Guide to Molecular Cloning Techniques”, Academic Press, Berger, S.L.およびA.R. Kimmel監修, 1987が含まれる。

【0114】

プローブおよびプライマー。開示するサイトカイン核酸、本発明のサイトカインポ

リペプチドをコードする核酸、およびその断片の組み合わせの使用の中に、プローブまたはプライマーとしての断片の使用がある。こうした断片は、一般的に、ＤＮＡ配列の少なくとも約１７の隣接するヌクレオチドを含んでなる。他の態様において、ＤＮＡ断片は、ＤＮＡ配列の少なくとも３０、または少なくとも６０の隣接するヌクレオチドを含んでなる。ハイブリダイゼーション条件の選択に影響を与える基本的なパラメーターおよび適切な条件を考案するための手引きは、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、１９８９に示され、そして上に詳細に記載している。遺伝暗号の知識を、上に示すアミノ酸配列と組み合わせて用いて、縮重オリゴヌクレオチドの組を調製することが可能である。こうしたオリゴヌクレオチドは、例えばＤＮＡ断片を単離し、そして増幅するポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）において、プライマーとして有用である。特定の態様において、非ヒト遺伝子ライブラリー用のプローブとして、縮重プライマーを使用することが可能である。こうしたライブラリーには、限定されるわけではないが、ｃＤＮＡライブラリー、ゲノムライブラリー、およびエレクトロニックＥＳＴ（発現配列タグ）またはＤＮＡライブラリーさえ含まれるであろう。その後、この方法で同定された相同配列をプローブとして用いて、非ヒトサイトカイン相同体を同定するであろう。

【０１１５】

診断法および遺伝子治療。当業者は、本発明のサイトカインポリペプチドをコードする核酸、および開示する断片、並びにこれらの核酸の組み合わせを用い、周知の技術を用いて、これらのポリペプチドに対応する遺伝子と関連する異常を解析することが可能である。これによって、このマーカーが再編成されているかまたは欠失している状態を識別することが可能になる。さらに本発明の核酸またはその断片を位置マーカーとして用いて、未知の位置の他の遺伝子をマッピングすることが可能である。本発明の核酸に対応する遺伝子の不全または不十分な量によって（直接または間接的に）仲介されるいかなる障害に対する治療を開発するのにも、該ＤＮＡが使用可能である。天然ヌクレオチド配列の本明細書の開示によって、不全遺伝子（ｄｅｆｅｃｔｉｖｅ　ｇｅｎｅ）の検出、および正常遺伝子でのその交換が可能になる。不全遺伝子は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ診断アッセイにおいて、そして本明細書に開示する天然ヌクレオチド配列と、この遺伝子に不全を宿すると推測されるヒト由来の遺伝子のものとを比較することによって、検出可能である。

【０１１６】

結合パートナーに関するスクリーニング法。本発明のサイトカインポリペプチドを、各々、結合パートナーに関してスクリーニングするか、または該パートナーを同定する方法における試薬として用いることが可能である。例えば、本発明のサイトカインポリペプチドを固体支持体材料に付着させて、そしてアフィニティークロマトグラフィーと類似の方式で、結合パートナーに結合させることが可能である。特定の態様において、慣用法によって、ポリペプチドを固体支持体に付着させる。一例として、ポリペプチドのアミノ酸側鎖上の官能基と反応するであろう官能基を含有するクロマトグラフィーカラムが入手可能である（Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，　Ｉｎｃ．、ニュージャージー州ピスカタウェイ）。代替法として、ポリペプチド／Ｆｃポリペプチド（上に論じるようなもの）を、Ｆｃ部分との相互作用を通じて、プロテインＡまたはプロテインＧ含有クロマトグラフィーカラムに付着させる。本発明のサイトカインポリペプチドはまた、細胞表面上にサイトカイン結合パートナーを発現する細胞を同定するのにも使用を見出す。本発明の精製サイトカインポリペプチドを、カラムクロマトグラフィーマトリックスまたは類似の適切な支持体などの固相に結合させる。例えば磁気微小球体をポリペプチドでコーティングし、そして磁場を通じてインキュベーション容器に保持することが可能である。潜在的な結合パートナー発現細胞を含有する細胞混合物の懸濁物を、ポリペプチドを有する固相と接触させる。細胞表面上に結合パートナーを発現している細胞は固定ポリペプチドに結合し、そして未結合細胞は洗い流される。あるいは、本発明のサイトカインポリペプチドを検出可能部分にコンジュゲート化し、次いで、結合パートナー発現に関して試験しようとする細胞とインキュベーションする。インキュベーション後、未結合標識物質を取り除き、そして細胞上の検出可能部分の存在または非存在を決定する。さらなる代替法におい

て、結合パートナーを発現していると推測される細胞の混合物を、ビオチン化したポリペプチドとインキュベーションする。インキュベーション期間は、十分な結合を確実にするため、典型的には少なくとも連続１時間である。次いで、アビジンでコーティングしたビーズを充填したカラムに、生じた混合物を通過させ、それによって、アビジンに対するビオチンの高い親和性が、所望の細胞のビーズへの結合を提供する。アビジンでコーティングしたビーズの使用法が知られる（Ｂｅｒｅｎｓｏｎら，　Ｊ．　Ｃｅｌｌ．　Ｂｉｏｃｈｅｍ．，　１０Ｄ：２３９，　１９８６を参照されたい）。未結合物質を取り除く洗浄、および結合細胞の遊離は、慣用法を用いて行う。いくつかの場合、結合パートナーに関してスクリーニングするか、または該パートナーを同定する上記の方法はまた、こうした結合パートナー分子またはそれらを発現している細胞などを用いるかまたは修飾して、単離するかまたは精製することが可能である。

【０１１７】

生物学的活性の測定。本発明のサイトカインポリペプチドはまた、結合親和性に換算して、サイトカイン結合ポリペプチドの生物学的活性を測定するのにも使用を見出す。したがって、該ポリペプチドは、例えば異なる条件下でのポリペプチドの貯蔵寿命および安定性を監視するための、「品質保証」研究を行うものによって、使用可能である。例えば、該ポリペプチドは、異なる温度で保管されているか、または異なる細胞種で産生された結合パートナーポリペプチドの生物学的活性を測定する、結合親和性研究に使用可能である。該ポリペプチドはまた、結合パートナーポリペプチドの修飾（例えば、化学的修飾、一部切除、突然変異等）後、生物学的活性が保持されているかどうか決定するのにも使用可能である。修飾ポリペプチドの結合親和性を、非修飾結合ポリペプチドのものと比較して、結合ポリペプチドの生物学的活性に対する該修飾のいかなる不利な影響も検出する。例えば研究に用いる前に、こうして結合ポリペプチドの生物学的活性を確かめることが可能である。

【０１１８】

キャリアーおよび搬送剤。該ポリペプチドはまた、付着する剤を、同定された結合パートナーを所持している細胞に搬送するためのキャリアーとしての使用も見出す。したがって、該ポリペプチドは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ法またはｉｎ　ｖｉｖｏ法において、診断用剤または療法剤をこうした細胞（または、細胞表面上に結合パートナーを発現することが見出された他の細胞種）に搬送するのに使用可能である。ポリペプチドに付着可能な検出可能（診断用）剤および療法剤には、限定されるわけではないが、毒素、他の細胞傷害性剤、薬剤、放射性核種、発色団、比色反応または蛍光定量反応を触媒する酵素等が、意図する適用にしたがって選択される特定の剤と共に含まれる。毒素の例は、リシン、アブリン、ジフテリア毒素、緑膿菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）外毒素Ａ、リボソーム不活性化ポリペプチド、トリコセセンなどのマイコトキシン、並びにそれらの誘導体および断片（例えば一本鎖）である。診断使用に適した放射性核種には、限定されるわけではないが、^{123}Ｉ、^{131}Ｉ、^{99m}Ｔｃ、^{111}Ｉｎ、および^{76}Ｂｒが含まれる。療法使用に適した放射性核種の例は、^{131}Ｉ、^{211}Ａｔ、^{77}Ｂｒ、^{186}Ｒｅ、^{188}Ｒｅ、^{212}Ｐｂ、^{212}Ｂｉ、^{109}Ｐｄ、^{64}Ｃｕ、および^{67}Ｃｕである。こうした剤は、いかなる適切な慣用法によって、ポリペプチドに付着させてもよい。ポリペプチドは、例えば、所望の剤上の官能基と反応して、共有結合を形成することが可能である、アミノ酸側鎖上の官能基を含んでなる。あるいは、ポリペプチドまたは剤を誘導体化して、所望の反応性官能基を生成するか、または付着させてもよい。誘導体化には、多様な分子をポリペプチドに付着させるのに利用可能である、二官能性カップリング試薬（Ｐｉｅｒｃｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｐａｎｙ、イリノイ州ロックフォード）の１つの付着を伴うことが可能である。ポリペプチドを放射標識するいくつかの技術が知られる。適切な二官能性キレート剤を用いることによって、放射性核種金属をポリペプチドに付着させることが可能である。こうしてポリペプチドおよび適切な診断用剤または療法剤を含んでなるコンジュゲート（好ましくは共有結合）を調製する。該コンジュゲートを、特定の適用に適した量で投与するか、または別の方式で使用する。

【０１１９】

本発明のサイトカインポリペプチドおよびそのアンタゴニストでの疾患の治療

本発明のサイトカインポリペプチド、断片、変異体、アンタゴニスト、アゴニスト、抗体、および結合パートナーは、限定されるわけではないが、多能性幹細胞前駆体からの細胞の増殖または発生に関与する状態および疾患を含む、医学的状態および疾患を治療するのに有用である可能性がある。使用する療法分子または分子類は、治療しようとする状態の病因および関与する生物学的経路に応じるであろうし、そして本発明のサイトカインポリペプチドの変異体、断片、および結合パートナーは、本発明のサイトカインポリペプチドと類似の影響または異なる影響を有する可能性がある。例えば、多能性幹細胞前駆体からの細胞の過剰増殖および／または分化に関与する状態を治療するため、本発明のサイトカインポリペプチドの細胞増殖活性刺激のアンタゴニストを選択可能であるが、本発明の既定のサイトカインポリペプチドの特定の断片もまた、その活性の有効な優性ネガティブアンタゴニストとして作用可能である。したがって、以下の段落において、「本発明のサイトカインポリペプチドまたはアンタゴニスト」は、本発明のサイトカインポリペプチド、断片、変異体、アンタゴニスト、アゴニスト、抗体、および結合パートナーなどすべてを指し、そして本明細書に記載する生物学的考慮および療法的考慮にしたがって、本発明の態様として提供されるものから、個々の当業者が、特定の分子または分子類を選択可能であると理解される。

【０１２０】

本発明のサイトカインポリペプチドおよびそのアンタゴニストの投与

本発明は、医学的障害、そして特に本発明のサイトカインポリペプチドが仲介する障害を患う患者、好ましくは哺乳動物患者、そして最も好ましくはヒト患者を治療するための化合物、組成物、および方法を提供する。サイトカインが仲介するこうした障害には、本発明のサイトカインおよび結合パートナー間の結合によって（直接または間接的に）引き起こされるかまたは悪化される状態が含まれる。本開示の目的のため、用語「疾病」、「疾患」、「医学的状態」、「異常な状態」等は、用語「医学的障害」と交換可能に用いられる。用語「治療する（ｔｒｅａｔ）」、「治療すること（ｔｒｅａｔｉｎｇ）」および「治療（ｔｒｅａｔｍｅｎｔ）」には、本明細書において、治癒的、防御的（例えば予防的）および対症的または改良的治療が含まれる。こうした療法的使用のため、本発明のサイトカインポリペプチドおよび断片、前記サイトカインポリペプチドをコードする核酸、並びに／あるいは本発明のサイトカインポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニスト（抗体など）を、周知の手段を通じて、必要な患者に投与することが可能である。本発明の組成物は、天然ポリペプチド、変異体、誘導体、オリゴマー、および生物学的活性断片などの、本明細書に記載するいかなる型のポリペプチドを含有してもよい。特定の態様において、組成物は、可溶性ポリペプチド、または本発明の可溶性サイトカインポリペプチドを含んでなるオリゴマーを含んでなる。

【０１２１】

療法的に有効な量。本発明の治療法または使用法を実施する際、本発明の療法剤の療法的有効量を、好ましくは本発明のサイトカインポリペプチドの活性に関連する疾患を治療するかまたは改良するため、治療しようとする状態を有する患者に投与する。「療法剤」には、限定なしに、本発明のサイトカインポリペプチド、断片、および変異体；本発明のサイトカインポリペプチド、断片、および変異体をコードする核酸；抗体などの、本発明のサイトカインポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニスト；サイトカインポリペプチド結合パートナー；本発明のサイトカインポリペプチド、断片、変異体、および結合パートナーで形成される複合体などのいずれかが含まれる。本明細書において、用語「療法的有効量」は、意味がある患者の利益、すなわち相当する医学的状態の治療、治癒、予防または改良、あるいはこうした状態の治療、治癒、予防または改良率の増加を示すのに十分な薬剤組成物または方法の各療法剤または他の活性成分の総量を意味する。単独で投与される、個々の療法剤または活性成分に適用した際、該用語はその成分のみを指す。組み合わせに適用した際、該用語は、連続して、または同時に、組み合わせて投与したの

であっても、療法効果を生じる成分の組み合わせた量を指す。本明細書において、句、療法剤の「療法的有効量を投与する」は、障害の重症度を反映する、少なくとも１つの指標において、改善、そして好ましくは持続した改善を誘導するのに十分な量および期間、前記療法剤で患者を治療することを意味する。改善は、患者が、１日以上、またはより好ましくは１週間以上離れた、少なくとも２回の機会に改善を示したならば、「持続した」とみなされる。改善の度合いは、徴候または症状に基づいて決定され、そして決定にはまた、生活の質（ｑｕａｌｉｔｙ－ｏｆ－ｌｉｆｅ）アンケートなどの、患者に実施されるアンケートを使用することも可能である。治療の量および期間が十分であるかどうか決定するため、患者の疾病の度合いを反映する多様な指標を評価することが可能である。選択された単数または複数の指標に関するベースライン値は、療法剤の最初の用量の投与前に、患者を検査することによって、確立する。好ましくは、ベースライン検査は、最初の用量投与の約６０日以内に行う。急性症状を治療するために療法剤が投与される場合、最初の用量は、傷害が生じた後、現実的にできるだけ速やかに投与する。選択された単数または複数の指標のベースラインを越える改善を、患者が明示するまで、本発明のサイトカインポリペプチドまたはアンタゴニストなどの療法剤を投与することによって、改善を誘導する。慢性状態を治療する際、改善のこの度合いは、少なくとも１ヶ月以上、例えば、１、２、もしくは３ヶ月またはそれ以上の期間、あるいは無期限に、この医薬品を反復投与することによって、得られる。１～６週間の期間、または単回用量であっても、しばしば、傷害または他の急性状態を治療するのに十分である。治療後の患者の疾病の度合いが、１以上の指標にしたがって、改善されているように見えたとしても、同一レベル、あるいは減少した用量または頻度で、無期限に治療を続けてもよい。ひとたび治療を減少させるかまたは中断したら、後に、症状が再出現した場合、元来のレベルで再開してもよい。

【０１２２】

服用（ｄｏｓｉｎｇ）。当業者は、適切な投薬量は、治療しようとする障害の性質および重症度、患者の体重、年齢、全身状態、および以前の疾病および／または治療、並びに投与経路などの要因に応じて、多様であろうことを認識するであろう。予備的用量は、動物試験にしたがって決定することが可能であり、そしてヒト投与の投薬量決定は、標準的投薬量決定試験などの、当該技術分野に認められた慣例にしたがって行う。例えば、療法的有効用量は、最初に、細胞培養アッセイから概算することが可能である。投薬量は、化合物の比活性に応じるであろうし、そして日常的な実験によって、容易に決定可能である。用量は、動物モデルにおいて、細胞培養で決定されるようなＩＣ５０（すなわち症状の最大阻害の半分を達成する試験化合物の濃度）を含みつつ、毒性を最小限にする、循環血漿濃度範囲を達成するよう、処方することが可能である。こうした情報を用いて、ヒトにおいて、有用な用量を、より正確に決定することが可能である。最終的には、主治医が、個々の患者各々を治療する、本発明のポリペプチドの量を決定するであろう。まず、主治医は、本発明のポリペプチドを低用量で投与し、そして患者の反応を観察するであろう。患者に最適な療法効果が得られるまで、本発明のポリペプチドをより多い用量で投与することが可能であり、そしてその時点でさらに用量を増やさない。本発明の方法を実施するのに用いる多様な薬剤組成物は、ｋｇ体重あたり、約０．０１ｎｇ～約１００ｍｇ（好ましくは約０．１ｎｇ～約１０ｍｇ、より好ましくは約０．１マイクログラム～約１ｍｇ）の本発明のポリペプチドを含有すべきであると意図される。本発明の１つの態様において、本明細書に開示する多様な医学的障害を治療するため、本発明のサイトカインポリペプチドまたはアンタゴニストを週１回投与し、別の態様において、少なくとも週２回投与し、そして別の態様において、少なくとも週３回投与する。注射する場合、成人用量あたり、有効量の本発明のサイトカインポリペプチドまたはアンタゴニストは１～２０ｍｇ／m^2の範囲であり、そして好ましくは約５～１２ｍｇ／m^2である。あるいは、均一用量を投与してもよく、その量は、５～１００ｍｇ／用量の範囲であってもよい。皮下注射によって投与される均一用量の典型的な用量範囲は、５～２５ｍｇ／用量、２５～５０ｍｇ／用量および５０～１００ｍｇ／用量である。本発明の１つの態様において、２５ｍｇ／用量あるいは５０ｍｇ／用量の本発明のサイトカインポリペプチドまたはアンタゴニスト

を含有する、注射に許容しうる調製を投与することによって、以下に記載する多様な徴候を治療する。２５ｍｇまたは５０ｍｇ用量は、特に慢性状態に対して、反復投与することが可能である。注射以外の投与経路を用いるならば、標準的な医学的実施にしたがって、用量を適切に調節する。多くの場合、患者状態の改善は、約２５ｍｇの用量の本発明のサイトカインポリペプチドまたはアンタゴニストを、少なくとも３週間の期間に渡って、週１～３回、あるいは約５０ｍｇの用量の本発明のサイトカインポリペプチドまたはアンタゴニストを、少なくとも３週間、週１または２回、注射することによって得られるであろうが、所望の度合いの改善を誘導するのに、より長い期間の治療が必要である可能性がある。不治の慢性状態では、措置は、患者の医師によって、こうしたものが必要だと思われたならば、用量および頻度に調整を行ったうえ、無期限に続けてもよい。前述の用量は、１８歳以上の年齢のヒトである、成人患者に関する例である。小児科患者（年齢４～１７歳）に関しては、適切な措置は、週あたり１回以上の皮下注射によって投与される、最大用量２５ｍｇまでの本発明のサイトカインポリペプチドまたはアンタゴニストの０．４ｍｇ／ｋｇの皮下注射を伴う。本発明のサイトカインポリペプチドに対する抗体を、サイトカインポリペプチドアンタゴニストとして用いる場合、好ましい用量範囲は、０．１～２０ｍｇ／ｋｇ、そしてより好ましくは１～１０ｍｇ／ｋｇである。抗サイトカインポリペプチド抗体の別の好ましい用量範囲は、０．７５～７．５ｍｇ／体重ｋｇである。ヒト化抗体、すなわち、抗体分子の抗原結合部分が非ヒト供給源由来である抗体が好ましい。こうした抗体は、静脈内注射または投与することが可能である。

【０１２３】

処方。本発明のサイトカインポリペプチド（限定なしに組換えおよび非組換え供給源を含む、いかなる供給源由来でもよいもの）の有効量を、生理学的に許容しうる希釈剤、キャリアー、または賦形剤などの他の成分と組み合わせて含んでなる組成物を、本明細書に提供する。用語「薬学的に許容しうる」は、活性成分（類）の生物学的活性の有効性に干渉しない非毒性物質を意味する。投与に適した処方には、酸化防止剤、緩衝剤、静菌剤、および処方をレシピエントの血液と等張にする溶質を含有してもよい水性および非水性無菌注射溶液；並びに懸濁剤または粘稠化剤を含んでもよい水性および非水性無菌懸濁物が含まれる。ポリペプチドは、薬学的に有用な組成物を調製するのに用いられる既知の方法にしたがって、処方可能である。これらは、単一の活性成分として、または既定の徴候に適した他の既知の活性成分と共に、薬学的に許容しうる希釈剤（例えば、生理食塩水、Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、酢酸、およびリン酸緩衝溶液）、保存剤（例えば、チメロサル、ベンジルアルコール、パラベン類）、乳化剤、可溶化剤、アジュバントおよび／またはキャリアーと混合して組み合わせてもよい。薬剤組成物に適した処方には、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ'ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，第１６版，１９８０，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，ペンシルバニア州イーストンに記載されるものが含まれる。さらに、こうした組成物は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、金属イオンと複合体化しているか、またはポリ酢酸、ポリグリコール酸、ヒドロゲル類、デキストラン等のポリマー化合物に取り込まれているか、またはリポソーム、マイクロエマルジョン、ミセル、単層もしくは多層小胞、赤血球ゴーストもしくはスフェロブラストに取り込まれていてもよい。リポソーム処方に適した脂質には、限定なしに、モノグリセリド類、ジグリセリド類、スルファチド類、リゾレシチン、リン脂質類、サポニン、胆汁酸類等が含まれる。こうしたリポソーム処方の調製は、例えば、米国特許第４，２３５，８７１号；米国特許第４，５０１，７２８号；米国特許第４，８３７，０２８号；および米国特許第４，７３７，３２３号に開示されるように、当該技術分野の技術レベルの範囲内である。こうした組成物は、物理的状態、可溶性、安定性、ｉｎ ｖｉｖｏ放出速度、およびｉｎ ｖｉｖｏクリアランス速度に影響を与えるであろうし、そしてしたがって、意図される適用にしたがって選択され、そのため、キャリアーの特性は、選択された投与経路に応じるであろう。本発明の１つの好ましい態様において、本発明のサイトカインポリペプチドの持続放出型を用いる。開示する方法で使用するのに適した持続放出型には、限定されるわけではないが、緩慢溶解生体適合性ポリマー（米国特許第６，０３６

，９７８号に記載されるアルギン酸微小粒子など）に被包された本発明のサイトカインポリペプチド、このようなポリマー（局所適用ヒドロゲル類を含む）と混合されたもの、および／または生体適合性半透性移植物中に入れられたものが含まれる。

【０１２４】

療法化合物の組み合わせ。本発明のサイトカインポリペプチドは、多量体（例えばヘテロ二量体またはホモ二量体）で、あるいはそれ自体とのまたは他のポリペプチドとの複合体で、活性である可能性がある。その結果、本発明の薬剤組成物は、こうした多量体型または複合体型の本発明のポリペプチドを含んでなることが可能である。本発明の薬剤組成物は、本発明のポリペプチド（類）とポリペプチドまたはペプチド抗原との複合体の形であることが可能である。本発明は、本発明のサイトカインポリペプチドまたはアンタゴニストと組み合わせて同一患者に投与する１以上の他の薬剤と同時の、本発明のサイトカインポリペプチドまたはアンタゴニストの投与をさらに提供し、各薬剤は、その医薬品に適した措置にしたがって投与される。「同時投与」は、組み合わせた成分での同時治療または連続治療と共に、薬剤を交互に投与する措置、または１つの成分を長期に投与し、そして単数または複数の他のものを断続して投与する措置を含む。成分は、同一または別個の組成物中で、そして同一または異なる投与経路によって投与可能である。本発明の薬剤組成物と同時投与可能な成分の例は：Ｍ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＴＮＦ、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、ＩＬ－１１、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＩＬ－１４、ＩＬ－１５、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、ＩＬ－２３、ＩＦＮ、ＴＮＦ０、ＴＮＦ１、ＴＮＦ２、Ｇ－ＣＳＦ、Ｍｅｇ－ＣＳＦ、トロンボポエチン、幹細胞因子、およびエリスロポエチンなどの、サイトカイン類、リンホカイン類、または他の造血因子、あるいはこれらの因子いずれかの阻害剤またはアンタゴニストである。薬剤組成物はさらに、ポリペプチドの活性を増進するか、あるいは治療中のその活性または使用を補足する（ｃｏｍｐｌｉｍｅｎｔ）かいずれかの他の剤を含有してもよい。こうしたさらなる因子および／または剤を薬剤組成物中に含み、本発明のポリペプチドとの相乗効果を生じることも、または副作用を最小限にすることも可能である。逆に、本発明のサイトカインポリペプチドまたはアンタゴニストを、特定のサイトカイン、リンホカイン、他の造血因子、血栓溶解因子または抗血栓因子、あるいは抗炎症剤の処方中に含み、該サイトカイン、リンホカイン、他の造血因子、血栓溶解因子または抗血栓因子、あるいは抗炎症剤の副作用を最小限にすることが可能である。同時に投与すべき薬剤のさらなる例には、限定されるわけではないが、抗ウイルス剤、抗生物質、鎮痛剤、コルチコステロイド、炎症性サイトカインのアンタゴニスト、非ステロイド性抗炎症剤、ペントキシフィリン、サリドマイド、並びにアザチオプリン、シクロホスファミド、シクロスポリン、ヒドロキシクロロキン硫酸、メトトレキセート、レフルノミド、ミノサイクリン、ペニシラミン、スルファサラジン、および経口金、金チオリンゴ酸ナトリウム、および金チオグルコースなどの金化合物などの疾患修飾抗リウマチ薬剤（ＤＭＡＲＤ）が含まれる。さらに、本発明のサイトカインポリペプチドまたはアンタゴニストは、サイトカインポリペプチドに対する抗体、または本発明の天然サイトカインポリペプチドの競合的阻害剤として作用するサイトカインポリペプチド由来ペプチドを含む、第二のこうしたサイトカインポリペプチド／アンタゴニストと組み合わせることが可能である。

【０１２５】

投与経路。いかなる有効な投与経路を用いて、核酸を含んでなる組成物を含む、本発明のサイトカインポリペプチドまたはそのアンタゴニストを、療法的に投与してもよい。非経口投与には、例えば、多量（ｂｏｌｕｓ）注射によるか、または連続注入による、関節内、静脈内、筋内、病巣内、腹腔内または皮下経路を介した、注射が含まれ、そしてまた、例えば疾患または傷害部位での局所投与も含まれる。投与の他の適切な手段には、移植物からの持続放出；エアロゾル吸入および／またはガス注入；点眼剤；膣または直腸座薬；頬側調製；丸剤（ピル）、シロップ、ロゼンジ、アイスクリームまたはチューインガムを含む経口調製；およびローション、ゲル、スプレー、軟膏または他の適切な技術な

どの局所調製が含まれる。あるいは、ポリペプチドを発現する培養細胞を移植することによって、例えば本発明のサイトカインポリペプチドまたはアンタゴニストを発現する細胞を移植することによって、本発明のポリペプチド性サイトカインポリペプチドまたはアンタゴニストを投与することが可能である。細胞はまた、細胞増殖を調節するため、あるいはこうした細胞で所望の効果または活性を生じるため、本発明のポリペプチドの存在下で、ｅｘ ｖｉｖｏで培養することも可能である。その後、処理した細胞を、療法目的のため、ｉｎ ｖｉｖｏで導入することが可能である。本発明のポリペプチドはまた、タンパク質形質導入法によって投与することも可能である。この方法では、本発明のサイトカインポリペプチドを、限定されるわけではないが、ＴＡＴ、Ａｎｔｐ、またはＶＰ２２（Ｓｃｈｗａｒｚｅら，２０００，Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ １０：２９０－２９５）などのタンパク質形質導入ドメイン（ＰＴＤ）に共有結合させる。その後、細胞を含有する組織培地にペプチドを添加することによって、ＰＤＴ連結ペプチドを細胞に形質導入することが可能である（Ｓｃｈｗａｒｚｅら，１９９９，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８５：１５６９；Ｌｉｎｄｇｒｅｎら，２０００，ＴｉＰＳ ２１：９９；Ｄｅｒｏｓｓｉら，１９９８，Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ ８：８４；ＷＯ ００／３４３０８；ＷＯ ９９／２９７２１；およびＷＯ ９９／１０３７６）。別の態様において、本発明のサイトカインポリペプチドまたはアンタゴニストをコードするＤＮＡでの、ｉｎ ｖｉｖｏまたはｅｘ ｖｉｖｏのトランスフェクションによって、患者自身の細胞が、本発明のサイトカインポリペプチドまたはアンタゴニストを産生するよう、誘導する。このＤＮＡは、例えば、本発明のサイトカインポリペプチドまたはアンタゴニストをコードする裸のＤＮＡまたはリポソーム被包ＤＮＡを注入することによって、あるいはトランスフェクションの他の手段によって、患者の細胞に導入可能である。本発明の核酸はまた、細胞または生物への核酸の導入のための他の既知の方法（限定なしに、ウイルスベクターまたは裸のＤＮＡの形でのものが含まれる）によっても、患者に投与することが可能である。本発明のサイトカインポリペプチドまたはアンタゴニストを、１以上の他の生物学的に活性である化合物と組み合わせて投与する際、これらは、同一のまたは異なる経路によって投与可能であり、そして同時に、別個に、または連続して投与可能である。

【０１２６】

経口投与。本発明のポリペプチドの療法的有効量を経口投与する際、本発明のポリペプチドは、錠剤、カプセル、粉末、溶液またはエリキシル剤の形であろう。錠剤型で投与する際、本発明の薬剤組成物は、さらに、ゼラチンまたはアジュバントなどの固体キャリアーを含有してもよい。錠剤、カプセル、および粉末は、本発明のポリペプチドを約５～９５％、そして好ましくは本発明のポリペプチドを約２５～９０％含有する。液体型で投与する際、水、石油、ピーナツ油、ミネラルオイル、ダイズ油、またはゴマ油などの動物または植物起源の油、あるいは合成油などの液体キャリアーを添加してもよい。薬剤組成物の液体型はさらに、生理学的生理食塩溶液、デキストロースまたは他の糖類溶液、あるいはエチレングリコール、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールなどのグリコール類を含有してもよい。液体型で投与する際、薬剤組成物は、本発明のポリペプチドを、重量約０．５～９０％、そして好ましくは、本発明のポリペプチドを、約１～５０％含有する。

【０１２７】

静脈内投与。本発明のポリペプチドの療法的有効量を、静脈内、皮膚または皮下注射によって投与する際、本発明のポリペプチドは、発熱物質不含で非経口的に許容しうる水性溶液の形であろう。ｐＨ、等張性、安定性等を十分考慮した、こうした非経口的に許容しうるポリペプチド溶液の調製は、当該技術分野の範囲内である。静脈内、皮膚、または皮下注射のための好ましい薬剤組成物は、本発明のポリペプチドに加えて、塩化ナトリウム注射剤、リンゲル注射剤、デキストロース注射剤、デキストロースおよび塩化ナトリウム注射剤、乳酸リンゲル注射剤、または当該技術分野に知られるような他のビヒクルを含有すべきである。本発明の薬剤組成物はまた、当業者に知られる、安定化剤、保存剤、緩衝剤、酸化防止剤、または他の添加物も含有してもよい。本発明の薬剤組成物を用いた

静脈内療法の期間は、治療する疾患の重症度、並びに個々の患者各々の状態および潜在的な特異体質反応に応じて、多様であろう。本発明のポリペプチドの各適用期間は、連続静脈内投与１２～２４時間の範囲内であろうと意図される。最終的には、主治医が、本発明の薬剤組成物を用いた静脈内療法の適切な期間に関して、決定するであろう。

【０１２８】

骨および組織投与。骨、軟骨、腱または靭帯障害を治療するのに有用な本発明の組成物に関しては、療法は、局所的に、全身性に、あるいは移植物または装置として局在的に、組成物を投与することを含む。投与する際、本発明に使用するための療法組成物は、もちろん、発熱物質不含で、生理学的に許容しうる型である。さらに、組成物は、望ましくは、骨、軟骨または組織損傷部位に搬送するため、粘稠性型で被包または注射してもよい。創傷治癒および組織修復には、局所投与が適している可能性がある。所望により、上述のような組成物中に含まれていてもよい、本発明のポリペプチド以外の療法的に有効な剤が、本発明の方法の組成物と同時にまたは連続して、交互にまたはさらに投与されてもよい。好ましくは、骨および／または軟骨形成のため、組成物は、骨および／または軟骨損傷部位に、ポリペプチド含有組成物を搬送し、発展する骨および軟骨のための構造を提供することが可能であり、そして最適には、体に吸収されることが可能であるマトリックスを含むであろう。こうしたマトリックスは、他の移植医学的適用のため、現在用いられる素材で形成されることが可能である。マトリックス素材の選択は、生体適合性、生物分解性、機械的特性、美容的外見および界面特性に基づく。組成物の特定の適用が適切な処方を明確にするであろう。組成物のための潜在的なマトリックスは、生物分解性でそして化学的に定義される、硫酸カルシウム、リン酸三カルシウム、ヒドロキシアパタイト、ポリ乳酸、ポリグリコール酸およびポリ無水物であることが可能である。他の潜在的な素材は、骨または真皮コラーゲンなどの生物分解性で、そして生物学的によく定義されるものである。さらなるマトリックスは、純粋なポリペプチドまたは細胞外マトリックス成分で構成される。他の潜在的なマトリックスは、焼結ヒドロキシアパタイト、バイオガラス、アルミン酸塩、または他のセラミックスなどの、非生物分解性でそして化学的に定義されるものである。マトリックスは、ポリ乳酸およびヒドロキシアパタイトまたはコラーゲンおよびリン酸三カルシウムなど、上述の種類の素材のいずれかの組み合わせで構成されてもよい。バイオセラミックスは、カルシウム－アルミン酸－リン酸におけるように、組成が改変されていてもよく、そしてプロセシングされて、孔サイズ、粒子サイズ、粒子形状、および生物分解性が改変されていてもよい。現在好ましいのは、１５０～８００ミクロンの範囲の直径を有する多孔粒子の形の、乳酸およびグリコール酸の５０：５０（モル重量）コポリマーである。いくつかの適用において、カルボキシメチルセルロースまたは自己血餅（ｂｌｏｏｄ　ｃｌｏｔ）などの隔絶剤（ｓｅｑｕｅｓｔｅｒｉｎｇ　ａｇｅｎｔ）を利用して、ポリペプチド組成物がマトリックスから解離するのを防止することが有用であろう。隔絶剤の好ましいファミリーは、カルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ）の陽イオン塩を含む、アルキルセルロース（ヒドロキシアルキルセルロースを含む）などのセルロース性素材である。他の好ましい隔絶剤には、ヒアルロン酸、アルギン酸ナトリウム、ポリ（エチレングリコール）、ポリオキシエチレンオキシド、カルボキシビニルポリマーおよびポリ（ビニルアルコール）が含まれる。本明細書において有用な隔絶剤の量は、総処方重量に基づいて、０．５～２０重量％、好ましくは１～１０重量％であり、これは、ポリマーマトリックスからのポリペプチドの脱離を防止し、そして組成物の適切な取り扱いを提供するのに必要な量であり、それでもなお前駆細胞がマトリックスに浸潤するのを防止するほど多くなく、それによってポリペプチドが前駆細胞の骨形成活性を補助する機会を提供する量に相当する。さらなる組成物において、本発明のポリペプチドは、骨および／または軟骨欠損、創傷または問題の組織の治療に有益な他の剤と組み合わせることが可能である。これらの剤には、上皮増殖因子（ＥＧＦ）、血小板由来増殖因子（ＰＤＧＦ）、トランスフォーミング増殖因子（ＴＧＦ－アルファおよびＴＧＦ－ベータ）、およびインスリン様増殖因子（ＩＧＦ）などの多様な増殖因子が含まれる。療法組成物はまた、現在、獣医学的適用にも有用である。特に、本発明のポリペプチドでのこうした治療に

は、ヒトに加えて、家畜およびサラブレッド系統のウマが、望ましい患者である。組織再生に使用すべきポリペプチド含有薬剤組成物の投薬措置は、ポリペプチドの作用を修飾する多様な要因、例えば形成されるのが望ましい組織の重量、損傷部位、損傷組織の状態、創傷サイズ、損傷組織の種類（例えば骨）、患者の年齢、性別、および食餌、感染の重症度、投与期間および他の臨床的要因を考慮して、主治医によって決定されるであろう。投薬量は、再構成に用いたマトリックスの種類、および薬剤組成物中の他のポリペプチドの包含に応じて、多様である可能性がある。例えば、ＩＧＦ　Ｉ（インスリン様増殖因子Ｉ）などの他の既知の増殖因子を最終組成に添加してもまた、投薬量が達成される可能性がある。経過は、組織／骨増殖および／または修復の定期的な評価、例えばＸ線、組織形態計測的測定およびテトラサイクリン標識によって、監視可能である。

【０１２９】

獣医学的使用。ヒト患者に加え、本発明のサイトカインポリペプチドおよびアンタゴニストは、ペット（イヌ、ネコ、鳥、霊長類等）、飼育農場動物（ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、鳥類等）などの非ヒト動物、または本発明のサイトカインポリペプチドが仲介する状態を患う動物いずれかの疾患状態の治療に有用である。こうした例では、適切な用量は、動物の体重にしたがって決定可能である。例えば、０．２～１ｍｇ／ｋｇの用量が使用可能である。あるいは、用量は、動物の表面面積にしたがって決定され、典型的な用量は、０．１～２０ｍｇ／m^2、またはより好ましくは５～１２ｍｇ／m^2の範囲である。イヌまたはネコなどの小動物に関しては、適切な用量は０．４ｍｇ／ｋｇである。好ましい態様において、本発明のサイトカインポリペプチドまたはアンタゴニスト（好ましくは患者と同じ種由来の遺伝子で構築される）は、動物の状態が改善されるまで、週１回以上、注射または他の適切な経路によって投与されるか、あるいは無期限に投与可能である。

【０１３０】

医薬品製造。本発明はまた、本明細書に開示する各医学的障害の予防または療法的治療のための医薬品製造における、本発明のサイトカインポリペプチド、断片、および変異体；本発明のサイトカインポリペプチド、断片、および変異体をコードする核酸；抗体などの、本発明のサイトカインポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニスト；サイトカインポリペプチド結合パートナー；本発明のサイトカインポリペプチド、断片、変異体、および結合パートナーで形成される複合体等の使用にも関する。

【実施例】

【０１３１】

以下の実施例は、特定の態様を例示することを意図し、そして本発明の範囲を限定することを意図しない。

（実施例１）

ＩＭＸ７１８９ポリペプチド、およびサイトカイン構造を持つさらなるポリペプチドの同定

ＧＥＮＳＣＡＮプログラム（Ｍｉｙａｊｉｍａら，　２０００，　Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｂｉｏｐｈｙｓ　Ｒｅｓ　Ｃｏｍｍｕｎ　２７２：８０１－８０７）およびＯｔｔｏ（Ｖｅｎｔｅｒら，　２００１，　Ｓｃｉｅｎｃｅ　２９１：１３０４－１３５１）などの自動化アプローチを用いて、ヒトゲノムにコードされると予測されるアミノ酸配列のリストを含めて、データセットをＣｅｌｅｒａ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ（メリーランド州ロックビル）から受け取った。タンパク質データバンク（ＰＤＢ）（Ｂｅｒｍａｎら，　２０００，　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ　２８：２３５－２４２）の構造代表上に、クエリータンパク質配列を重ね合わせるタンパク質スレッディングプログラム、ＧｅｎｅＦｏｌｄ（Ｔｒｉｐｏｓ，　Ｉｎｃ．、ミズーリ州セントルイス；Ｊａｒｏｓｚｅｗｓｋｉら，　１９９８，　Ｐｒｏｔ　Ｓｃｉ　７：１４３１－１４４０）を用いて、これらのアミノ酸配列予測を解析した。上述のように、４アルファヘリックス束（４ＡＨＢ）サイトカインファミリーメンバーは特定の三次元構造によって特徴付けられる；この４ヘリックス構造は、ＧｅｎｅＦｏｌｄなどのタンパク質スレッディングアルゴリズムを用いることによって、一次アミノ酸配列から予測可能である。タンパク質ファミリーの新規メンバーを分

類するのにＧｅｎｅＦｏｌｄを使用するため、新規タンパク質配列が、ＧｅｎｅＦｏｌｄデータベースに存在する既知のタンパク質構造（「テンプレート」構造）上にいかによくフォールディングするかを反映する見込みスコアを割り当てるプログラムに、該新規タンパク質配列を入力する。スコアリングするため、ＧｅｎｅＦｏｌｄは、一次アミノ酸配列類似性、残基の埋没パターン、局所相互作用、および二次構造比較に頼る。ＧｅｎｅＦｏｌｄプログラムは、インターロイキン－４（ＩＬ－４）、インターロイキン－６（ＩＬ－６）、顆粒球－マクロファージ・コロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、およびインターフェロン－アルファ２（ＩＦＮ－アルファ２）などのいくつかのヒトサイトカイン／増殖因子ポリペプチドの解き明かされた構造を含む、タンパク質フォールドのデータベース中のテンプレート構造すべての上に、アミノ酸配列をフォールディング（またはスレッディング）する。各比較のため、（ｉ）配列のみ；（ｉｉ）配列に加えて局所コンホメーション優先性と埋没条件；および（ｉｉｉ）配列に加えて局所コンホメーション優先性と埋没条件と二次構造、に基づいて、３つの異なるスコアを計算する。各場合で、プログラムは、最適並列を決定し、この度合いの並列が偶然起こる見込み（Ｐ値）を計算し、そしてＰ値の逆数をスコアとして報告する。したがって、これらのスコアは、新規タンパク質が多様な参照構造にマッチする度合いを反映し、そして新規タンパク質を既知のタンパク質ファミリーのメンバーに割り当てるのに有用である。ヒトゲノムデータから予測されるポリペプチドの１つ（ＩＭＸ７１８９）をＧｅｎｅＦｏｌｄプログラムにスレッディングすると、このポリペプチドに対して、最高スコアのテンプレート構造のいくつかは、サイトカインまたは増殖因子テンプレートであったが、他のアルファヘリックス含有タンパク質に対する構造類似性もまた、同定された。その後、この予測されるポリペプチド配列を用いて、これをコードするヒトＥＳＴ配列の集合を同定し、そして集合配列に基づいて、オリゴヌクレオチドプライマーを設計した。ＩＭＸ７１８９オリゴヌクレオチドプライマーを用いて、異なるヒト組織由来のＲＮＡ試料由来のｃＤＮＡの一団に対して、ＰＣＲ反応を行った。大部分の組織試料から単一のｃＤＮＡバンドが増幅されたが、骨格筋由来のｃＤＮＡの増幅は、存在しないか、または有意に減少していることが観察された。得られたヒトＩＭＸ７１８９　ｃＤＮＡ分子（配列番号１）は、配列番号２に示すアミノ酸配列を有するＩＭＸ７１８９サイトカインポリペプチドをコードし；配列番号１のヌクレオチド２０３～６１９が配列番号２をコードし、配列番号１のヌクレオチド６２０～６２２が停止コドンに相当する。ヒトＩＭＸ７１８９ポリペプチドのものに類似のアミノ酸配列がデータベース中で報告されており；例えば、ＷＯ　００／７００４７の”ＦＬＥＸＨＴ－４９”ポリペプチド（ＧｅｎｅＳｅｑ　ＡＡＢ３６６２７）、ＷＯ　０１／５３３１２の”配列番号３３９５”ポリペプチド（ＧｅｎｅＳｅｑ　ＡＡＭ４０２５０）；ＴｒＥＭＢＬデータベース寄託番号Ｑ９ＢＳＴ１およびＱ９ＮＷＫＯ、並びにＧｅｎＢａｎｋ寄託番号ＡＡＨ０４８１８、ＸＰ＿０４０８５２．１、およびＢＡＡ９１３８０．１がある。改変されたＣ末端配列を持つヒトＩＭＸ７１８９ポリペプチド変異体が、ＴｒＥＭＢＬデータベース寄託番号Ｑ９Ｐ０Ｒ６およびＧｅｎＢａｎｋ寄託番号ＮＰ＿０５７５５６中で報告されており、そしてこれらを以下にさらに論じる。２つの一部切除ＩＭＸ７１８９アミノ酸配列が、ＷＯ　００／５５１７１（ＧｅｎｅＳｅｑ　ＡＡＢ２８０００）およびＷＯ　００／６１６２０（ＧｅｎｅＳｅｑ　ＡＡＢ５１６８４）に報告されている。しかし、ヒトＩＭＸ７１８９ポリペプチドに関連する配列のこれらの開示のいずれも、開示されるポリペプチドを４ＡＨＢサイトカインとは同定しなかったし、また、アルファヘリックス構造を有するとさえ同定しなかった。続いて、ＩＭＸ１６８７４５に関連するアミノ酸配列が、ＧｅｎＢａｎｋ寄託番号ＸＭ＿０６２６３３に開示され、さらに、ＧｅｎＢａｎｋ　ＸＭ＿０６２６３３配列は、ＩＭＸ１６８７４５のアルファヘリックス束領域全体で、ＩＭＸ１６８７４５と異なり、そしてＧｅｎＢａｎｋデータベースエントリー中で、サイトカインとは同定されず、また、アルファヘリックス構造を有するとさえ同定されていなかった。続いて、ＩＭＸ１８５７８７の一部に関連するアミノ酸配列が、ＧｅｎＢａｎｋ寄託番号ＸＭ＿０６２５７５に開示され、さらに、ＧｅｎＢａｎｋ　ＸＭ＿０６２５７５配列は、ＩＭＸ１８５７８７のアルファヘリックス束

領域の大部分を欠き、そしてＧｅｎＢａｎｋデータベースエントリー中で、サイトカインとは同定されず、また、アルファヘリックス構造を有するとさえ同定されていなかった。しかし、ＩＭＸ１８８３３９のネズミ相同体に相当するようであるマウスアミノ酸配列が、ＧｅｎＢａｎｋ寄託番号ＸＭ＿１３７８６６として開示され、開示されたネズミアミノ酸配列は、ヒト配列に比較して、異質の１８３－ａａのＮ末端伸長を有するようであり、したがって、本発明のアルファヘリックスポリペプチドは、ＧｅｎＢａｎｋ　ＸＭ＿１３７８６６のアミノ酸１８４～９７７、およびサイトカインポリペプチド活性を有する、その断片である。ネズミＸＭ＿１３７８６６配列内のアルファヘリックス束領域は、この配列のほぼアミノ酸７７５～７７６の間で始まり、そしてＸＭ＿１３７８６６アミノ酸配列のほぼアミノ酸９１２～９１８の間で終わると予測される。ＩＭＸ１８８３３９のアルファヘリックス束領域を欠く、部分的ヒトアミノ酸配列が、ＥＰ　１１０４８０８　Ａ１（および関連公報ＪＰ　２００２０１０７８９）に、そして続いて、ＧｅｎＢａｎｋ寄託番号ＢＡＣ０４０８３．１に開示されている。

【０１３２】

ヒトＩＭＸ７１８９ヌクレオチド配列を用いて、ネズミＥＳＴおよびゲノム配列を組み合わせた解析を通じて、対応するネズミ相同体を同定した。異なるネズミ組織由来のＲＮＡ試料由来の一団のｃＤＮＡに対して行ったＰＣＲ反応において、予測されるマウスＩＭＸ７１８９　ｃＤＮＡ配列を用いて設計したオリゴヌクレオチドプライマーを用いた。ネズミ組織試料からも、単一のｃＤＮＡバンドの増幅が観察された。予測されるネズミＩＭＸ７１８９　ｃＤＮＡ分子（配列番号３）は、配列番号４に示すアミノ酸配列を有するネズミＩＭＸ７１８９サイトカインポリペプチドをコードし；配列番号３のヌクレオチド１８７～６１８が配列番号４をコードし、配列番号１のヌクレオチド６１９～６２１が停止コドンに相当し、そしてヌクレオチド１７２６～１７３１が、ヌクレオチド１７６６（または１７６７）～１７８２のポリ（Ａ）テールのポリアデニル化シグナルに相当するようである。ネズミＩＭＸ７１８９サイトカインポリペプチドのｃＤＮＡは、２つの潜在的なイニシエーターメチオニンをコードし、一方は配列番号４の１位であり、そしてもう一方は配列番号４の６位である。本発明の好ましい態様は、配列番号４のアミノ酸６～アミノ酸１４４のアミノ酸配列である。

【０１３３】

ＩＭＸ７１８９ヒトサイトカインコード配列を、公的に利用可能な予備的ヒトゲノムＤＮＡ配列と比較し、そして以下の染色体１４ｑ３２．３コンティグ：ＡＣ０１５８６３．３およびＡＬ３５９２４０．４が、ＩＭＸ７１８９サイトカインコード配列を含有すると同定された。ＡＣ０１５８６３．３コンティグ中のＩＭＸ７１８９サイトカインコード配列を含有するエクソンのおよその位置を、配列番号１に比較した位置とともに、以下の表に示す；表のＡＣ１５８６３．３端点周囲の括弧に示すように、配列番号１に対応する部分を越えて、コンティグ配列に沿って、５’および３’非翻訳領域をさらに伸長可能であることに注目されたい。

【０１３４】

ヒトコンティグＡＣ０１５８６３．３およびｃＤＮＡ配列におけるＩＭＸ７１８９遺伝子エクソンの対応：

【０１３５】

【表２】

IMX7189 エクソン	AC015863.3 中の位	配列番号１中の位
エクソン１	(119047)-119146	1-100
エクソン２	135266-135366	101-201
エクソン３	137825-138083	202-460
エクソン４	141103-(141270)	461-628

【０１３６】
ヒトＩＭＸ７１８９サイトカインエクソンを含んでなるゲノム配列は、ヒト染色体１４の１４ｑ３２．３領域にマッピングされる。配列番号１およびその断片などのヒトＩＭＸ７１８９核酸は、この染色体領域の細胞学的同定に有用であり、そしてこの領域に遺伝的にマッピングされている以下の障害などのヒト遺伝的障害をゲノムマッピングするのに有用である：ＩＡ型アシャー症候群（ＵＳＨ１Ａ）；常染色体劣性小眼球症（ＭＣＯＰ）；クレアチンキナーゼの脳型異所発現（ＣＫＢＥ）；ファール病（特発性大脳基底核石灰化症；ＢＧＣＩ；ＩＢＧＣ；非動脈硬化性脳石灰症；線条体淡蒼球歯状核（ｓｔｒｉｏｐａｌｌｉｄｏｄｅｎｔａｔｅ）石灰症；ＳＰＤ石灰症；脳血管鉄石灰症（ｆｅｒｒｏｃａｌｃｉｎｏｓｉｓ））；遠位１、後期遠位遺伝性ミオパシー（ＭＰＤ１）；多結節性甲状腺腫（ＭＮＧ１；甲状腺内石灰化症を伴う非毒性の甲状腺腫；青年期多結節性甲状腺腫；甲状腺機能正常甲状腺腫；単純甲状腺腫）；遺伝性良性舞踏病（ＢＣＨ；ＢＨＣ；痴呆を伴わない遺伝性進行性舞踏病）；および色盲１（ＡＣＨＭ１；桿体単色性色覚１；桿体一色型色覚１；ＲＭＣＨ１）。

【０１３７】
本明細書に開示するＩＭＸ７１８９サイトカイン配列の天然存在ゲノム変異体を含む、本発明のサイトカインポリペプチドのさらなる変異体を提供する。一例として、ヒトＩＭＸ７１８９（配列番号２）のアミノ酸１０９は、ヒトＩＭＸ７１８９の天然存在変異体のアミノ酸１０９と異なり、ここで、Ｓｅｒ残基からＰｒｏ残基への変化は、配列番号１の５２７位の「Ｔ」から「Ｃ」への単一変化によって引き起こされているようであった。本発明のヒトおよびネズミサイトカインポリペプチド間の種間アミノ酸相異を含め、この変異および他の変異を以下の表に列挙する。こうした変異は、個々に、またはいかなる組み合わせで、あるいは選択的スプライシング変異と組み合わせて、ＩＭＸ７１８９サイトカインポリペプチドまたは核酸に取り込まれることも可能である。ヒトＩＭＸ７１８９コード配列におけるさらなる改変が報告されている（例えばＧｅｎＢａｎｋ寄託番号ＮＭ＿０１６４７２を参照されたい）；この配列は、配列番号１のヌクレオチド５９３～５９６の間に挿入されてフレームシフトを生じ、ＧｅｎＢａｎｋ寄託番号ＮＰ＿０５７５５６に報告され、そして配列番号５に示されるアミノ酸配列を生じる、さらなる「Ａ」残基を示す。この改変されたヒトＩＭＸ７１８９コード配列が、天然存在ゲノム変異体に相当し、そして配列決定の誤りでないならば、配列番号５のポリペプチドは、ヒトＩＭＸ７１８９ポリペプチドとみなされるであろう。

【０１３８】

【表３】

アレル変異体アミノ酸変化 (ヒト IMX7189)	配列番号２における位	ヌクレオチド変化	配列番号１における位
なし (5' UTR 中)	n/a	A -> G	168
Ser -> Pro	109	T -> C	527

種間アミノ酸変化 (ヒト->マウス IMX7189)	配列番号２における位 (ヒト IMX7189)	配列番号４における位 (マウス IMX7189)
Cys -> Tyr	5	10
Met -> Val	8	13
Thr -> Ala	28	33
Arg -> Gln	34	39
Asn -> His	50	55
Leu -> Met	57	62
Lys -> Arg	86	91
Asp -> Glu	96	101

【０１３９】

本発明のヒトおよびネズミサイトカインポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号２および４）を、互いに、そして関連ポリペプチドと、ＧＣＧ［ｐｒｅｔｔｙ］多数配列並列プログラム、アミノ酸類似性スコアリングマトリックス＝ｂｌｏｓｕｍ６２、ギャップ生成ペナルティ＝８、およびギャップ伸長ペナルティ＝２を用いて比較した。これらの配列の並列を表１に示し、そしてこの並列には、並列中の４つのアミノ酸配列間で同一であるコンセンサス残基が含まれる。並列中の大文字の残基は、コンセンサス残基にマッチするものである。ＩＭＸ７１８９サイトカインアミノ酸配列（例えば配列番号２および４）に対するアミノ酸置換および他の改変（欠失、挿入など）は、表に示すようなアミノ酸配列の大文字の残基に変化を生じるならば、そして特に、これらの変化が、類似の化学的特性のアミノ酸（脂肪族残基－Ａｌａ、Ｇｌｙ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、またはＶａｌ－のいずれか１つの別の脂肪族残基での置換など）、またはその保存される位で、他のサイトカインポリペプチドに存在する残基で置換しないならば、ＩＭＸ７１８９サイトカインポリペプチド活性を改変または破壊する可能性がより高いと予測される。逆に、ＩＭＸ７１８９サイトカインアミノ酸配列に対する変化が、並列におけるその位での表１の他のサイトカインポリペプチド配列の１つ由来の残基の置換を生じるならば、こうした改変が、改変されたＩＭＸ７１８９サイトカインポリペプチドの機能に影響を及ぼす可能性はより低い。例えば、表１の５８位ではコンセンサス残基はグルタミン酸（Ｇｌｕ）であるが、ＩＭＸ７１８９関連ポリペプチドの１つはその位でロイシン（Ｌｅｕ）を有する；その位のグルタミン酸に対して、化学的に類似のアスパラギン酸（Ａｓｐ）、あるいはロイシンまたは別の脂肪族アミノ酸で置換すると、トリプトファンまたはチロシンなどでの置換よりも、ポリペプチドの機能を改変する可能性はより低い。本発明の態様には、改変されたアミノ酸配列を含んでなる、本発明のサイトカインポリペプチドおよび本発明のサイトカインポリペプ

チドの断片が含まれる。改変されたＩＭＸ７１８９サイトカインポリペプチド配列は、表１に示すサイトカインアミノ酸配列の１以上と、少なくとも３０％、またはより好ましくは少なくとも４０％、またはより好ましくは少なくとも５０％、またはより好ましくは少なくとも５５％、またはより好ましくは少なくとも６０％、またはより好ましくは少なくとも６５％、またはより好ましくは少なくとも７０％、またはより好ましくは少なくとも７５％、またはより好ましくは少なくとも８０％、またはより好ましくは少なくとも８５％、またはより好ましくは少なくとも９０％、またはより好ましくは少なくとも９５％、またはより好ましくは少なくとも９７．５％、またはより好ましくは少なくとも９９％、または最も好ましくは少なくとも９９．５％のアミノ酸同一性を共有する。アレル変異体または意図的に操作した修飾を有する本発明のサイトカインポリペプチドなどの、本発明記載のＩＭＸ７１８９サイトカインポリペプチド変異体を、本明細書にさらに記載するように、ＧｅｎｅＦｏｌｄを用いて解析すると、３種類のＧｅｎｅＦｏｌｄスコアリング法の１つで、１０の最上スコアのテンプレート構造の少なくとも１つは、サイトカインまたは増殖因子ポリペプチドであろう。最上スコアサイトカインまたは増殖因子テンプレート構造のスコアは、ＧｅｎｅＦｏｌｄに報告される３種類のスコアのいずれか（配列のみ、配列に加えて局所コンホメーション優先性と埋没条件、または配列に加えて局所コンホメーション優先性と埋没条件と二次構造）を用いて、好ましくは少なくとも２０、より好ましくは少なくとも３０、より好ましくは少なくとも４０、さらにより好ましくは少なくとも５０、そして最も好ましくは少なくとも６０であろう。

【０１４０】

表１：関連ポリペプチドとＩＭＸ７１８９サイトカインのアミノ酸配列並列

【０１４１】

【表４ａ】

	配列番号	1 . 50
hIMX7189	NO:2	~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~m etDcnpmElS Sm...sGfee GseLnGfegt
hIMX7189v	NO:5	~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~m etDcnpmElS Sm...sGfee GseLnGfegt
mIMX7189	NO:4	~~~~~~~~~~ ~~~~mgarrm etDynpvElS Sm...sGfee GseLnGfega
ceQ22757	NO:10	~~~~~~~~~~ ~~~~~mtqqs dkDasvsEtt tppttpvtvk kpaLcGscdc
ceQ9XWX6	NO:11	mlksepipcl rcgnvgsptg svpmslhkvS SinrsaGt.. npasrGg...
dmQ9V8F3	NO:12	~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~malvqs
dmQ9VNV2	NO:13	~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~m Gepkatadpg
コンセンサス		---------- ---------- --D----E-S S-----G--- G--L-G----
		51 100
hIMX7189	NO:2	DmkDmrLEaE Av..VNDVlF AVNnmfVSks LrcadDVAYI NVeTkErnrY
hIMX7189v	NO:5	DmkDmrLEaE Av..VNDVlF AVNnmfVSks LrcadDVAYI NVeTkErnrY
mIMX7189	NO:4	DmkDmqLEaE Av..VNDVlF AVNhmfVSks mPcadDVAYI NVeTkErnrY
ceQ22757	NO:10	DvekstLEeE AmaaVrenaF AVNligVSem LPrtsqllfI NVtTfEnhth
ceQ9XWX6	NO:11	...essLElE AiaaVhelsF AVqsisVSem LPrtpDlifv NVtTlEaqpY
dmQ9V8F3	NO:12	DenDfhalrE AqrmVdscqd fadhliVaef LPhcrgVAYI NirTlEqviY
dmQ9VNV2	NO:13	eeqafncEdE AnaiiNDVka hVaeiciSsk LasdatqiYl NirTiEsatc
コンセンサス		D--D--LE-E A---VNDV-F AVN---VS-- LP---DVAYI NV-T-E---Y
		101 150
hIMX7189	NO:2	CLELTeAGlk VVgYaFD.qV dD....hL.. ....q TpYhETvYsL
hIMX7189v	NO:5	CLELTeAGlk VVgYaFD.qV dD....hL.. ....q TpYhETvYsL
mIMX7189	NO:4	CLELTeAGlR VVgYaFD.qV eD....hL.. ....q TpYhETvYsL
ceQ22757	NO:10	CiELTqkGwR VaSnrnDcmn gDfrqldi.. ....h TkYfEslhtL
ceQ9XWX6	NO:11	CLELTlkGwR itSlrsDcmV gDftrleL.. ....f TkYydslYlL
dmQ9V8F3	NO:12	CvqLsrAGyR iVSYeFDdva devancd... .... TvY.EsahqL
dmQ9VNV2	NO:13	CvqvssrGfk iVSsqyDtid eDsrisaLlr ngqeqgddee eeifETpYaL
コンセンサス		CLELT-AG-R VVSY-FD--V -D-----L-- ---------- T-Y-ET-Y-L
		151 200
hIMX7189	NO:2	LDtlSPaYRE aFG...naLL QRLEalkrdg qs~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~
hIMX7189v	NO:5	LDtlSPaYRE aFG...naLL QRLEsfekrw tvmttlfpfr gagagtec~~

【０１４２】

【表４ｂ】

mIMX7189	NO:4	LDtlSPaYRE aFG...naLL QRLEalkrdg qs~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~
ceQ22757	NO:10	LmdISPlfRE tFG...skLi skLselkker sdsde~~~~~ ~~~~~~~~~~
ceQ9XWX6	NO:11	mDdISPgYRE rFs...ekLv QRLkli..ea geedqvapca slqspslstd
dmQ9V8F3	NO:12	LagISPlYgE kyGfgrepLg kRkEkqs~~~ ~~~~~~~~~~ ~~~~~~~~~~
dmQ9VNV2	NO:13	LDkISPrYvE sFGnqlcqqL raLqqmrtef needeeeeee aeeeekk~~~
コンセンサス		LD-ISP-YRE -FG-----LL QRLE------ ---------- ----------

【０１４３】

表２は、上述のＧｅｎｅＦｏｌｄプログラムを、他の解析法と組み合わせて用いることによって、既知の４ＡＨＢサイトカインに類似の構造を有すると同定されたアミノ酸配列の組を示す。この解析に基づいて、表２に示す配列番号６～９のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドを、ヒト４ＡＨＢサイトカインファミリーの潜在的なメンバーとみなす。

【０１４４】

ＩＭＸ１６８７４５ポリペプチド（配列番号６）は、配列番号６のアミノ酸１～ほぼアミノ酸２５のシグナル配列を有し、配列番号８のアミノ酸２６が成熟ポリペプチドのＮ末端アミノ酸である。配列番号６のほぼアミノ酸７５で始まり、ほぼアミノ酸２５５までの、ＩＭＸ１６８７４５ポリペプチドの領域は、ＧｅｎｅＦｏｌｄにおいて、ＩＬ－６の構造に最高スコアのマッチを示す。配列番号６のアミノ酸２８～２６６はまた、ハツカネズミ（Ｍｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ）ゲノムの推定上のコード領域に有意な度合いの類似性を示す。

【０１４５】

配列番号７のほぼアミノ酸４０で始まり、ほぼアミノ酸２４０までの、ＩＭＸ１８５７８７ポリペプチドの領域は、ＧｅｎｅＦｏｌｄにおいて、ＩＬ－３およびＩＬ－４の構造に最高スコアのマッチを示す。配列番号７のアミノ酸９７～２６６もまた、ハツカネズミゲノムの推定上のコード領域に有意な度合いの類似性を示す。

【０１４６】

配列番号８のほぼアミノ酸５８５で始まり、ほぼアミノ酸７３５までの、ＩＭＸ１８８３３９ポリペプチドの領域は、ＧｅｎｅＦｏｌｄにおいて、ＬＩＦの構造に最高スコアのマッチを示す。ＩＭＸ１８８３３９ポリペプチドをコードすると予測されるエクソンの少なくともいくつかは、ハツカネズミゲノムの推定上のコード領域に有意に類似である。配列番号８内に、いくつかの潜在的なイニシエーターメチオニン残基があり、したがって本発明の好ましい態様は、配列番号８のアミノ酸１～アミノ酸７３５、配列番号８のアミノ酸３８～アミノ酸７５３、配列番号８のアミノ酸７１～アミノ酸７５３、配列番号８のアミノ酸１１４～アミノ酸７５３、配列番号８のアミノ酸１４５～アミノ酸７５３、配列番号８のアミノ酸２１６～アミノ酸７５３、配列番号８のアミノ酸３１３～アミノ酸７５３、配列番号８のアミノ酸３３２～アミノ酸７５３、配列番号８のアミノ酸５０４～アミノ酸７５３、配列番号８のアミノ酸５０５～アミノ酸７５３、配列番号８のアミノ酸５５８～アミノ酸７５３、配列番号８のアミノ酸５５９～アミノ酸７５３、および配列番号８のアミノ酸５６９～アミノ酸７５３である。配列番号８のアミノ酸７５４は、ある配列決定実験で、バリン残基であることが決定されたが、これは、この位でのヒスチジンおよびバリン間のアレル変異に相当する可能性がある。ＩＭＸ１８８３３９コード配列に基づくオリゴヌクレオチドプローブを用いて、組織特異的ｃＤＮＡパネルから、ＩＭＸ１８８３３９　ｃＤＮＡのＰＣＲ増幅を行った：ＩＭＸ１８８３３９　ｃＤＮＡは、成人膵臓および成人精巣、および胎児脳から作成したｃＤＮＡライブラリーから一貫して増幅され、これによって、これらの組織におけるＩＭＸ１８８３３９　ｍＲＮＡの発現が示された。

【０１４７】

ＩＭＸ１９２９６７ポリペプチド（配列番号９）のほぼアミノ酸２５から始まって、ほぼアミノ酸１８０までの領域は、ＧｅｎｅＦｏｌｄにおいて、ＩＬ－４、インターフェロン・タウ、およびＩＬ－６の構造に高スコアマッチを示す。

【０１４８】

表２

【０１４９】

【表５ａ】

識別子:	アミノ酸配列:
IMX168745 配列番号 6	MNCLRSCGCS VLVCLLAGAL LGSTGMHWHL LGLTELGSKL RVRFQSAVSP PSGAAEKASL KLKHTNPFPR RGVALGAKPL RSENSQAAAA FNSSEEGECE QMRQELECVN TPEPAGCFGA GGSEHSTHSN PLGSVPRGRE RAGYPTEKGY HTERCVQGLL KLGLDTGIGI HPLYSITKAS HKVSPDLKGE EEALPLDGSS CKVNIVKYVE TGKGSEEKRN VREEQAVAAG REWVEQSLQL FREKKGALAQ AQEVSLGADV GRNPRISTCG TERSAWQIQS YSDSNVTA
IMX185787 配列番号 7	MSQTKPDLVK INRRKAKSDC FKMRKIFQDI IMKNIVVLTF SPASGSSTRR KAQLLSDGVK PLDWERRTLQ QFCGVGTANQ LCRTLGPCVS APGGKGEEDV TKVYNTKGRV TMSQELTKEQ KVFYKMVQQL LKAIQCTVES EALHKLMLLI WQECPWLHDQ GTLDLKLREQ LAIQVWKRIP VGQSQGSFVM VRQDATETYI EFINQLQAAI KRQAKIFHYV DDILIAAQYQ SLLHQLYTMM IQEKQKRQVD HYEEDTLGNG RINGRI
IMX188339 配列番号 8	MNTSRFADHH DLLTETKRPI DTVISQQAFY SDESVSAMEK QYLRNSNLTP QQKIDELHHG FTGLDLEEQW MYPSRSDHSN CHNIQTNDTA KTTFQEYPLI KNCFTPQTGL SDIMKESGVD IYHYGRDRIC TKGLEAPLQQ KRAEMFLSQF NRYNENVDYC RYPEYVHPNK AKLNKCSNFS VQDSKKLANG TPETPTVEAD TYTKLFQVKP ANQKKMEETI PDQQNFTFPK TTPHLTEKQF AKEAVFTADF GLTSEYGLKP HTACPANDFA NVTEKQQFAK PDPPHSEYFK SVNLLSNSAT SSGGIDLNRP TWMNVQTKNN TPIPYRNQGN LMKLNSHLSA ASKGSNHSSD FPQLSSTNLT PNSNLFQKYC QENPSAFSSF DFSYSGAERI QSVNHIEGLT KPGEENLFKL VTDKKIKQPN GFCDNYSAQK YGIIENVNKH NFQAKPQSGH YDPEEGPKHL DGLSQNTYQD LLESQGHSNS HRTRGGDNSR VNRTQVSCFS NNYMMGDLRH NQCFQQLGSN GFPLRSTHPF GHSVVPLLDS YDLLSYDDLS HLYPYFNMMY GDNSFSGLMP TFGFQRPIKT RSGPASELHI RLEECCEQWR ALEKERKKTE LALAKNYPGK KVSSTNNTPV PRLTSNPSRV DRLIVDELRE LARVVTLLGK MERLRSSLLH ASISTALDRH LESIHIVQSR RKDEIVNASN RQRQGVPRCQ DDRDVFALAS AIKEMCVATR KTRTALWCAL QMTLPKTAST ADVHKPLQDT VNCEDKVHES INSSNPMNQR GETNKH
IMX192967 配列番号 9	GVVRSAVQLF PGTTGSCPLW LSSHRSQATV REALASVARL AANGGVGWSG RPSSNKSGTT GLEADRRHEV CYCAAAAALK LCEAIDLTSM NHNTIDLVSD HCESRNLNSE QQEVKYWLMR MFVCLVSLLI SVLGAGACLA ALESWTISEE LQFFWKKGHW SSMAILASAR RQQTQINRLS PKSSAPICKL LDPKTGCFPS

【０１５０】

【表５ｂ】

	WKVIVFFSFE KRDSYEFGSS RGLVLWEVPF LKGGDKAWRK FGHSLFKDAG LVKMGRHEVI NNFLSLFFST VPHISCVSWK RQASGPW

【０１５１】

（実施例２）

リアルタイム定量的ＰＣＲによるＩＭＸ７１８９サイトカイン発現の解析

多様な組織供給源から、そして多様な化合物で処理した細胞または組織から、ＲＮＡ試料を得た；これらのＲＮＡ試料には、商業的に入手可能なＲＮＡ（Ａｍｂｉｏｎ、テキサス州オースティン；Ｃｌｏｎｔｅｃｈ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、カリフォルニア州パロアルト；およびＳｔｒａｇｅｎｅ、カリフォルニア州ラホヤ）が含まれた。ＲＮＡ試料をＤＮアーゼ（製品番号１９０６、Ａｍｂｉｏｎ、テキサス州オースティン）処理して、そしてランダムヘキサマーを用い、製造者の指示にしたがって、ＴａｑＭａｎ逆転写試薬（製品番号Ｎ８０８－０２３４、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、カリフォルニア州フォスターシティー）を用いて、ｃＤＮＡ分子集団に逆転写した。ｃＤＮＡ分子の各集団を、ウェルあたり５ｎｇまたは２０ｎｇいずれかでマルチウェルプレートの特定のウェルに入れ、そして３つ組で実験を行った。同一の組織種および刺激条件を適用するが、異なるドナーから収集した場合、プールを行った。試料の各マルチウェルプレートに陰性対照ウェルを含んだ。

【０１５２】

Ｐｒｉｍｅｒ Ｅｘｐｒｅｓｓソフトウェア（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、カリフォルニア州フォスターシティー）を用いて、ヒトＩＭＸ７１８９（配列番号２）ポリペプチドをコードするｍＲＮＡに相補的なプローブおよびオリゴヌクレオチドプライマーの組を設計し、そして合成し、そしてほぼ２０周期および３６周期の間のすべての熱周期で、ＰＣＲ産物が安定に、そして対数的に増加して産生されるように、これらのプローブ／プライマーの組のＰＣＲ条件を最適化した。用いた順方向ＩＭＸ７１８９プライマーは、５’ ＡＧＡ ＧＣＴ ＧＡＡ ＣＧＧ ＴＴＴ ＴＧＡ ＡＧＧ Ａ ３’（配列番号１４）であり；用いた逆方向ＩＭＸ７１８９プライマーは、５’ ＣＡＡ ＡＧＡ ＧＡＡ ＣＡＴ ＣＡＴ ＴＴＡ ＣＡＡ ＣＴＧ ＣＴＴ ３’（配列番号１５）であり；そしてヒトＩＭＸ７１８９に用いた標識プローブは、５’ ＡＧＣ ＴＴＣ ＧＡＧ ＣＣＴ ＣＡＴ ＧＴＣ ＴＴＴ ＣＡＴ ＧＴＣ ＡＧ ３’（配列番号１６）であった。１８Ｓ ＲＮＡ、並びに特定の「ハウスキーパー」タンパク質－ベーター－アクチン、ＨＰＲＴ（ヒポキサンチン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ）、ＤＨＦＲ（ジヒドロ葉酸レダクターゼ）、ＰＫＧ（ホスホグリセリン酸キナーゼ）、およびＧＡＰＤＨ（グリセロアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ）－をコードするｍＲＮＡに相補的なオリゴヌクレオチドプライマーの組を合成し、そしてこれらのプライマーの組に関してもまた、ＰＣＲ条件を最適化した。Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ Ｐｒｉｓｍ ７７００配列検出系上、ＴＡＱＭＡＮユニバーサルＰＣＲマスターミックス（製品番号４３０４４３７、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、カリフォルニア州フォスターシティー）を用いて、２５マイクロリットル体積中に、ヒトＩＭＸ７１８９およびＧＡＰＤＨプローブ／プライマーの組を両方用いたマルチプレックスＴＡＱＭＡＮ ＰＣＲ反応をセットアップした。ＧＡＰＤＨへのＩＭＸ７１８９の相対的発現比較のため、Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ｄｅｔｅｃｔｏｒソフトウェア、バージョン１．７ａ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、カリフォルニア州フォスターシティー）を用いて、閾値周期値（C_T）を決定し、そしてデルタC_Tを計算して、２をマイナスデルタC_Tに乗じる、２Ｅ（－ｄC_T）に変換した。

【０１５３】

ＧＡＰＤＨ発現に比較したヒトＩＭＸ７１８９発現を、多様な成人および胎児ＲＮＡ試

料で解析した。この解析によって、ヒトＩＭＸ７１８９メッセージが、試験した成人組織および胎児組織で検出可能である（しかしハウスキーパーｍＲＮＡよりも豊富でない）ことが確認され、ＧＡＰＤＨ発現に比較したＩＭＸ７１８９メッセージレベルは、一般的にＧＡＰＤＨレベルの０．１％～４％の間であった。成人骨格筋は、より低い相対発現レベルを有し、ＧＡＰＤＨのほぼ０．０２％であり、これは、骨格筋からヒトＩＭＸ７１８９ＲＮＡを増幅するのにＰＣＲを用いた際に、上述の実施例１に記載する結果と一致した。結腸および膵臓などの特定の組織は、ＧＡＰＤＨ発現に比較して、有意なレベルのＩＭＸ７１８９メッセージレベル（それぞれ、ＧＡＰＤＨに比較して１０％および６％）を示し、一方、脾臓および甲状腺組織で、最高レベルのヒトＩＭＸ７１８９発現（それぞれ、ＧＡＰＤＨに比較して５０％および７３％）が観察された。さらに、ヒトＩＭＸ７１８９メッセージ発現は、未処置（ＣＤ４＋　ＣＤ２５－　ＣＤ４５ＲＯ低）Ｔ細胞で、ＧＡＰＤＨに比較して３．７％であって、記憶（ＣＤ４＋　ＣＤ２５－　ＣＤ４５ＲＯ高）または制御（ＣＤ４＋　ＣＤ２５＋）Ｔ細胞（それぞれ、ＧＡＰＤＨに比較して２．０％および１．８％）よりいくぶん高いようであった。

【０１５４】

さらなるＲＮＡ試料におけるハウスキーパー遺伝子発現に比較した、ヒトＩＭＸ７１８９発現解析によって、いくつかの細胞種において、インターフェロン・ガンマ（ＩＦＮｇ）で処理した細胞では、ヒトＩＭＸ７１８９発現の検出可能な増加があることが示された。例えば、ヒト上皮結腸癌腫細胞株Ｔ８４では、ＩＬ－４およびＩＬ－１３の混合物、またはＩＬ－１、ＩＬ－１８、およびＴＮＦアルファの混合物などのサイトカインでの処理は、ヒトＩＭＸ７１８９発現の相対レベルを強くは改変しなかったが、ＩＦＮｇでの処理は、ヒトＩＭＸ７１８９発現をＧＡＰＤＨ発現レベルの１．６％から５．５％に増加させた。ヒト上皮肺腺癌細胞株Ｃａｌｕ３と同様、未刺激細胞では、ヒトＩＭＸ７１８９発現はＧＡＰＤＨの１．１％であり；ＩＬ－４／ＩＬ－１３またはＩＬ－１／ＩＬ－１８／ＴＮＦでの処理は、ＩＭＸ７１８９発現をＧＡＰＤＨの１．２％または１．９％に増加させ、一方、ＩＦＮｇは、ヒトＩＭＸ７１８９発現をＧＡＰＤＨの２．７％に増加させた。

【０１５５】

（実施例３）

本発明のポリペプチドに結合するモノクローナル抗体

本実施例は、本発明のサイトカインポリペプチドに結合するモノクローナル抗体を調製する方法を例示する。米国特許第４，４１１，９９３号に記載されるものなどの他の慣用的な技術を使用可能である。こうした抗体を生成するのに使用可能な適切な免疫原には、限定されるわけではないが、本発明の精製サイトカインポリペプチド、その免疫原断片、および高レベルの前記サイトカインポリペプチドまたはその免疫原断片を発現する細胞が含まれる。本発明のサイトカインポリペプチドをコードするＤＮＡもまた、例えばＰａｒｄｏｌｌおよびＢｅｃｋｅｒｌｅｇによって、Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　３：１６５，　１９９５に概説されるように、免疫原として使用可能である。

【０１５６】

げっ歯類（例えばＢＡＬＢ／ｃマウスまたはＬｅｗｉｓラット）を、アジュバント（完全または不完全フロイントアジュバント、ミョウバン、またはＲｉｂｉアジュバントＲ７００（Ｒｉｂｉ、モンタナ州ハミルトン）などの別のアジュバント）中で乳化したサイトカインポリペプチド免疫原で免疫し、そして１０～１００マイクログラムの範囲の量を皮下または腹腔内注射する。ＤＮＡは皮内（Ｒａｚら，　１９９４，　Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ　９１：９５１９）または筋内（Ｗａｎｇら，　１９９３，　Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ　９０：４１５６）投与可能である；生理食塩水は、ＤＮＡに基づく抗原の適切な希釈剤であることが見出されている。１０日～３週間後、毎週、隔週、または３週間ごとの免疫スケジュールで、さらなる免疫原および定期的な追加免疫で、免疫動物に追加免疫する。

【０１５７】

後眼窩出血または尾先端切除によって、血清試料を定期的に採取し、ドットブロットア

ッセイ、ＥＬＩＳＡ（酵素連結免疫吸着アッセイ）、免疫沈降、またはサイトカインポリペプチド結合パートナーへの本発明のサイトカインポリペプチドの結合阻害をＦＡＣＳ解析するなどの他の適切なアッセイによって、サイトカインポリペプチド特異的抗体に関して試験する。適切な抗体力価を検出した後、陽性動物に、生理食塩水中の本発明のサイトカインポリペプチドを最後に一度、静脈内注射する。３～４日後、動物を屠殺し、そして脾臓細胞を採取し、そしてネズミ骨髄腫細胞株、例えばＮＳ１または好ましくはＰ３Ｘ６３Ａｇ８．６５３（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１５８０）に融合させる。これらの細胞融合によってハイブリドーマ細胞が生成され、これを、非融合細胞、骨髄腫ハイブリッド、および脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害するＨＡＴ（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン）選択培地中、マルチマイクロタイタープレートに蒔く。

【０１５８】

ハイブリドーマ細胞は、Ｅｎｇｖａｌｌら（Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍ．　８：８７１，１９７１）および米国特許第４，７０３，００４号に開示される技術の適応によって、精製した本発明のサイトカインポリペプチドに対する反応性に関して、ＥＬＩＳＡによってスクリーニングすることが可能である。好ましいスクリーニング技術は、Ｂｅｃｋｍａｎｎら（Ｊ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　１４４：４２１２，　１９９０）に記載される抗体捕捉技術である。陽性ハイブリドーマ細胞を、同系げっ歯類に腹腔内注射して、高濃度の（例えばミリリットルあたり１ミリグラムを越える）抗サイトカインポリペプチドモノクローナル抗体を含有する腹水を産生することが可能である。あるいは、ハイブリドーマ細胞を、多様な技術によって、フラスコまたはローラーボトル中、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで増殖させてもよい。モノクローナル抗体は、硫酸アンモニウム沈殿によって、続いてゲル排除クロマトグラフィーによって、精製可能である。あるいは、プロテインＡまたはプロテインＧに対する抗体の結合に基づくアフィニティークロマトグラフィーもまた使用可能であり、本発明のサイトカインポリペプチドへの結合に基づくアフィニティークロマトグラフィーも使用可能である。

【０１５９】

（実施例４）

本発明のサイトカインをコードする核酸発現のアンチセンス阻害

本発明にしたがって、オリゴヌクレオチド設計の基礎として、配列番号１および３のヌクレオチド配列、並びに配列番号６～９をコードする核酸を用いて、本発明のサイトカインポリペプチドをコードするｍＲＮＡ分子の異なる領域を標的とする、一連のオリゴヌクレオチドを設計する。本発明のサイトカインポリペプチドのすべてをコードするｍＲＮＡ、またはそのサブセットをコードするｍＲＮＡ分子にハイブリダイズするであろう縮重オリゴヌクレオチドのプールなどのオリゴヌクレオチド配列を選択可能である。オリゴヌクレオチドは、長さおよそ１０、１２、１５、１８、またはより好ましくは２０ヌクレオチド残基であるように、そして少なくとも３７℃の予測されるハイブリダイゼーション温度を有するように選択する。好ましくは、いくつかがｍＲＮＡ分子の５’領域にハイブリダイズし、他のものがコード領域に、そしてさらに他のものがｍＲＮＡ分子の３’領域にハイブリダイズするであろうように、オリゴヌクレオチドを選択する。ＧｒａｙおよびＣｌａｒｋ（米国特許第５，８５６，１０３号および第６，１８３，９６６号）のものなどの方法を用いて、標的配列と最も安定なハイブリッド構造を形成するオリゴヌクレオチドを選択可能である。これはこうしたオリゴヌクレオチドがアンチセンス阻害剤として使用するのに望ましいためである。

【０１６０】

オリゴヌクレオチドは、全体がホスホロチオエート主鎖（ヌクレオシド間連結）を持つオリゴデオキシヌクレオチドであることが可能であるし、または多様な異なる種類のヌクレオシド間連結を有することが可能である。一般的に、多様な化学的修飾オリゴヌクレオチドの調製法、精製法、および使用法が米国特許第５，９４８，６８０号に記載される。修飾オリゴヌクレオシドもまた、オリゴヌクレオチド合成に使用可能であり、例えば、メチレンメチルイミノ連結オリゴヌクレオシド、メチレン－ジメチルヒドラゾ連結オリゴヌ

クレオシド、メチレン－カルボニルアミノ連結オリゴヌクレオシド、およびメチレン－アミノカルボニル連結オリゴヌクレオシドと共に、例えば交互にＭＭＩおよびＰ＝Ｏまたは Ｐ＝Ｓ連結を有する混合主鎖化合物があり、これらは、米国特許第５，３７８，８２５号、第５，３８６，０２３号、第５，４８９，６７７号、第５，６０２，２４０号および第５，６１０，２８９号に記載されるように調製される。ホルムアセチルおよびチオホルムアセチル連結オリゴヌクレオシドもまた、使用可能であり、そしてこれらは米国特許第５，２６４，５６２号および第５，２６４，５６４号に記載されるように調製され；そして、エチレンオキシド連結オリゴヌクレオシドもまた、使用可能であり、そしてこれは米国特許第５，２２３，６１８号に記載されるように調製される。上述のオリゴヌクレオチドと同じ方式で、ペプチド核酸（ＰＮＡ）が使用可能であり、そしてこれらは、Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ（ＰＮＡ）：Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ ａｎｄ Ｐｏｔｅｎｔｉａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ ＆ Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１９９６，４，５－２３；並びに米国特許第５，５３９，０８２号、第５，７００，９２２号、および第５，７１９，２６２号に引用される多様な方法のいずれかにしたがって調製される。

【０１６１】

本発明のキメラオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、または混合オリゴヌクレオチド／オリゴヌクレオシドは、いくつかの異なる種類であることが可能である。これらには、連結ヌクレオチドの「ギャップ」セグメントが連結ヌクレオシドの５’および３’「ウィング」セグメントの間に配置される第一の種類、並びに「ギャップ」セグメントがオリゴマー化合物の３’または５’末端いずれかに位置付けられる第二の「オープン端」型が含まれる。第一の種類のオリゴヌクレオチドはまた、当該技術分野において、「ギャップマー」またはギャップ化オリゴヌクレオチドとしても知られる。第二の種類のオリゴヌクレオチドはまた、当該技術分野において、「ヘミマー」または「ウィングマー」としても知られる。異なる種類のキメラオリゴヌクレオチドを、米国特許第５，９４８，６８０号にしたがって調製可能である。１つの好ましい態様において、両端（５’および３’方向）で４ヌクレオチド「ウィング」が隣接する、１０の２’デオキシヌクレオチドからなる中央「ギャップ」領域で構成される、長さ１８ヌクレオチドのキメラオリゴヌクレオチド（「ギャップマー」）を利用する。ウィングは２’－メトキシエチル（２’－ＭＯＥ）ヌクレオチドで構成される。ヌクレオシド間（主鎖）連結は、オリゴヌクレオチド全体でホスホロチオエート（Ｐ＝Ｓ）である。２’－ＭＯＥウィング中のシチジン残基は、５－メチルシチジンである。他のキメラオリゴヌクレオチド、キメラオリゴヌクレオシド、および混合キメラオリゴヌクレオチド／オリゴヌクレオシドは、米国特許第５，６２３，０６５号にしたがって合成する。オリゴヌクレオチドは、好ましくは、標準的９６ウェル形式の自動化合成装置上、固相Ｐ（ＩＩＩ）ホスホロアミダイト化学合成を介して合成される。試料希釈およびＵＶ吸光分光法によって、各ウェルのオリゴヌクレオチド濃度を評価する。個々の産物の全長完全性をキャピラリー電気泳動によって評価し、そしてエレクトロスプレー質量分析を利用した化合物のマス解析によって、塩基および主鎖組成を確認する。

【０１６２】

標的核酸発現に対するアンチセンス化合物の影響は、標的核酸が測定可能なレベルで存在する限り、多様な細胞種のいずれでも試験可能である。これは、例えば、ＰＣＲまたはノーザンブロット解析を用いて、日常的に測定可能である。細胞は、供給者に推奨されるように、１０継代まで日常的に維持する。細胞が８０％～９０％集密に達したら、オリゴヌクレオチドで処理する。９６ウェルプレートで増殖させた細胞に関しては、２００マイクロリットルのＯＰＴＩ－ＭＥＭ－１血清減少培地（Ｇｉｂｃｏ ＢＲＬ）でウェルを１度洗浄し、そしてその後、３．７５ｇ／ｍｌ ＬＩＰＯＦＥＣＴＩＮ（Ｇｉｂｃｏ ＢＲＬ）および最終濃度１５０ｎＭの所望のオリゴヌクレオチドを含有する１３０マイクロリットルのＯＰＴＩ－ＭＥＭ－１で処理する。４時間の処理後、培地を新鮮な培地と交換する。オリゴヌクレオチド処理の１６時間後、細胞を採取する。好ましくは、オリゴヌクレ

オチドが標的核酸分子の異なる部分にハイブリダイズする場合、標的核酸発現を最大の度合いで阻害するオリゴヌクレオチドを同定するため、いくつかの異なるオリゴヌクレオチドの影響を同時に試験すべきである。

【０１６３】

サイトカイン核酸発現のアンチセンス調節は、当該技術分野に知られる多様な方法でアッセイ可能である。例えば、サイトカインｍＲＮＡレベルは、例えばノーザンブロット解析、競合的ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、またはリアルタイムＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）によって、定量化可能である。リアルタイム定量的ＰＣＲが現在好ましい。ＲＮＡ解析は、総細胞ＲＮＡまたはポリ（Ａ）＋ｍＲＮＡに対して行うことが可能である。ＲＮＡ単離法およびノーザンブロット解析法は、例えば、Ａｕｓｕｂｅｌ，Ｆ．Ｍ．ら，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，第１巻，ｐｐ．４．１．１－４．２．９および４．５．１－４．５．３，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，１９９６に解説される。リアルタイム定量的（ＰＣＲ）は、商業的に入手可能なＡＢＩ ＰＲＩＳＭ ７７００配列検出系を用いて、好適に達成可能であり、この系は、ＰＥ－Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、カリフォルニア州フォスターシティーから入手可能であり、そして製造者の指示にしたがって用いられる。この蛍光検出系は、ＰＣＲ産物の高処理定量化を可能にする。ＰＣＲが完了した後に増幅産物を定量化する標準的ＰＣＲとは逆に、リアルタイム定量的ＰＣＲの産物は、集積するにつれて定量化される。これは、順方向および逆方向ＰＣＲプライマー間に特異的にアニーリングし、そして２つの蛍光色素を含有するオリゴヌクレオチドプローブをＰＣＲ反応に含むことによって、達成される。レポーター色素（例えばＯｐｅｒｏｎ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｉｎｃ．、カリフォルニア州アラメダ、またはＰＥ－Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、カリフォルニア州フォスターシティーいずれかから得られる、ＪＯＥまたはＦＡＭ）をプローブの５’端に付着させ、そして消光剤色素（例えばＯｐｅｒｏｎ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｉｎｃ．、カリフォルニア州アラメダ、またはＰＥ－Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、カリフォルニア州フォスターシティーいずれかから得られる、ＴＡＭＲＡ）をプローブの３’端に付着させる。プローブおよび色素が損なわれていなければ、レポーター色素発光は、３’消光剤色素が近接していることによって、消光される。増幅中、標的配列へのプローブのアニーリングにより、Ｔａｑポリメラーゼの５’エキソヌクレアーゼ活性によって切断可能な基質が生じる。ＰＣＲ増幅周期の伸長期中、Ｔａｑポリメラーゼによるプローブの切断が、残りのプローブから（そしてしたがって消光剤部分から）レポーター色素を放出し、そして配列特異的蛍光シグナルが生成される。各周期で、さらなるレポーター色素分子が各プローブから切断され、そしてＡＢＩ ＰＲＩＳＭ ７７００配列検出系に内蔵されたレーザー光学装置によって規則的な（６秒間）間隔で、蛍光強度を監視する。各アッセイで、未処理対照試料由来のｍＲＮＡの連続希釈を含有する、一連の平行反応によって、標準曲線を生成し、これを用いて、試験試料をアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理した後の阻害パーセントを定量化する。定量的ＰＣＲ解析の他の方法もまた、当該技術分野に知られる。本発明のサイトカインポリペプチドレベルは、当該技術分野に周知の多様な方法によって定量化可能であり、これらには、免疫沈降、ウェスタンブロット解析（イムノブロッティング）、ＥＬＩＳＡ、または蛍光活性化細胞分取（ＦＡＣＳ）がある。本発明のサイトカインポリペプチドに向けられる抗体は、本明細書に記載するものなどの慣用的抗体生成法を介して、調製可能である。免疫沈降法、ウェスタンブロット（イムノブロット）解析、および酵素連結免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）は、当該技術分野で標準的である（例えばＡｕｓｕｂｅｌ，Ｆ．Ｍ．ら，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，第２巻，ｐｐ．１０．１６．１－１０．１６．１１，１０．８．１－１０．８．２１，および１１．２．１－１１．２．２２，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，１９９１を参照されたい）。

【０１６４】

本明細書に引用する刊行物および特許出願はすべて、各個々の刊行物または特許出願が

特に、そして個々に、本明細書に援用されると示されたかのように、本明細書に援用される。前述の発明は、理解を明らかにする目的で、例示および実施例によってある程度詳細に記載されているが、本発明の解説に鑑みて、付随する請求の範囲の精神または範囲から逸脱することなく、特定の変化および修飾を施すことが可能であることが、当業者には容易に明らかであろう。

【０１６５】

配列表に存在する配列

【表６】

配列番号	種類	説明
配列番号 1	ヌクレオチド	ヒト IMX7189 cDNA 配列
配列番号 2	アミノ酸	ヒト IMX7189 アミノ酸配列
配列番号 3	ヌクレオチド	マウス IMX7189 の予測される cDNA 配列
配列番号 4	アミノ酸	マウス IMX7189 の予測されるアミノ酸配列
配列番号 5	アミノ酸	ヒト IMX7189 アミノ酸配列の変異体 (GenBank 寄託番号 NP_057556)
配列番号 6	アミノ酸	ヒト IMX168745 アミノ酸配列
配列番号 7	アミノ酸	ヒト IMX185787 アミノ酸配列
配列番号 8	アミノ酸	ヒト IMX188339 アミノ酸配列
配列番号 9	アミノ酸	ヒト IMX192967 アミノ酸配列
配列番号 10	アミノ酸	線虫アミノ酸配列(TrEMBL Q22757)
配列番号 11	アミノ酸	線虫アミノ酸配列(TrEMBL Q9XWX6)
配列番号 12	アミノ酸	キイロショウジョウバエアミノ酸配列(TrEMBL Q9V8F3)
配列番号 13	アミノ酸	キイロショウジョウバエアミノ酸配列(TrEMBL Q9VNV2)

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Immunex Corporation
Baum, Peter R.
Ketchem, Randal R.
Mosley, Bruce A.

<120> HUMAN AND MURINE CYTOKINE POLYPEPTIDES

<130> 3361-WO

<160> 16

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 628
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 1
gagggggcgg ggcggaagaa ggcggggagg gagggggcgg caccgccggt cggctccagt 60

cgcctccgga ggaaggaaga agaggacgcc gggcgcgcag ctcggtgctg attatcacaa 120

ctgtttggtg acctacttca ctgacctgtg aggattcctt cccttcaagt actggattct 180

tgatctttct gcatcatcaa gaatggaaac agactgtaat cccatggagc taagcagtat 240

gtcaggattt gaagaaggtt cagagctgaa cggttttgaa ggaactgaca tgaaagacat 300

gaggctcgaa gctgaagcag ttgtaaatga tgttctcttt gctgttaaca acatgtttgt 360

ctcgaaaagc ctgcggtgtg cggatgatgt ggcctatatc aatgtggaaa caaaggaaag 420

aaacagatat tgcctagaac tcactgaagc agggctcaag gtggtaggct atgcttttga 480

ccaggtagat gatcatttac agactcccta ccatgaaaca gtctactcct tgttggatac 540

actcagcccc gcctaccgag aagcatttgg aaacgcactg cttcaaagac tggaagcttt 600

gaaaagagat ggacagtcat gactacac 628

<210> 2
<211> 139
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Thr Asp Cys Asn Pro Met Glu Leu Ser Ser Met Ser Gly Phe
1 5 10 15

Glu Glu Gly Ser Glu Leu Asn Gly Phe Glu Gly Thr Asp Met Lys Asp
20 25 30

Met Arg Leu Glu Ala Glu Ala Val Val Asn Asp Val Leu Phe Ala Val
35 40 45

```
Asn Asn Met Phe Val Ser Lys Ser Leu Arg Cys Ala Asp Asp Val Ala
    50                  55                  60

Tyr Ile Asn Val Glu Thr Lys Glu Arg Asn Arg Tyr Cys Leu Glu Leu
65                  70                  75                  80

Thr Glu Ala Gly Leu Lys Val Val Gly Tyr Ala Phe Asp Gln Val Asp
                85                  90                  95

Asp His Leu Gln Thr Pro Tyr His Glu Thr Val Tyr Ser Leu Leu Asp
            100                 105                 110

Thr Leu Ser Pro Ala Tyr Arg Glu Ala Phe Gly Asn Ala Leu Leu Gln
        115                 120                 125

Arg Leu Glu Ala Leu Lys Arg Asp Gly Gln Ser
    130                 135
```

<210> 3
<211> 1782
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 3

```
ggcacgtact cgagcaacgg gcacaagcgg aagtgacgcc atattgcggg gctggaaagg     60

caggaaaaaa agagtccggg ccggagcatt tccggtggtg aatgggcggg gcaactgcgg    120

gggcgggggt ggtgccggcg ccgcgatcct ggccccagca gtctccggac gaggaaggat    180

aagaacatgg gcgctcgcag aatggaaaca gactataatc ccgtggagct aagcagtatg    240

tctggatttg aagaaggctc cgagctcaat gggtttgaag gagcggatat gaaggacatg    300

cagctggagg ccgaggcagt tgtaaacgat gtactctttg ctgtcaacca catgtttgtc    360

tcaaaaagca tgccctgtgc agatgatgtg gcttacatca atgtggagac aaaggaaagg    420

aacagatact gcctggagct cacagaagca gggctcaggg tggtgggcta tgcttttgac    480

caggtggagg atcatttgca aacccccctac catgagacag tctactcctt gttggatact    540

ctcagccctg cctaccggga agcattcgga aacgcgctcc ttcagagact ggaagctttg    600

aaacgagatg gacagtcatg actcatgact catcttcctc ctaatggggc cgctgctggt    660

atagaatcta acataaggct tgacaccctt gcgtacagtc actgtagaaa gcgcatcatt    720

cattggcttt gtgtgttcgc cattccttca cacgcaggct tttgactccc agcgtaattg    780

agttgtctta gtttcagctt catggaaggg gatttaattt tgagaccatt gctctgacac    840

tcccattctg agtttcacac ccagcactct gcatttcaat ccctagtcag ctcttcattc    900
```

tcctgttaca gggcttcaat gctgccagca ctcttttaca tagaaaattc tagatttgca 960

cagtgataca gaaattagaa tcacctaact tcagacctgg attcagcctg ctaaatcagg 1020

ggtttactac tagcttggag taactttgta gtggttattt tgtacctggc cttattggaa 1080

acaaactgtc aactagtttc ccctgcacaa attctgaaat gtactgctct gcttaatcta 1140

gtcacatgac caagtgggct ggtgaagatg ggttgctcat ctgtttctta actaagataa 1200

aatggaaggc agggacagaa atcgttctcc attccttgtt tgcaacagcc agccagccta 1260

gagcggacag accattcgca aatgaatgta acaattactc atctccatga tgtctaagca 1320

catgagcaaa tagaggaaca ggcccacctc atcctccagt gtggatctct tcaaaggaag 1380

aagatcctgg tttcctagga aacggtattt tggcctgtgt tgattcttac tctgaatgtt 1440

tgtttacaat gtacagtata tatatatata tatgcacata tatattcaga acgtattttt 1500

gcttcaatgc ttactttcta taaagcagtg ctttggtatt cctacagcgc ccttcttccc 1560

cagcagttgg acagtgctct gtctcattgc cacatgaaca gtgtaacatg agtgcattgt 1620

atggttcgaa accaaaggat gaatgaagca ttcagaaact tgatatttaa aaaagagatg 1680

ctctgtattt tatattttat tacagtcccc ggtgtttata aacgtaataa agtcctccgt 1740

gctgctgcat gttttccagt atgtgaaaaa aaaaaaaaaa aa 1782

<210> 4
<211> 144
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4

Met Gly Ala Arg Arg Met Glu Thr Asp Tyr Asn Pro Val Glu Leu Ser
1 5 10 15

Ser Met Ser Gly Phe Glu Glu Gly Ser Glu Leu Asn Gly Phe Glu Gly
20 25 30

Ala Asp Met Lys Asp Met Gln Leu Glu Ala Glu Ala Val Val Asn Asp
35 40 45

Val Leu Phe Ala Val Asn His Met Phe Val Ser Lys Ser Met Pro Cys
50 55 60

Ala Asp Asp Val Ala Tyr Ile Asn Val Glu Thr Lys Glu Arg Asn Arg
65 70 75 80

Tyr Cys Leu Glu Leu Thr Glu Ala Gly Leu Arg Val Val Gly Tyr Ala
85 90 95

```
Phe Asp Gln Val Glu Asp His Leu Gln Thr Pro Tyr His Glu Thr Val
            100                 105                 110

Tyr Ser Leu Leu Asp Thr Leu Ser Pro Ala Tyr Arg Glu Ala Phe Gly
        115                 120                 125

Asn Ala Leu Leu Gln Arg Leu Glu Ala Leu Lys Arg Asp Gly Gln Ser
    130                 135                 140
```

<210> 5
<211> 155
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

```
Met Glu Thr Asp Cys Asn Pro Met Glu Leu Ser Ser Met Ser Gly Phe
1               5                   10                  15

Glu Glu Gly Ser Glu Leu Asn Gly Phe Glu Gly Thr Asp Met Lys Asp
            20                  25                  30

Met Arg Leu Glu Ala Glu Ala Val Val Asn Asp Val Leu Phe Ala Val
        35                  40                  45

Asn Asn Met Phe Val Ser Lys Ser Leu Arg Cys Ala Asp Asp Val Ala
    50                  55                  60

Tyr Ile Asn Val Glu Thr Lys Glu Arg Asn Arg Tyr Cys Leu Glu Leu
65                  70                  75                  80

Thr Glu Ala Gly Leu Lys Val Val Gly Tyr Ala Phe Asp Gln Val Asp
                85                  90                  95

Asp His Leu Gln Thr Pro Tyr His Glu Thr Val Tyr Ser Leu Leu Asp
            100                 105                 110

Thr Leu Ser Pro Ala Tyr Arg Glu Ala Phe Gly Asn Ala Leu Leu Gln
        115                 120                 125

Arg Leu Glu Ser Phe Glu Lys Arg Trp Thr Val Met Thr Thr Leu Phe
    130                 135                 140

Pro Phe Arg Gly Ala Gly Ala Gly Thr Glu Cys
145                 150                 155
```

<210> 6
<211> 288
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

```
Met Asn Cys Leu Arg Ser Cys Gly Cys Ser Val Leu Val Cys Leu Leu
1               5                  10                  15

Ala Gly Ala Leu Leu Gly Ser Thr Gly Met His Trp His Leu Leu Gly
            20                  25                  30

Leu Thr Glu Leu Gly Ser Lys Leu Arg Val Arg Phe Gln Ser Ala Val
        35                  40                  45

Ser Pro Pro Ser Gly Ala Ala Glu Lys Ala Ser Leu Lys Leu Lys His
    50                  55                  60

Thr Asn Pro Phe Pro Arg Arg Gly Val Ala Leu Gly Ala Lys Pro Leu
65                  70                  75                  80

Arg Ser Glu Asn Ser Gln Ala Ala Ala Ala Phe Asn Ser Ser Glu Glu
                85                  90                  95

Gly Glu Cys Glu Gln Met Arg Gln Glu Leu Glu Cys Val Asn Thr Pro
            100                 105                 110

Glu Pro Ala Gly Cys Phe Gly Ala Gly Gly Ser Glu His Ser Thr His
        115                 120                 125

Ser Asn Pro Leu Gly Ser Val Pro Arg Gly Arg Glu Arg Ala Gly Tyr
    130                 135                 140

Pro Thr Glu Lys Gly Tyr His Thr Glu Arg Cys Val Gln Gly Leu Leu
145                 150                 155                 160

Lys Leu Gly Leu Asp Thr Gly Ile Gly Ile His Pro Leu Tyr Ser Ile
                165                 170                 175

Thr Lys Ala Ser His Lys Val Ser Pro Asp Leu Lys Gly Glu Glu Glu
            180                 185                 190

Ala Leu Pro Leu Asp Gly Ser Ser Cys Lys Val Asn Ile Val Lys Tyr
        195                 200                 205

Val Glu Thr Gly Lys Gly Ser Glu Glu Lys Arg Asn Val Arg Glu Glu
    210                 215                 220
```

```
Gln Ala Val Ala Ala Gly Arg Glu Trp Val Glu Gln Ser Leu Gln Leu
225                 230                 235                 240

Phe Arg Glu Lys Lys Gly Ala Leu Ala Gln Ala Gln Glu Val Ser Leu
                245                 250                 255

Gly Ala Asp Val Gly Arg Asn Pro Arg Ile Ser Thr Cys Gly Thr Glu
            260                 265                 270

Arg Ser Ala Trp Gln Ile Gln Ser Tyr Ser Asp Ser Asn Val Thr Ala
        275                 280                 285
```


<210> 7
<211> 266
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

```
Met Ser Gln Thr Lys Pro Asp Leu Val Lys Ile Asn Arg Arg Lys Ala
1               5                   10                  15

Lys Ser Asp Cys Phe Lys Met Arg Lys Ile Phe Gln Asp Ile Ile Met
            20                  25                  30

Lys Asn Ile Val Val Leu Thr Phe Ser Pro Ala Ser Gly Ser Ser Thr
        35                  40                  45

Arg Arg Lys Ala Gln Leu Leu Ser Asp Gly Val Lys Pro Leu Asp Trp
    50                  55                  60

Glu Arg Arg Thr Leu Gln Gln Phe Cys Gly Val Gly Thr Ala Asn Gln
65                  70                  75                  80

Leu Cys Arg Thr Leu Gly Pro Cys Val Ser Ala Pro Gly Gly Lys Gly
                85                  90                  95

Glu Glu Asp Val Thr Lys Val Tyr Asn Thr Lys Gly Arg Val Thr Met
            100                 105                 110

Ser Gln Glu Leu Thr Lys Glu Gln Lys Val Phe Tyr Lys Met Val Gln
        115                 120                 125

Gln Leu Leu Lys Ala Ile Gln Cys Thr Val Glu Ser Glu Ala Leu His
    130                 135                 140
```

```
Lys Leu Met Leu Leu Ile Trp Gln Glu Cys Pro Trp Leu His Asp Gln
145                 150                 155                 160

Gly Thr Leu Asp Leu Lys Leu Arg Glu Gln Leu Ala Ile Gln Val Trp
                165                 170                 175

Lys Arg Ile Pro Val Gly Gln Ser Gln Gly Ser Phe Val Met Val Arg
            180                 185                 190

Gln Asp Ala Thr Glu Thr Tyr Ile Glu Phe Ile Asn Gln Leu Gln Ala
        195                 200                 205

Ala Ile Lys Arg Gln Ala Lys Ile Phe His Tyr Val Asp Asp Ile Leu
    210                 215                 220

Ile Ala Ala Gln Tyr Gln Ser Leu Leu His Gln Leu Tyr Thr Met Met
225                 230                 235                 240

Ile Gln Glu Lys Gln Lys Arg Gln Val Asp His Tyr Glu Glu Asp Thr
                245                 250                 255

Leu Gly Asn Gly Arg Ile Asn Gly Arg Ile
            260                 265
```

<210> 8
<211> 786
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

```
Met Asn Thr Ser Arg Phe Ala Asp His His Asp Leu Leu Thr Glu Thr
1               5                   10                  15

Lys Arg Pro Ile Asp Thr Val Ile Ser Gln Gln Ala Phe Tyr Ser Asp
            20                  25                  30

Glu Ser Val Ser Ala Met Glu Lys Gln Tyr Leu Arg Asn Ser Asn Leu
        35                  40                  45

Thr Pro Gln Gln Lys Ile Asp Glu Leu His His Gly Phe Thr Gly Leu
    50                  55                  60

Asp Leu Glu Glu Gln Trp Met Tyr Pro Ser Arg Ser Asp His Ser Asn
65                  70                  75                  80

Cys His Asn Ile Gln Thr Asn Asp Thr Ala Lys Thr Thr Phe Gln Glu
                85                  90                  95
```

```
Tyr Pro Leu Ile Lys Asn Cys Phe Thr Pro Gln Thr Gly Leu Ser Asp
            100                 105                 110

Ile Met Lys Glu Ser Gly Val Asp Ile Tyr His Tyr Gly Arg Asp Arg
        115                 120                 125

Ile Cys Thr Lys Gly Leu Glu Ala Pro Leu Gln Gln Lys Arg Ala Glu
    130                 135                 140

Met Phe Leu Ser Gln Phe Asn Arg Tyr Asn Glu Asn Val Asp Tyr Cys
145                 150                 155                 160

Arg Tyr Pro Glu Tyr Val His Pro Asn Lys Ala Lys Leu Asn Lys Cys
                165                 170                 175

Ser Asn Phe Ser Val Gln Asp Ser Lys Lys Leu Ala Asn Gly Thr Pro
            180                 185                 190

Glu Thr Pro Thr Val Glu Ala Asp Thr Tyr Thr Lys Leu Phe Gln Val
        195                 200                 205

Lys Pro Ala Asn Gln Lys Lys Met Glu Glu Thr Ile Pro Asp Gln Gln
    210                 215                 220

Asn Phe Thr Phe Pro Lys Thr Thr Pro His Leu Thr Glu Lys Gln Phe
225                 230                 235                 240

Ala Lys Glu Ala Val Phe Thr Ala Asp Phe Gly Leu Thr Ser Glu Tyr
                245                 250                 255

Gly Leu Lys Pro His Thr Ala Cys Pro Ala Asn Asp Phe Ala Asn Val
            260                 265                 270

Thr Glu Lys Gln Gln Phe Ala Lys Pro Asp Pro Pro His Ser Glu Tyr
        275                 280                 285

Phe Lys Ser Val Asn Leu Leu Ser Asn Ser Ala Thr Ser Ser Gly Gly
    290                 295                 300

Ile Asp Leu Asn Arg Pro Thr Trp Met Asn Val Gln Thr Lys Asn Asn
305                 310                 315                 320

Thr Pro Ile Pro Tyr Arg Asn Gln Gly Asn Leu Met Lys Leu Asn Ser
                325                 330                 335
```

```
His Leu Ser Ala Ala Ser Lys Gly Ser Asn His Ser Ser Asp Phe Pro
            340                 345                 350

Gln Leu Ser Ser Thr Asn Leu Thr Pro Asn Ser Asn Leu Phe Gln Lys
        355                 360                 365

Tyr Cys Gln Glu Asn Pro Ser Ala Phe Ser Ser Phe Asp Phe Ser Tyr
    370                 375                 380

Ser Gly Ala Glu Arg Ile Gln Ser Val Asn His Ile Glu Gly Leu Thr
385                 390                 395                 400

Lys Pro Gly Glu Glu Asn Leu Phe Lys Leu Val Thr Asp Lys Lys Ile
                405                 410                 415

Lys Gln Pro Asn Gly Phe Cys Asp Asn Tyr Ser Ala Gln Lys Tyr Gly
            420                 425                 430

Ile Ile Glu Asn Val Asn Lys His Asn Phe Gln Ala Lys Pro Gln Ser
        435                 440                 445

Gly His Tyr Asp Pro Glu Glu Gly Pro Lys His Leu Asp Gly Leu Ser
    450                 455                 460

Gln Asn Thr Tyr Gln Asp Leu Leu Glu Ser Gln Gly His Ser Asn Ser
465                 470                 475                 480

His Arg Thr Arg Gly Gly Asp Asn Ser Arg Val Asn Arg Thr Gln Val
                485                 490                 495

Ser Cys Phe Ser Asn Asn Tyr Met Met Gly Asp Leu Arg His Asn Gln
            500                 505                 510

Cys Phe Gln Gln Leu Gly Ser Asn Gly Phe Pro Leu Arg Ser Thr His
        515                 520                 525

Pro Phe Gly His Ser Val Val Pro Leu Leu Asp Ser Tyr Asp Leu Leu
    530                 535                 540

Ser Tyr Asp Asp Leu Ser His Leu Tyr Pro Tyr Phe Asn Met Met Tyr
545                 550                 555                 560

Gly Asp Asn Ser Phe Ser Gly Leu Met Pro Thr Phe Gly Phe Gln Arg
                565                 570                 575
```

```
Pro Ile Lys Thr Arg Ser Gly Pro Ala Ser Glu Leu His Ile Arg Leu
            580                 585                 590

Glu Glu Cys Cys Glu Gln Trp Arg Ala Leu Glu Lys Glu Arg Lys Lys
        595                 600                 605

Thr Glu Leu Ala Leu Ala Lys Asn Tyr Pro Gly Lys Lys Val Ser Ser
    610                 615                 620

Thr Asn Asn Thr Pro Val Pro Arg Leu Thr Ser Asn Pro Ser Arg Val
625                 630                 635                 640

Asp Arg Leu Ile Val Asp Glu Leu Arg Glu Leu Ala Arg Val Val Thr
                645                 650                 655

Leu Leu Gly Lys Met Glu Arg Leu Arg Ser Ser Leu Leu His Ala Ser
            660                 665                 670

Ile Ser Thr Ala Leu Asp Arg His Leu Glu Ser Ile His Ile Val Gln
        675                 680                 685

Ser Arg Arg Lys Asp Glu Ile Val Asn Ala Ser Asn Arg Gln Arg Gln
    690                 695                 700

Gly Val Pro Arg Cys Gln Asp Asp Arg Asp Val Phe Ala Leu Ala Ser
705                 710                 715                 720

Ala Ile Lys Glu Met Cys Val Ala Thr Arg Lys Thr Arg Thr Ala Leu
                725                 730                 735

Trp Cys Ala Leu Gln Met Thr Leu Pro Lys Thr Ala Ser Thr Ala Asp
            740                 745                 750

Val His Lys Pro Leu Gln Asp Thr Val Asn Cys Glu Asp Lys Val His
        755                 760                 765

Glu Ser Ile Asn Ser Ser Asn Pro Met Asn Gln Arg Gly Glu Thr Asn
    770                 775                 780

Lys His
785
```

<210> 9
<211> 287
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

```
Gly Val Val Arg Ser Ala Val Gln Leu Phe Pro Gly Thr Thr Gly Ser
1               5                   10                  15

Cys Pro Leu Trp Leu Ser Ser His Arg Ser Gln Ala Thr Val Arg Glu
            20                  25                  30

Ala Leu Ala Ser Val Ala Arg Leu Ala Ala Asn Gly Gly Val Gly Trp
        35                  40                  45

Ser Gly Arg Pro Ser Ser Asn Lys Ser Gly Thr Thr Gly Leu Glu Ala
    50                  55                  60

Asp Arg Arg His Glu Val Cys Tyr Cys Ala Ala Ala Ala Ala Leu Lys
65                  70                  75                  80

Leu Cys Glu Ala Ile Asp Leu Thr Ser Met Asn His Asn Thr Ile Asp
                85                  90                  95

Leu Val Ser Asp His Cys Glu Ser Arg Asn Leu Asn Ser Glu Gln Gln
            100                 105                 110

Glu Val Lys Tyr Trp Leu Met Arg Met Phe Val Cys Leu Val Ser Leu
        115                 120                 125

Leu Ile Ser Val Leu Gly Ala Gly Ala Cys Leu Ala Ala Leu Glu Ser
    130                 135                 140

Trp Thr Ile Ser Glu Glu Leu Gln Phe Phe Trp Lys Lys Gly His Trp
145                 150                 155                 160

Ser Ser Met Ala Ile Leu Ala Ser Ala Arg Arg Gln Gln Thr Gln Ile
                165                 170                 175

Asn Arg Leu Ser Pro Lys Ser Ser Ala Pro Ile Cys Lys Leu Leu Asp
            180                 185                 190

Pro Lys Thr Gly Cys Phe Pro Ser Trp Lys Val Ile Val Phe Phe Ser
        195                 200                 205

Phe Glu Lys Arg Asp Ser Tyr Glu Phe Gly Ser Ser Arg Gly Leu Val
    210                 215                 220

Leu Trp Glu Val Pro Phe Leu Lys Gly Gly Asp Lys Ala Trp Arg Lys
225                 230                 235                 240
```

```
Phe Gly His Ser Leu Phe Lys Asp Ala Gly Leu Val Lys Met Gly Arg
                245                 250                 255

His Glu Val Ile Asn Asn Phe Leu Ser Leu Phe Phe Ser Thr Val Pro
            260                 265                 270

His Ile Ser Cys Val Ser Trp Lys Arg Gln Ala Ser Gly Pro Trp
        275                 280                 285
```

<210> 10
<211> 156
<212> PRT
<213> Caenorhabditis elegans

<400> 10

```
Met Thr Gln Gln Ser Asp Lys Asp Ala Ser Val Ser Glu Thr Thr Thr
1               5                   10                  15

Pro Pro Thr Thr Pro Val Thr Val Lys Lys Pro Ala Leu Cys Gly Ser
            20                  25                  30

Cys Asp Cys Asp Val Glu Lys Ser Thr Leu Glu Glu Glu Ala Met Ala
        35                  40                  45

Ala Val Arg Glu Asn Ala Phe Ala Val Asn Leu Ile Gly Val Ser Glu
    50                  55                  60

Met Leu Pro Arg Thr Ser Gln Leu Leu Phe Ile Asn Val Thr Thr Phe
65                  70                  75                  80

Glu Asn His Thr His Cys Ile Glu Leu Thr Gln Lys Gly Trp Arg Val
                85                  90                  95

Ala Ser Asn Arg Asn Asp Cys Met Asn Gly Asp Phe Arg Gln Leu Asp
            100                 105                 110

Ile His Thr Lys Tyr Phe Glu Ser Leu His Thr Leu Leu Met Asp Ile
        115                 120                 125

Ser Pro Leu Phe Arg Glu Thr Phe Gly Ser Lys Leu Ile Ser Lys Leu
    130                 135                 140

Ser Glu Leu Lys Lys Glu Arg Ser Asp Ser Asp Glu
145                 150                 155
```

<210> 11

<211> 210
<212> PRT
<213> Caenorhabditis elegans

<400> 11

```
Met Leu Lys Ser Glu Pro Ile Pro Cys Leu Arg Cys Gly Asn Val Gly
1               5                  10                  15

Ser Pro Thr Gly Ser Val Pro Met Ser Leu His Lys Val Ser Ser Ile
            20                  25                  30

Asn Arg Ser Ala Gly Thr Asn Pro Ala Ser Arg Gly Gly Glu Ser Ser
        35                  40                  45

Leu Glu Leu Glu Ala Ile Ala Ala Val His Glu Leu Ser Phe Ala Val
    50                  55                  60

Gln Ser Ile Ser Val Ser Glu Met Leu Pro Arg Thr Pro Asp Leu Ile
65                  70                  75                  80

Phe Val Asn Val Thr Thr Leu Glu Ala Gln Pro Tyr Cys Leu Glu Leu
                85                  90                  95

Thr Leu Lys Gly Trp Arg Ile Thr Ser Leu Arg Ser Asp Cys Met Val
            100                 105                 110

Gly Asp Phe Thr Arg Leu Glu Leu Phe Thr Lys Tyr Tyr Asp Ser Leu
        115                 120                 125

Tyr Leu Leu Met Asp Asp Ile Ser Pro Gly Tyr Arg Glu Arg Phe Ser
    130                 135                 140

Glu Lys Leu Val Gln Arg Leu Lys Leu Ile Glu Ala Gly Glu Glu Asp
145                 150                 155                 160

Gln Val Ala Pro Cys Ala Ser Leu Gln Ser Pro Ser Leu Ser Thr Asp
                165                 170                 175

Ser Ser Ser Lys Glu Ser Gln Tyr Ser Ser Thr Glu Ser Leu Pro Ile
            180                 185                 190

Val Thr Pro Val Ser Thr Pro Ala Ile Asp Pro Asp Phe Lys Pro Lys
        195                 200                 205

Phe Lys
    210
```

<210> 12
<211> 119
<212> PRT
<213> Drosophila melanogaster

<400> 12

Met Ala Leu Val Gln Ser Asp Glu Asn Asp Phe His Ala Leu Arg Glu
1 5 10 15

Ala Gln Arg Met Val Asp Ser Cys Gln Asp Phe Ala Asp His Leu Ile
20 25 30

Val Ala Glu Phe Leu Pro His Cys Arg Gly Val Ala Tyr Ile Asn Ile
35 40 45

Arg Thr Leu Glu Gln Val Ile Tyr Cys Val Gln Leu Ser Arg Ala Gly
50 55 60

Tyr Arg Ile Val Ser Tyr Glu Phe Asp Asp Val Ala Asp Glu Val Ala
65 70 75 80

Asn Cys Asp Thr Val Tyr Glu Ser Ala His Gln Leu Leu Ala Gly Ile
85 90 95

Ser Pro Leu Tyr Gly Glu Lys Tyr Gly Phe Gly Arg Glu Pro Leu Gly
100 105 110

Lys Arg Lys Glu Lys Gln Ser
115

<210> 13
<211> 158
<212> PRT
<213> Drosophila melanogaster

<400> 13

Met Gly Glu Pro Lys Ala Thr Ala Asp Pro Gly Glu Glu Gln Ala Phe
1 5 10 15

Asn Cys Glu Asp Glu Ala Asn Ala Ile Ile Asn Asp Val Lys Ala His
20 25 30

Val Ala Glu Ile Cys Ile Ser Ser Lys Leu Ala Ser Asp Ala Thr Gln
35 40 45

Ile Tyr Leu Asn Ile Arg Thr Ile Glu Ser Ala Thr Cys Cys Val Gln
50 55 60

Val Ser Ser Arg Gly Phe Lys Ile Val Ser Ser Gln Tyr Asp Thr Ile
65 70 75 80

Asp Glu Asp Ser Arg Ile Ser Ala Leu Leu Arg Asn Gly Gln Glu Gln
85 90 95

Gly Asp Asp Glu Glu Glu Glu Ile Phe Glu Thr Pro Tyr Ala Leu Leu
100 105 110

Asp Lys Ile Ser Pro Arg Tyr Val Glu Ser Phe Gly Asn Gln Leu Cys
115 120 125

Gln Gln Leu Arg Ala Leu Gln Gln Met Arg Thr Glu Phe Asn Glu Glu
130 135 140

Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Glu Glu Glu Glu Lys Lys
145 150 155

<210> 14
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligonucleotide primer

<400> 14
agagctgaac ggttttgaag ga 22

<210> 15
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligonucleotide primer

<400> 15
caaagagaac atcatttaca actgctt 27

<210> 16
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligonucleotide probe

<400> 16
agcttcgagc ctcatgtctt tcatgtcag 29

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/31471

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : C07K 14/00; C12P 21/06; G01N 33/53
US CL : 530/350; 435/69.1; 435/7.1
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 530/350; 435/69.1; 435/7.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/70047 (INCYTE GENOMICS, INC.) 23 November 2000 (23.11.00), page 6, lines 11-34, pages 36 and 68 of the sequence listing, SEQ ID NOs 49 and 104.	1, 4-16, 22-24

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07 April 2003 (07.04.2003)

Date of mailing of the international search report
10 JUN 2003

Name and mailing address of the ISA/US
Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231
Facsimile No. (703)305-3230

Valerie Bell-Harris for
Janet Andres
Telephone No. 703-308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/31471

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1, 4, 16, and 22-24, drawn to the polypeptide of SEQ ID NO: 2 and a method of use.

Group II, claim(s) 1, 4, 16, and 22-24, drawn to the polypeptide of SEQ ID NO: 5 and a method of use.

Group III, claim(s) 2, 4, 16, and 22-24, drawn to the polypeptide of SEQ ID NO: 4 and a method of use.

Group IV, claim(s) 3, 4, 16, and 22-24, drawn to the polypeptide of SEQ ID NO: 6 and a method of use.

Group V, claim(s) 3, 4, 16, and 22-24, drawn to the polypeptide of SEQ ID NO: 7 and a method of use.

Group VI, claim(s) 3, 4, 16, and 22-24, drawn to the polypeptide of SEQ ID NO: 8 and a method of use.

Group VII, claim(s) 3, 4, 16, and 22-24, drawn to the polypeptide of SEQ ID NO: 9 and a method of use.

Group VIII, claim(s) 5-15, drawn to polynucleotides encoding SEQ ID NO: 2 and means of expression.

Group IX, claim(s) 5 and 8-15, drawn to polynucleotides encoding SEQ ID NO: 5 and means of expression.

Group X, claim(s) 5-15, drawn to polynucleotides encoding SEQ ID NO: 4 and means of expression.

Group XI, claim(s) 5 and 8-15, drawn to polynucleotides encoding SEQ ID NO: 6 and means of expression.

Group XII, claim(s) 5 and 8-15, drawn to polynucleotides encoding SEQ ID NO: 7 and means of expression.

Group XIII, claim(s) 5 and 8-15, drawn to polynucleotides encoding SEQ ID NO: 8 and means of expression.

Group XIV, claim(s) 5 and 8-15, drawn to polynucleotides encoding SEQ ID NO: 9 and means of expression.

Group XV, claim(s) 17-21, drawn to antibodies against the polypeptide of SEQ ID NO: 2.

Group XVI, claim(s) 17-21, drawn to antibodies against the polypeptide of SEQ ID NO: 5.

Group XVII, claim(s) 17-21, drawn to antibodies against the polypeptide of SEQ ID NO: 4.

Group XVIII, claim(s) 17-21, drawn to antibodies against the polypeptide of SEQ ID NO: 6.

Group XIX, claim(s) 17-21, drawn to antibodies against the polypeptide of SEQ ID NO: 7.

Group XX, claim(s) 17-21, drawn to antibodies against the polypeptide of SEQ ID NO: 8.

Group XXI, claim(s) 17-21, drawn to antibodies against the polypeptide of SEQ ID NO: 9.

The inventions listed as Groups I-XXI do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The polypeptides of groups I-VII, the polynucleotides of groups VIII-XIV, and the antibodies of groups XV-XXI are structurally different, each from the other. While they may function similarly they are different molecules and thus they are independent entities with no common technical feature. The

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/3147

polypeptides, polynucleotides, and antibodies are structurally and functionally different, each from the other, and cannot be used either together or interchangeably. They thus also lack a common technical feature.

Continuation of Box II Item 4:
1, 4-16, 22-24 as they related to SEQ ID NO: 2 and the encoding polynucleotide, which did not require additional effort.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
STN, EAST
search terms: cytokine, alpha helix

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application N
PCT/US02/314

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: Please See Continuation Sheet

Remark on Protest
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ 1/21	Ｃ１２Ｎ 1/21		
Ｃ１２Ｎ 5/10	Ｃ１２Ｐ 21/02	Ｋ	
Ｃ１２Ｐ 21/02	Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ａ	
// Ｃ１２Ｐ 21/08	Ｃ１２Ｐ 21/08		

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100096013
弁理士 富田 博行
(74)代理人 100107386
弁理士 泉谷 玲子
(72)発明者 バウム，ピーター・アール
アメリカ合衆国ワシントン州９８１１５，シアトル，サーティフォー・アベニュー・ノースイースト ６０２７
(72)発明者 モスリー，ブルース・エイ
アメリカ合衆国ワシントン州９８１５５，シアトル，ノースイースト・トゥーハンドレッドアンドサード・プレース ４１１６
(72)発明者 ケッチェム，ランダル・アール
アメリカ合衆国ワシントン州９８２０８，イヴレット，フィフティース・アベニュー・サウスイースト １４２０９

Ｆターム(参考) 2G045 AA40 CB01 DA36 FB03
4B024 AA01 AA11 BA21 CA03 CA04 DA01 DA02 DA05 DA11 EA04 GA11
4B064 AG02 AG27 CA01 CA10 CA19 CA20 CC24 CE12 DA01 DA13
4B065 AA90X AA91Y AA93Y AB01 BA01 BA02 CA24 CA43 CA44 CA46
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA01 DA76 EA20 EA50 FA74 GA22 GA26