

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4704565号
(P4704565)

(45) 発行日 平成23年6月15日(2011.6.15)

(24) 登録日 平成23年3月18日(2011.3.18)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 14/715 (2006.01)

C O 7 K 14/715

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 24 (全 124 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-574143 (P2000-574143)
 (86) (22) 出願日 平成11年9月23日(1999.9.23)
 (65) 公表番号 特表2002-526062 (P2002-526062A)
 (43) 公表日 平成14年8月20日(2002.8.20)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1999/022149
 (87) 国際公開番号 W02000/017235
 (87) 国際公開日 平成12年3月30日(2000.3.30)
 審査請求日 平成18年8月21日(2006.8.21)
 (31) 優先権主張番号 09/159,254
 (32) 優先日 平成10年9月23日(1998.9.23)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 09/265,117
 (32) 優先日 平成11年3月9日(1999.3.9)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 505222646
 ザイモジェネティクス, インコーポレイ
 テッド
 アメリカ合衆国 ワシントン州 シアトル
 イーストレイク アベニュー イースト
 1 2 0 1
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サイトカインレセプター Z A L P H A 1 1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) SEQ ID NO: 2 に示されるアミノ酸番号 2 0 (C y s) からアミノ酸番号 2 3 7 (H i s) のアミノ酸配列、

(b) SEQ ID NO: 2 に示されるアミノ酸番号 2 0 (C y s) からアミノ酸番号 2 5 5 (L e u) のアミノ酸配列、および

(c) SEQ ID NO: 2 に示されるアミノ酸番号 2 5 6 (L y s) からアミノ酸番号 5 3 8 (S e r) のアミノ酸配列、
 からなる群から選択されたアミノ酸残基の配列からなる z a l p h a 1 1 ポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 2】

(a) SEQ ID NO: 1 に示される 1 2 6 番ヌクレオチドから 7 7 9 番ヌクレオチドまでのポリヌクレオチド配列、

(b) SEQ ID NO: 1 に示される 1 2 6 番ヌクレオチドから 8 3 3 番ヌクレオチドまでのポリヌクレオチド配列、および

(c) SEQ ID NO: 1 に示される 8 3 4 番ヌクレオチドから 1 6 8 2 番ヌクレオチドまでのポリヌクレオチド配列、
 からなる群から選択されるポリヌクレオチドの配列からなる単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 3】

転写プロモーターと、

SEQ ID NO: 2に示されるアミノ酸番号20 (Cys) からアミノ酸番号237 (His) のアミノ酸配列からなるz alpha 11ポリペプチドをコードするDNAセグメントと、

転写ターミネーターとを含む発現ベクターであって、前記プロモーターとDNAセグメントとターミネーターが作用可能式に結合している、発現ベクター。

【請求項4】

さらにDNAセグメントと作用可能式に結合した分泌シグナル配列を含む、請求項3に記載の発現ベクター。

【請求項5】

10

転写プロモーターと、

SEQ ID NO: 2に示されるアミノ酸番号20 (Cys) からアミノ酸番号255 (Leu) のアミノ酸配列からなるz alpha 11ポリペプチドをコードするDNAセグメントと、

転写ターミネーターとを含む発現ベクターであって、前記プロモーター、DNAセグメントとターミネーターが作用可能式に結合している、発現ベクター。

【請求項6】

さらにDNAセグメントと作用可能式に結合した分泌シグナル配列を含む、請求項5に記載の発現ベクター。

【請求項7】

20

請求項3に記載の発現ベクターの導入された培養細胞であって、前記細胞がDNAセグメントによりコードされる可溶性の受容体ポリペプチドを発現する、培養細胞。

【請求項8】

細胞が増殖のために外因的に供給された造血増殖因子に依存している、請求項7に記載の細胞。

【請求項9】

融合タンパク質をコードするDNA構築体であって、前記DNA構築体が、

(a) SEQ ID NO: 2に示されるアミノ酸番号20 (Cys) からアミノ酸番号237 (His) のアミノ酸配列、

(b) SEQ ID NO: 2に示されるアミノ酸番号20 (Cys) からアミノ酸番号255 (Leu) のアミノ酸配列、

30

(c) SEQ ID NO: 2に示されるアミノ酸238 (Leu) からアミノ酸番号255 (Leu) のアミノ酸配列、

(d) SEQ ID NO: 2に示されるアミノ酸番号238 (Leu) からアミノ酸番号538 (Ser) のアミノ酸配列

(e) SEQ ID NO: 2に示されるアミノ酸番号256 (Lys) からアミノ酸番号538 (Ser) のアミノ酸配列、
からなる群から選択されたアミノ酸残基の配列からなるポリペプチドをコードする第一DNAセグメントと、

追加のポリペプチドをコードする少なくとも1個の別のDNAセグメントとを含む構築体であって、

40

前記第一DNAセグメントおよび別のDNAセグメントがイン・フレームで結合し、かつ前記第一DNAセグメントおよび別のDNAセグメントが融合タンパク質をコードする、DNA構築体。

【請求項10】

作用可能式に結合した下記の要素：

転写プロモーターと、

請求項9に記載の融合タンパク質をコードするDNA構築体と、

転写ターミネーターとを含む発現ベクターであって、前記プロモーターがDNA構築物と作用可能式に結合し、前記DNA構築体が転写ターミネーターと作用可能式に結合し

50

ている、発現ベクター。

【請求項 1 1】

請求項 1 0 に記載の発現ベクターを含む培養細胞であって、前記細胞が DNA 構築体によりコードされるポリペプチドを発現する、培養細胞。

【請求項 1 2】

請求項 1 1 に記載の細胞を培養することと、前記細胞により生成したポリペプチドを単離することを含む融合タンパク質の製造方法。

【請求項 1 3】

(a) SEQ ID NO: 2 に示されるアミノ酸番号 2 0 (C y s) からアミノ酸番号 2 3 7 (H i s) のアミノ酸配列、

(b) SEQ ID NO: 2 に示されるアミノ酸番号 2 0 (C y s) から 2 5 5 番アミノ酸番号 2 5 5 (L e u) のアミノ酸配列、および

(c) SEQ ID NO: 2 に示されるアミノ酸番号 2 5 6 (L y s) からアミノ酸番号 5 3 8 (S e r) のアミノ酸配列、からなる群から選択されたアミノ酸残基の配列からなる単離されたポリペプチド。

【請求項 1 4】

SEQ ID NO: 2 に示されるアミノ酸番号 2 0 (C y s) からアミノ酸番号 2 3 7 (H i s) のアミノ酸配列、
を含む単離されたポリペプチドであって、前記ポリペプチドが造血受容体と通常結合しているトランスメンブレンドメインおよび細胞内ドメインを含まない、単離されたポリペ

【請求項 1 5】

さらにアフィニティータグを含む、請求項 1 4 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 6】

さらに免疫グロブリン定常域配列を含む、請求項 1 4 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 7】

請求項 7 に記載の細胞を培養すること、および前記細胞により生成した z a l p h a 1 1 ポリペプチドを単離することを含む z a l p h a 1 1 ポリペプチドの製造方法。

【請求項 1 8】

請求項 1 3 に記載のポリペプチドと特異的に結合する抗体。

【請求項 1 9】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 8 に記載の抗体。

【請求項 2 0】

抗体が抗原結合断片、遺伝子工学処理無傷抗体または断片、およびヒト化抗体からなる群から選択される、請求項 1 8 に記載の抗体。

【請求項 2 1】

抗原結合断片が F (a b ') ₂ または F a b 断片である、請求項 2 0 に記載の抗体。

【請求項 2 2】

遺伝子工学処理無傷抗体または断片がキメラ抗体、F v 断片、または一本鎖抗体である、請求項 2 0 に記載の抗体。

【請求項 2 3】

試験試料と

(a) SEQ ID NO: 2 に示されたアミノ酸番号 2 0 (C y s) からアミノ酸番号 2 3 7 (H i s) のアミノ酸配列、および

(b) SEQ ID NO: 2 に示されたアミノ酸番号 2 0 (C y s) からアミノ酸番号 2 5 5 (L e u) のアミノ酸配列、
からなる群から選択されたアミノ酸残基の配列からなるポリペプチドとを接触させること、および

ポリペプチドと試料中のリガンドとの結合を検出することを含む、試験試料内の z a l p h a 1 1 ポリペプチドのリガンドの検出方法。

10

20

30

40

50

【請求項 2 4】

ポリペプチドを固体の担体上で固定化する、請求項 2 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の背景

多細胞生物の細胞の増殖及び分化はホルモン及びポリペプチド成長因子によりコントロールされている。これら拡散性分子により細胞は相互連絡でき、協調して細胞及び器官を形成し、損傷組織の修復と再生が可能になる。ホルモン及び成長因子の例としては、ステロイドホルモン（例えば、エストロゲン、テストステロン）、副甲状腺ホルモン、濾胞刺激ホルモン、インターロイキン、血小板由来成長因子（PDGF）、上皮成長因子（EGF）、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、エリスロポイエチン（EPO）及びカルシトニンがある。

10

【0002】

ホルモン及び成長因子はタンパク質に結合して細胞の代謝に影響を及ぼす。受容体は第 2 メッセンジャーシステムの様な細胞内シグナル伝達経路に連結した膜内蛋白質である。その他クラスの受容体は、転写因子の様な可溶性分子である。

特に興味深いものは、細胞の増殖及び／又は分化を促進する分子であるサイトカインである。サイトカインの例としては、赤血球の発生を促進するエリスロポイエチン（EPO）；巨大核細胞系細胞の発生を促進するトロンボポイエチン（TPO）；及び好中球の発生を促進する顆粒球-コロニー刺激因子（G-CSF）がある。これらサイトカインは、貧血、血小板減少症、及び好中球減少症の患者又は癌の化学療法を受けている患者に於いて、正常血球レベルを快復させるのに有用である。

20

【0003】

これらサイトカインに示された *in vivo* 活性からは、その他サイトカイン、サイトカインアゴニスト及びサイトカインアンタゴニストの持つ数多い臨床の可能性、及び需要を描写する。本発明は、新規造血性サイトカイン受容体、ならびに関連組成体及び方法を提供することで、この求めに答えるものである。

【0004】

本発明は、ここでの教示より当業者にとって明らかなこれら及びその他利用に適したポリペプチドを提供する。

30

【0005】

発明の要約

本発明の 1 つの観点では、以下より成るグループから選択されるアミノ酸配列に少なくとも 90% 同一であるアミノ酸残基の配列を含む α 11 ポリペプチドをコードする分離されたポリヌクレオチドを提供する：アミノ酸配列が $k_{\text{tup}}=1$ 、ギャップオープニングペナルティー（gap opening penalty）= 10、ギャップエクステンションペナルティー（gap extension penalty）= 1、及び置換マトリックス = BLOSUM62 であり、その他パラメータがデフォルトに設定された FASTA プログラムを用い決定される (a) アミノ酸番号 20 (Cys) ないしアミノ酸番号 237 (His) の配列番号 2 に示すアミノ酸配列；(b) アミノ酸番号 20 (Cys) ないしアミノ酸番号 255 (Leu) の配列番号 2 に示すアミノ酸配列；(c) アミノ酸番号 256 (Lys) ないしアミノ酸番号 538 (Ser) の配列番号 2 に示すアミノ酸配列；(d) アミノ酸番号 20 (Cys) ないしアミノ酸番号 538 (Ser) の配列番号 2 に示すアミノ酸配列；及び (e) アミノ酸番号 1 (Met) ないしアミノ酸番号 538 (Ser) の配列番号 2 に示すアミノ酸配列。実施態様の 1 つでは、上記開示の分離されたポリヌクレオチドは以下より成るグループから選択されるポリヌクレオチドの配列を含む：(a) ヌクレオチド 1 ないしヌクレオチド 1614 の配列番号 4 に示すポリヌクレオチド配列；(b) ヌクレオチド 126 ないしヌクレオチド 779 の配列番号 1 に示すポリヌクレオチド配列；(c) ヌクレオチド 126 ないしヌクレオチド 833 の配列番号 1 に示すポリヌクレオチド配列；(d) ヌクレオチド 834 ないしヌクレオチド 1682 の配列番号 1 に示すポリヌクレオチド配列；(e) ヌクレオチド 126 ないしヌクレオチド 1682 の配列番号 1 に示すポリヌクレオチド配列；(f) ヌクレオチド 691 ないしヌクレオチド 1682 の配列

40

50

番号1に示すポリペプチド配列。別の実施態様では、上記分離されたポリヌクレオチドは以下より成るグループから選択されるアミノ酸残基の配列を含む：(a)アミノ酸番号20 (Cys) ないしアミノ酸番号237 (His)の配列番号2に示すアミノ酸配列：(b)アミノ酸番号20 (Cys) ないしアミノ酸番号255 (Leu)の配列番号2に示すアミノ酸配列：(c)アミノ酸番号256 (Lys) ないしアミノ酸番号538 (Ser)の配列番号2に示すアミノ酸配列：(d)アミノ酸番号20 (Cys) ないしアミノ酸番号538 (Ser)の配列番号2に示すアミノ酸配列：及び(e)アミノ酸番号1 (Met) ないしアミノ酸番号538 (Ser)の配列番号2に示すアミノ酸配列。別の実施態様では上記開示の分離ポリヌクレオチドは以下より成るグループから選択されるアミノ酸残基の配列より成る：(a)アミノ酸番号20 (Cys) ないしアミノ酸番号237 (His)の配列番号2に示すアミノ酸配列：(b)アミノ酸番号20 (Cys) ないしアミノ酸番号255 (Leu)の配列番号2に示すアミノ酸配列：(c)アミノ酸番号256 (Lys) ないしアミノ酸番号538 (Ser)の配列番号2に示すアミノ酸配列：(d)アミノ酸番号20 (Cys) ないしアミノ酸番号538 (Ser)の配列番号2に示すアミノ酸配列：及び(e)アミノ酸番号1 (Met) ないしアミノ酸番号538 (Ser)の配列番号2に示すアミノ酸配列。別の実施態様では、上記分離ポリペプチドは更にWSWSXドメインを含む。別の実施態様では、上記分離ポリヌクレオチドは更にトランスメンブレンドメインを含む。別の実施態様では、上記開示のポリヌクレオチドは配列番号2の残基238 (Leu) ないし255 (Leu)より成るトランスメンブレンドメインを含む。別の実施態様では、上記開示の分離ポリヌクレオチドは更に細胞内ドメインを含む。別の実施態様では、上記開示の分離ポリヌクレオチドは配列番号2の残基256 (Lys) ないし538 (Ser)より成る細胞内ドメインを含む。別の実施態様では、上記開示の分離ポリヌクレオチドは、ボックスI及びボックスIIを更に含む細胞内ドメインを含み、ポリペプチドが更にアフィニティータグを含む細胞内ドメインを含む。

【0006】

第2の観点では、本発明は以下の作用可能式に結合された要素を含む発現ベクターを提供する：プロモーターがDNA断片に作用可能式に連結し、DNA断片が転写ターミネーターに作用可能式に連結している転写プロモーター；アミノ酸番号20 (Cys) ないしアミノ酸番号538 (Ser)の配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するzalpha11ポリペプチドをコードするDNA断片；転写ターミネーター。実施態様の一つでは、上記開示の発現ベクターは更にDNA断片に作用可能式に連結した分泌シグナル配列を含む。

【0007】

第3の観点では本発明は、上記開示の発現ベクターを含む培養細胞にあって、その細胞がDNA断片によりコードされたポリペプチドを発現する培養細胞を提供する。

【0008】

第4の観点では、本発明は以下の作用可能式に結合された要素を含む発現ベクターを提供する：転写プロモーター；アミノ酸番号20 (Cys) ないしアミノ酸番号237 (His)の配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するzalpha11ポリペプチドをコードするDNA断片；転写ターミネーターにあって、前記プロモーターはDNA断片に作用可能式に連結され、DNA断片は転写ターミネーターに作用可能式に連結されている。実施態様の一つでは、上記開示の発現ベクターは更にDNA断片に作用可能式に連結した分泌シグナル配列を含む。別の実施態様では、上記開示の発現ベクターは更に作用可能式にDNA断片と連結したトランスメンブレンドメインを含む。別の実施態様では上記開示の発現ベクターは、配列番号2の238 (Leu) ないし255 (Leu)の残基より成るトランスメンブレンドメインを更に含む。別の実施態様では、上記開示の発現ベクターはDNA断片に作用可能式に連結された細胞内ドメインを含む。別の実施態様では上記開示の発現ベクターは、配列番号2の残基256 (Lys) ないし538 (Ser)より成る細胞内ドメインを更に含む。

【0009】

別の観点では、本発明はその中に請求項15による発現ベクターが導入される培養細胞にあって、細胞がDNA断片によりコードされた可溶性受容体ポリペプチドを発現する培養細胞を提供する。実施態様の一つでは、上記開示の培養細胞は外因性に添加された増殖に関する造血性成長因子に依存している。

【0010】

別の観点では、本発明は融合蛋白質をコードするDNA構築体であって、以下を含むDNA構築体を提供する；以下より成るグループから選択されるアミノ酸残基の配列を有するポリペプチドをコードする第1 DNA断片；(a)アミノ酸番号1 (Met)ないしアミノ酸番号19 (Gly)の配列番号2のアミノ酸配列；(b)アミノ酸番号20 (Cys)ないしアミノ酸番号237 (His)の配列番号2のアミノ酸配列；(c)アミノ酸番号20 (Cys)ないしアミノ酸番号255 (Leu)の配列番号2のアミノ酸配列；(d)アミノ酸番号238 (Leu)ないしアミノ酸番号255 (Leu)の配列番号2のアミノ酸配列；(e)アミノ酸番号238 (Leu)ないしアミノ酸番号538 (Ser)の配列番号2のアミノ酸配列；(f)アミノ酸番号256 (Lys)ないしアミノ酸番号538 (Ser)の配列番号2のアミノ酸配列；及び(g)アミノ酸番号20 (Cys)ないしアミノ酸番号538 (Ser)の配列番号2のアミノ酸配列；及び追加ポリペプチドをコードする少なくとも1の他DNA断片であり、上記第1 DNA断片と前記他DNA断片はインフレームに接続され；そして第1 DNA断片及び他DNA断片が融合蛋白質をコードするもの。

10

【0011】

別の観点では、本発明は以下の作用可能式に連結した要素を含む発現ベクターを供給する：転写プロモーター；上記融合蛋白質をコードするDNA構築体；及び転写ターミネーターであり、前記プロモーターは作用可能式にDNA構築体に連結され、そしてDNA構築体は転写ターミネーター作用可能式に連結されている。

【0012】

別の観点では、本発明は上記開示の発現ベクターを含む培養細胞であって、該細胞がDNA構築体によりコードされたポリペプチドを発現する培養細胞を提供する。

20

【0013】

別の観点では、本発明は以下を含む融合蛋白質を産生する方法を提供する：上記開示の細胞を培養すること；及び細胞により産生されたポリペプチドを分離すること。

【0014】

別の観点では、本発明は以下より成るグループから選択されるアミノ酸配列に少なくとも90%同一であるアミノ酸残基の配列を含む分離ポリペプチドを提供する：上記アミノ酸%同一が $ktup=1$ 、ギャップオープニングペナルティー (gap opening penalty) = 10、ギャップエクステンションペナルティー (gap extension penalty) = 1、及び置換マトリックス = BLOSUM62であり、その他パラメータがデフォルトに設定されたFASTAプログラムを用い決定される(a)アミノ酸番号20 (Cys)ないしアミノ酸番号237 (His)の配列番号2に示すアミノ酸配列；(b)アミノ酸番号20 (Cys)ないしアミノ酸番号255 (Leu)の配列番号2に示すアミノ酸配列；(c)アミノ酸番号256 (Lys)ないしアミノ酸番号538 (Ser)の配列番号2に示すアミノ酸配列；(d)アミノ酸番号20 (Cys)ないしアミノ酸番号538 (Ser)の配列番号2に示すアミノ酸配列；及び(e)アミノ酸番号1 (Met)ないしアミノ酸番号538 (Ser)の配列番号2に示すアミノ酸配列。実施態様の一つでは、上記開示の分離ポリペプチドは以下より成るグループから選択されるアミノ酸残基の配列を含む：(a)アミノ酸番号20 (Cys)ないしアミノ酸番号237 (His)の配列番号2に示すアミノ酸配列；(b)アミノ酸番号20 (Cys)ないしアミノ酸番号255 (Leu)の配列番号2に示すアミノ酸配列；(c)アミノ酸番号256 (Lys)ないしアミノ酸番号538 (Ser)の配列番号2に示すアミノ酸配列；(d)アミノ酸番号20 (Cys)ないしアミノ酸番号538 (Ser)の配列番号2に示すアミノ酸配列；及び(e)アミノ酸番号1 (Met)ないしアミノ酸番号538 (Ser)の配列番号2に示すアミノ酸配列。別の実施態様では、上記開示の分離ポリペプチドは以下よりなるグループから選択されるアミノ酸残基の配列より成る：(a)アミノ酸番号20 (Cys)ないしアミノ酸番号237 (His)の配列番号2に示すアミノ酸配列；(b)アミノ酸番号20 (Cys)ないしアミノ酸番号255 (Leu)の配列番号2に示すアミノ酸配列；(c)アミノ酸番号256 (Lys)ないしアミノ酸番号538 (Ser)の配列番号2に示すアミノ酸配列；(d)アミノ酸番号20 (Cys)ないしアミノ酸番号538 (Ser)の配列番号2に示すアミノ酸配列；及び(e)アミノ酸番号1 (Met)ないしアミノ酸番号538 (Ser)の配列番号2に示すアミノ酸配列。別の実施態様では、上記開示の分離ポリペプチドは更にWSXWSモチーフを含む。別の実施態様では、上記開示

30

40

50

の分離ポリペプチドは更にトランスメンブレンドメインを含む。別の実施態様では、上記開示のポリヌクレオチドは配列番号2の残基238 (Leu) ないし255 (Leu)より成るトランスメンブレンドメインを含む。別の実施態様では、上記開示の分離ポリヌクレオチドは更に細胞内ドメインを含む。別の実施態様では、上記開示の分離ポリヌクレオチドは配列番号2の残基256 (Lys) ないし538 (Ser)より成る細胞内ドメインを含む。別の実施態様では、上記開示の分離ポリヌクレオチドは、ボックスI及びボックスIIを更に含む細胞内ドメインを含み、ポリペプチドが更にアフィニティータグを含む細胞内ドメインを含む。

【0015】

別の観点では本発明は以下を含む、zalpha11ポリペプチドの産生方法を提供する：上記開示の細胞を培養すること；及び細胞により産生されたzalpha11ポリペプチドを分離すること。

10

【0016】

別の観点では、本発明は以下より成るグループから選択されるアミノ酸配列を含む分離ポリペプチドを提供する：(a)アミノ酸番号20 (Cys) ないしアミノ酸番号237 (His)の配列番号2に示すアミノ酸配列：そして前記ポリペプチドは造血性受容体に元来結合しているトランスメンブレンドメイン及び細胞内ドメインを実質的に持たない。別の実施態様では、上記開示の分離ポリペプチドはアフィニティータグを含む。

【0017】

別の観点では本発明は以下を含む、zalpha11ポリペプチドを産生する方法を提供する：上記開示の細胞を培養すること；及び細胞より産生されたzalpha11ポリペプチドを分離すること。

20

【0018】

別の観点では本発明は以下を含む、zalpha11ポリペプチドに対する抗体を産生する方法を提供する：動物に以下より成るグループから選択されたポリペプチドを接種すること：(a)9ないし519アミノ酸より成るポリペプチドにあって、前記ポリペプチドがアミノ酸番号20 (Cys) ないしアミノ酸番号538 (Ser)の配列番号2のアミノ酸の連続配列であるもの：(b)アミノ酸番号20 (Cys) ないしアミノ酸番号237 (His)の配列番号2のアミノ酸の連続配列より成るポリペプチド、(c)アミノ酸番号101 (Leu) ないしアミノ酸番号122 (Gly)の配列番号2のアミノ酸配列より成るポリペプチド：(d)アミノ酸番号141 (Asn) ないしアミノ酸番号174 (Ala)の配列番号2のアミノ酸配列より成るポリペプチド：(e)アミノ酸番号193 (Cys) ないしアミノ酸番号261 (Val)の配列番号2のアミノ酸配列より成るポリペプチド：(f)アミノ酸番号51 (Trp) ないしアミノ酸番号61 (Glu)の配列番号2のアミノ酸配列より成るポリペプチド：(g)アミノ酸番号136 (Ile) ないしアミノ酸番号143 (Glu)の配列番号2のアミノ酸配列より成るポリペプチド：(h)アミノ酸番号187 (Pro) ないしアミノ酸番号195 (Ser)の配列番号2のアミノ酸配列より成るポリペプチド：(i)アミノ酸番号223 (Phe) ないしアミノ酸番号232 (Glu)の配列番号2のアミノ酸配列より成るポリペプチド：及び(j)アミノ酸番号360 (Glu) ないしアミノ酸番号368 (Asp)の配列番号2のアミノ酸配列より成るポリペプチド：そして前記ポリペプチドが動物内に抗体を産生する免疫反応を誘導すること；及び動物より抗体を分離すること。

30

【0019】

別の観点では、本発明は上記開示の方法により産生された、zalpha11ポリペプチドに特異的に結合する抗体を提供する。実施態様の一つでは、上記開示の抗体はモノクローナル抗体である。

40

【0020】

別の観点では、本発明は上記開示のポリペプチドに特異的に結合する抗体を提供する。

【0021】

別の観点では、本発明は以下を含む、試験サンプル中のzalpha11蛋白質活性の存在を検出する方法を提供する：

【0022】

別の観点では、本発明は以下を含む、試験サンプル中のzalpha11蛋白質活性調節因子の存

50

在を検出する方法を提供する：細胞が試験サンプルがある状態及び無い状態でDNA断片によりコードされるzalpha11蛋白質を発現する、発現ベクターが導入された細胞を培養すること；及び生物学的又は生化学的アッセイにより、試験サンプル有り無しでのzalpha11活性のレベルを比較すること；ならびに試験サンプル中のzalpha11活性調節因子の存在を、前記比較より決定すること。

【0023】

別の観点では、本発明は以下を含む、試験サンプル中のzalpha11受容体検出法を提供する：試験サンプルをアミノ酸番号20 (Cys)ないしアミノ酸番号237 (His)の配列番号2に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドと接触させること；及びサンプル中のリガンドへのポリペプチドの結合を検出すること。実施態様の一つでは、上記開示の方法は、トランスメンブレン及び細胞内ドメインを含むポリペプチドを更に含む。別の実施態様では、上記開示の方法は培養細胞内に膜に結合するポリペプチドであるポリペプチド及び、培養細胞内の生物学的反応を測定することを含む検出段階を更に含む。別の実施態様では、上記開示の方法は、培養細胞内に膜に結合するポリペプチドであるポリペプチド、及び生物学的反応が細胞増殖又はレポーター遺伝子の転写活性化である培養細胞内の生物学的反応を測定することを含む検出段階を更に含む。別の実施態様では、上記開示の方法は固相支持体上に固定されたポリペプチドであるポリペプチドを更に含む。

本発明のこれら及びその他の観点は、以下の詳細な説明を参照することより明瞭になるだろう。

【0024】

発明の詳細な説明

発明を詳細に記載する前に、以下用語を定義することはその理解に役立つだろう：

”アフィニティータグ”という用語は、ここでは第2ポリペプチドの精製又は検出に供される第2ポリペプチドに結合できるポリペプチド断片、又は基質への第2ポリペプチドの結合に関する部位を提供するポリペプチド断片を意味するために用いられる。原則的には抗体又はその他特異的結合作用物質が利用できるペプチド又はポリペプチドは、アフィニティータグとして利用できる。アフィニティータグには、ポリーヒスチジントラクト、プロテインA (Nilssonら、EMBO J. 4: 1075, 1985; Nilssonら、Methods Enzymol. 198: 3, 1991)、グルタチオンSトランスフェラーゼ (SmithとJohnson, Gene 67:31, 1988)、Glu-Gluアフィニティータグ (Grussenmeyerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7952-4, 1985)、サブスタンスP、FlagTMペプチド (Hoppら、Biotechnology 6: 1204-10, 1988)、ストレプトアビジン結合ペプチド、又はその他抗原性エピトープ又は結合ドメインを含む。一般には、Fordら、Protein Expression and Purification 2: 95-107, 1991を見よ。アフィニティータグをコードするDNAは市販品が利用できる（例えばファルマシアバイオテック社 (Pharmacia Biotech)、Piscataway, NJ）。

【0025】

”対立遺伝子変異”という語は、ここでは同一染色体座を占める遺伝子の2またはそれ以上の変化形のいずれかを意味する。対立遺伝子変異は突然変異により自然に発生し、集団内に遺伝子及び表現形多形を生じる。遺伝子突然変異はサイレントであるか（コードされたポリペプチドは変化しない）、または変化したアミノ酸配列を持つポリペプチドをコードする。対立遺伝子変異という語は、ここでは遺伝子の対立遺伝子変異によりコードされた蛋白質も意味する。

【0026】

”アミノ末端”及び”カルボキシル末端”という用語は、ここではポリペプチド内の位置を示すために用いられる。文脈より可能な場合、これら用語は特定の配列を引用して、近接する位置又は相対位置を示すために用いられる。例えば、ポリペプチド内の参照配列のカルボキシル末端に位置する特定配列とは、参照配列のカルボキシル末端に隣接し位置するものであるが、必ずしもポリペプチドの完全なカルボキシル末端に存在する必要はない。

【0027】

”相補体／抗相補体対”という用語は、適当な条件の下に非共有結合的に結合した、安定した対を形成する非同一成分を意味する。例えば、ビオチンとアビジン（又はストレプトアビジン）は相補体／抗相補体対の原型メンバーである。その他の相補体／構想補体対の例には、受容体／リガンド対、抗体／抗原（又はハプテンあるいはエピトープ）対、センス／アンチセンスポリヌクレオチド対等が含まれる。相補体／構想補体対が後に分離することが望まれる場合、相補体／構想補体値は $< 10^9 \text{M}^{-1}$ の結合親和性を持つことが好ましい。

”ポリヌクレオチド分子の相補体”という用語は、参照配列に比し相補的な配列と逆向きの方向性を持つポリヌクレオチド分子を意味する。例えば、配列5'ATGCACGGG3'は5'CCCGTGCAT3'に相補的である。

10

【0028】

”コンティグ”という用語は、他のポリヌクレオチドに対する同一配列又は相補的配列の、連続的な張り出し部分を有するポリヌクレオチドを意味する。コンティグ配列とは、ポリヌクレオチドの張り出し部分が、あるポリヌクレオチド全体、又は一部張り出し部分と”重複”することを意味する。例えば、ポリヌクレオチド配列5'-ATGGCTTAGCTT-3'に対する代表的コンティグは5'-TAGCTTgagtct-3'及び3'-gtcgacTACCGA-5'である。

【0029】

用語”縮重ヌクレオチド配列”は、1又はそれ以上の縮重コドン（ポリペプチドをコードする参照ポリヌクレオチド分子に比べ）を含むヌクレオチドの配列を意味する。縮重コドンは、ヌクレオチドの別のトリプレットを含むが、同一アミノ酸残基をコードする（即ち、GAUとGACトリプレットは共にAspをコードする）。

20

【0030】

用語”発現ベクター”は、その転写体を提供する為の追加の断片と作用可能式に連結された所望ポリペプチドをコードする断片を含む、直鎖状又は環状のDNA分子を意味するのに用いられる。この様な追加断片は、プロモーター及びターミネーター配列を含み、又1またはそれ以上の複製起点、1又はそれ以上の選択可能マーカー、エンハンサー、ポリ阿德ニレーションシグナル等を含むだろう。発現ベクターは、一般にプラスミド又はウイルスDNAに由来するか、又はその両方のエレメントを含むだろう。

【0031】

用語”単離された”とは、ポリヌクレオチドに用いる場合には、ポリヌクレオチドがその天然環境より取り出され、従ってその他外部の、又は不要なコーディング配列は含まず、そして遺伝的に加工された蛋白質産生システム内での利用に好適な形状にあることを意味する。この様な分離された分子は、それらの天然環境より分離され、そしてcDNA及びゲノム性クローンを含むものである。本発明の単離されたDNA分子は、それらが通常結合している他の遺伝子を含まないが、しかし天然に生ずるプロモーターやターミネーターの様な5'及び3'非翻訳域は含むだろう。結合領域の特定は当分野熟練者にとって明瞭であろう（例えばDynanとTijan、Nature 316:774-78、1985）。

30

【0032】

”単離された”ポリペプチド又は蛋白質は、例えば血液及び動物組織から離れている様な、その天然環境以外の状態にて見いだされるポリペプチド又は蛋白質である。好ましい形態では、単離されたポリペプチドは本質的にその他のポリペプチド、特に動物起源のその他ポリペプチドを含まない。高度に精製された形状のポリペプチド、即ち95%以上、より好ましくは99%以上の純度であるポリペプチドを提供することが好ましい。この関連で利用される場合は、用語”単離された”は例えばダイマー、又は別の形に糖化もしくは誘導された形状の様な、別の物理形状の同一ポリペプチドの存在を排除しない。

40

【0033】

用語”作用可能式に連結された”は、DNA断片を参照する場合、断片がそれらが意図する目的、例えばプロモーター内にて転写が開始し、コーディング断片を経てターミネーターに至る様な目的に関し機能する様に配置されていることを意味する。

【0034】

50

用語 ” オルトログ ” は、異なる種に由来するポリペプチド又は蛋白質の機能的な対応体である、ある種より得たポリペプチド又は蛋白質を意味する。オルトログ間の配列の差は、種分化の結果である。

【0035】

” パラログ ” とは、生物体により作られる別種ではあるが構造的に関連した蛋白質である。パラログは遺伝子複製を介して生まれると考えられている。例えば α -グロブリン、 β -グロブリン及びミオグロビン相互にパラログである。

【0036】

” ポリヌクレオチド ” は5'から3'末端に読みとられるデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド塩基の単一又は2本鎖ポリマーである。ポリヌクレオチドはRNA及びDNAを含み、そして天然源より分離されるか、インビトロで合成されるか、又は天然及び合成分子の組合せより調製される。ポリヌクレオチドの大きさは塩基対(“bp”と略される)、ヌクレオチド(“nt”)又はキロベース(“kb”)により表される。文脈より可能な場合、後者2用語は単鎖又は2本鎖であるポリヌクレオチドを記述する。本用語を2本鎖分子に用いる場合、これは全長を意味する時に用いられ、用語 ” 塩基対 ” に等しいことが理解されるだろう。当業者は、2本鎖ポリヌクレオチドの2本の鎖は長さが僅かに異なること、及び酵素切断の結果としてその端部がずれることがあることを理解するだろう；即ち2本鎖ポリヌクレオチド分子内の全ての鎖が対合しないこともあるだろう。

【0037】

” ポリペプチド ” は、天然または合成的に作られるかに関わらず、ペプチド結合により連結されたアミノ酸残基のポリマーである。約10アミノ酸残基未満のポリペプチドは通常 ” ペプチド ” と呼ばれる。

【0038】

用語 ” プロモーター ” は、ここでは当分野にて認識される意味に用いられ、RNAポリメラーゼの結合及び転写の開始に供される遺伝子含有DNA配列の一部を意味する。プロモーター配列は、絶対ではないが通常遺伝子の5'非翻訳域内に存在する。

【0039】

” 蛋白質 ” (タンパク質) は、1またはそれ以上のポリペプチド鎖を含む高分子である。蛋白質は、炭水化物の様な非ペプチド成分も含むだろう。炭水化物及びその他非ペプチド性基質は、その蛋白質が産生される細胞により蛋白質に付加され、また細胞の型により変わるだろう。ここでは蛋白質はそれらのアミノ酸主鎖構造により定義される；炭水化物基の様な基質は一般には明記されていないが、その場合でも存在することがある。

【0040】

用語 ” 受容体 ” は、生物活性分子(即ちリガンド)に結合し、そして細胞にリガンドの作用を伝達する細胞結合蛋白質を意味する。受容体へのリガンドの結合は、受容体内に立体構造の変化を招き(そして、幾つかの例では受容体の多量体化、即ち同一または別レセプターサブユニットの結合)、これがエフェクタードメインと細胞内の他分子との間に相互作用を誘導する。次にこれら相互作用は細胞の代謝に変化を招く。受容体-リガンド相互作用に連結した代謝現象には、遺伝子の転写、リン酸化、脱リン酸化、環状AMP産生上昇、細胞カルシウムの代謝、イノシトール脂質の加水分解及びリン脂質の加水分解が含まれる。細胞表面サイトカイン受容体は、下記詳細論じる様な多ドメイン構造により特徴付けられる。これら受容体は、一般的には正に荷電された残基(Lys又はArg)が近接する疎水性アミノ酸残基(典型的には21-25残基)の配列により特徴付けられるトランスメンブレンドメインにより、細胞膜内に固定される。一般に受容体は、膜結合性の細胞質性又は核性である；単量体(例えば甲状腺刺激ホルモン受容体、ベータアドレナリン性受容体)又は多量体(例えばPDGF受容体、成長ホルモン受容体、IL-3受容体、GM-CSF受容体、G-CSF受容体、エリスロポイエチン受容体及びIL-6受容体)である。用語 ” 受容体ポリペプチド ” は、分離された機能ドメイン(例えばリガンド結合ドメイン)を含む、完全な受容体ポリペプチド及びその一部を意味するのに利用される。

用語 ” 分泌シグナル配列 ” は、大型のポリペプチドの成分として、それが合成される細胞

10

20

30

40

50

内の分泌経路に大型のポリペプチドを方向付けするポリペプチド（“分泌ペプチド”）をコードするDNA配列を意味する。大形ポリペプチドは通常分泌経路通過中に分断され、分泌ペプチドが除かれる。

【0041】

“可溶性受容体”は、細胞膜に結合しない受容体ポリペプチドである。可溶性受容体の多くは一般に、トランスメンブレン及び細胞質ドメインを欠くりガンド結合受容体ポリペプチドである。可溶性受容体は、ポリペプチド精製又は基質へのポリペプチドの結合のために提供されるアミノ酸残基の様なアフィニティータグ、もしくは免疫グロブリン定常域配列の様な追加のアミノ酸残基を含むことができる。多くの細胞表面受容体は天然に生じ、その可溶型は蛋白質分解により産生される。可溶性受容体ポリペプチドは、それらが膜固定又はシグナル伝達それぞれを提供するそれら断片の十分な部分を欠くとき、実質的には膜貫通及び細胞質ポリペプチド断片を持たないと言われている。

10

【0042】

用語“スプライス変異体”はここでは遺伝子から転写されるRNAの別形状を意味するのに用いられる。スプライス変異は天然には、転写されたRNA分子内、又は一般的ではないが別々に転写されたRNA分子間にある別のスプライシング部位が利用されることで生じ、その結果同一遺伝子より複数のmRNAが生じるだろう。スプライス変異体は、変更されたアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするだろう。スプライス変異体という用語は、ここでは遺伝子より転写されたmRNAのスプライス変異体によりコードされる蛋白質を意味する場合にも用いられる。

20

【0043】

不正確な分析方法（例えばゲル電気泳動法）により決定されたポリマーの分子量及び長さは、おおよその値と理解されるだろう。この様な値を“約”X又は“おおよそ”Xと表される場合には、記載された値Xは±10%の正確性であると理解されるだろう。

【0044】

ここに引用された参考資料は、その全てが参照されて取り込まれている。

本発明は、クラスI サイトカイン受容体の構造を持つ蛋白質をコードする新規DNA配列の発見に一部基づく。演繹アミノ酸配列は、コードされた受容体がIL-2受容体β-サブユニット、及びβ-共通受容体（即ちIL3、IL-5及びGM-CSF受容体β-サブユニット）を含む受容体サブファミリーに属していることを示した。この新規DNAに対応するmRNAの組織分布の分析から、リンパ節、末梢白血球（PBLs）、脾臓及び胸腺内での発現が示された。更にmRNAはパーキットリンパ腫由来のRaji細胞株（ATCC番号CCL-86）内に豊富であった。ポリペプチドはzalpha11と命名された。

30

【0045】

本発明の新規zalpha11ポリペプチドは、ESTデータベースの検索により最初に同定された。ESTが発見されその対応cDNAが配列決定された。このcDNAにコードされた新規ポリペプチドはクラスI サイトカイン受容体と相同性を示した。zalpha11ポリペプチド配列は推定蛋白質の全コーディング配列をコードしていた。zalpha11はアポトーシス細胞経路、細胞-細胞シグナル伝達分子、増殖因子受容体又は増殖因子ホルモン活性を持つ細胞外マトリックス結合蛋白質等と関係する新規サイトカイン受容体である。

40

【0046】

zalpha11ポリペプチドの配列は、その対応ポリペプチド配列を含む単一クローンより演繹された。このクローンは脊髄ライブラリーより得た。この様な配列が検索あれるであろう他のライブラリーにはPBL、胸腺、脾臓、リンパ節、ヒト赤白血病細胞株（例えばTF-1）、Raji細胞、急性単核球性白血病細胞株、その他リンパ腫、及び造血性細胞株等が含まれる。

【0047】

代表的なzalpha11をコードするDNAは配列番号1（ヌクレオチド69ないし1682）に記載されており、それより演繹された538アミノ酸配列は配列番号2に記載される。その全体に於いて、zalpha11ポリペプチド（配列番号2）は完全長ポリペプチド断片（配列番号2の

50

残基 1 (Met)から残基538 (Ser)) を表す。zalpha11のドメイン及び構造上の特徴を以下詳細に記す。

【0048】

配列番号 1 のDNA配列によりコードされたzalpha11ポリペプチドの分析は、19アミノ酸残基の推定分泌シグナルペプチド (配列番号 2 の残基 1 (Met) ないし残基19 (Gly)) 及び519アミノ酸の成熟ポリペプチド (配列番号 2 の残基20 (Cys) ないし残基538 (Ser)) を含む519アミノ酸) を含む538アミノ酸 (配列番号 2) コードするオープンリーディングフレームを表した。配列番号 2 の残基214ないし218に相当するWSXWSモチーフ (配列番号 3) に加え、受容体は約200アミノ酸残基 (配列番号 2 の残基20 (Cys)ないし237 (His)) のサイトカイン結合ドメイン; ドメインリンカー (配列番号 2 の残基120 (Pro)ないし123 (Pro)) ; 末位から 2 番目の鎖領域 (配列番号 2 の残基192 (Lys)ないし202 (Ala)) ; トランスメンブレンドメイン (配列番号 2 の残基238 (Leu)ないし255 (Leu)) ; ” ボックス I ” シグナル伝達部位 (配列番号 2 の残基267 (Ile)ないし273 (Pro)) 及び ” ボックスII ” シグナル伝達部位 (配列番号 2 の残基301 (Leu)ないし304 (Gly)) を含む完全細胞内シグナル伝達ドメイン (配列番号 2 の残基256 (Lys)ないし538 (Ser))、を含む。当業者はこれらドメインの境界がおおよそであり、既知蛋白質のアラインメント及び蛋白質折りたたみの推測に基づくものであることを容易に認識するだろう。これらドメインに加え、コードされた受容体中の保存された受容体の特徴には (配列番号 2 に示すように)、位置138の保存Trp残基及び位置201の保存Arg残基がある。上記のzalpha11ポリペプチド領域、ドメイン、モチーフ、残基、及び配列をコードする対応ヌクレオチドは配列番号 1 に示される。

【0049】

トランスメンブレン領域の存在、及び保存された低変異性モチーフの存在は一般に、蛋白質内の重要な構造領域に関連するか、又はこれを規定している。低変異性領域 (例えば疎水性クラスター) は、一般には構造上重要な領域に存在している (Sheppard、Pら、上記) 。この様な低変異性領域は、しばしばトリプトファンの様な稀又は低頻度アミノ酸を含む。これら保存された低変異性モチーフに隣接する、及びその間にある領域は、結合ドメイン、生物学的及び酵素的活性、シグナル伝達、細胞-細胞相互作用、組織局在ドメイン等の様な重要な構造及び活性に関連または規定していることから、より多様性であるが、しばしば機能的には重要であろう。例えば、上記の領域 1 から 4 は機能的に重要であろう。

【0050】

上記のzalpha11内の保存アミノ酸残基領域は、新規ファミリーメンバーの同定のツールに利用できる。例えば逆転写ポリメラーゼチェーンリアクション (RT-PCR)を使い、各種組織源又は細胞株より得たRNAから保存域をコードする配列を増幅できる。特にこの目的に関しては、zalpha11配列より設計された高度に縮重されたプライマーが有用であろう。この様な縮重プライマーの設計及び利用は、当業者に容易に実施されるだろう。

【0051】

本発明は更に、ここに開示されたzalpha11ポリペプチドをコードするDNA及びRNA分子を含む、ポリヌクレオチド分子を提供する。当分野熟練者は、遺伝子コードの縮重性の観点に於いて、これらポリヌクレオチド分子には相当の配列多様性があることを容易に理解するだろう。配列番号 4 は、配列番号 2 のzalpha11ポリペプチドをコードする全てのDNAを包含する縮重DNA配列である。当分野熟練者は、配列番号 4 の縮重配列はTをUに置換することで配列番号 2 をコードする全てのRNA配列も提供することを理解するだろう。即ち、zalpha11ポリペプチドをコードする、配列番号 4 のヌクレオチド 1 ないしヌクレオチド1614ポリヌクレオチド及びそれらのRNA等価体は本発明に包含される。表 1 は、縮重ヌクレオチド位置を示すための配列番号 4 内で使用された 1 文字コードを示している。 ” リソリューション ” は、コード文字で表されたヌクレオチドである。 ” 相補体 ” は、相補的ヌクレオチドのコードを示す。例えばコード Y は、C 又は T であり、その相補体 R は A 又は G であり、A は T に対し相補的であり、そして G は C に相補的であることを表している。

【 0 0 5 2 】

表 1

ヌクレオチド	リソリ्यूション	相補体	リソリ्यूション
A	A	T	T
C	C	G	G
G	G	C	C
T	T	A	A
R	A G	Y	C T
Y	C T	R	A G
M	A C	K	G T
K	G T	M	A C
S	C G	S	C G
W	A T	W	A T
H	A C T	D	A G T
B	C G T	V	A C G
V	A C G	B	C G T
D	A G T	H	A C T
N	A C G T	N	A C G T

10

【 0 0 5 3 】

あるアミノ酸に関し考え得る全てのコドンを含む配列番号 4 に用いられる縮重コドン
を表 2 に示す。

20

表 2

アミノ酸	1 文字コード	コドン	縮重コドン
Cys	C	TGC TGT	TGY
Ser	S	AGC AGT TCA TCC TCG TCT	WSN
Thr	T	ACA ACC ACG ACT	ACN
Pro	P	CCA CCC CCG CCT	CCN
Ala	A	GCA GCC GCG GCT	GCN
Gly	G	GGA GGC GGG GGT	GGN
Asn	N	AAC AAT	AAY
Asp	D	GAC GAT	GAY
Glu	E	GAA GAG	GAR
Gln	Q	CAA CAG	CAR
His	H	CAC CAT	CAY
Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGT	MGN
Lys	K	AAA AAG	AAR
Met	M	ATG	ATG
Ile	I	ATA ATC ATT	ATH
Leu	L	CTA CTC CTG CTT TTA TTG	YTN
Val	V	GTA GTC GTG GTT	GTN
Phe	F	TTC TTT	TTY
Tyr	Y	TAC TAT	TAY
Trp	W	TGG	TGG
Ter	.	TAA TAG TGA	TRR
Asn1Asp	B		RAY
GluGlu	Z		SAR
Any	X		NNN

30

40

【 0 0 5 4 】

当業熟練者は、各アミノ酸をコードする可能性のある全てのコドンを代表する縮重コドン
の決定には、若干の多義性が導入されることを認識するだろう。例えば、セリン（WSN）

50

の縮重コドンは、ある条件ではアルギニン（AGR）をコードでき、アルギニン（MGM）の縮重コドンはある場合にはセリン（AGY）をコードできる。同様の関係は、フェニルアラニンとロイシンをコードするコドンの間にも存在する。即ち縮重コドンにより包含される幾つかのポリヌクレオチドは、変異体アミノ酸配列コードすることがあるが、当業者は配列番号2に示すアミノ酸配列を参照することで、この様の変異体配列を特定することができる。変異体配列はここに記す機能性に関し容易に試験することができる。

【0055】

当業熟練者は、別種が”優先的コドン利用”を示すことを理解するだろう。一般にはGranthamら、Nuc. Acids Res. 8:1393-912, 1980; Hassら、Curr. Biol. 6:315-24, 1996; Wain-Hobsonら、Gene 13: 355-64, 1981; Wain-Hobsonら、Gene 13:355-64, 1981; GrosjeanとFiers, Gene 18: 199-209, 1982; Holm, Nuc. Acids Res. 14:3075-87, 1986;ならびにIkemura, J. Mol. Biol. 158:573-97;1982を見よ。ここで使用する”優先的コドン利用”又は”優先コドン”とは、特定の細胞内に最も頻繁に利用される蛋白質翻訳コドン、即ち核アミノ酸をコードする考え得るコドンの中にある1または若干数の好都合例を示す用語である（表2参照）。種に好ましいコドンは、当分野既知の各種方法により、本発明のポリペプチド内に取り込むことができる。組換え体DNAに好適コドン配列を導入することで、例えば特定のタイプ又は種の細胞に於ける蛋白質の翻訳をより効率化することにより、蛋白質の産生を促進する。例えばアミノ酸のスレオニン（Thr）はACA、ACC、ACG、又はACTによりコードされるが、哺乳動物細胞ではACCが最も一般的に利用されるコドンである；別の種、例えば昆虫細胞、酵母、ウイルス、又は細菌では、別のThrコドンが優先するだろう。特定種に関する優先コドンは、当分野既知の各種方法により、本発明のポリヌクレオチド内に導入できる。優先コドン配列の組換え体DNA内への導入は、例えば特定の細胞型又は種内でより効率的な蛋白質翻訳を行うことで、蛋白質の産生を増強する。従って、配列番号4に開示されている縮重コドン配列は、当分野に通常用いられここに開示されている各種タイプの細胞及び種に於けるポリヌクレオチドの発現を最適化する為の鋳型として機能する。優先コドンを含む配列は、様々な種に於ける発現に関し試験及び最適化でき、またここに開示された機能性に関しても試験できる。

【0056】

発明の好適実施態様では、分離されたポリヌクレオチドは配列番号1の同様の大きさの領域、又はそれに相補的な配列とストリンジェント条件下にハイブリダイズするだろう。一般に、ストリンジェント条件は、所定のイオン強度及びpHに於ける特定配列に関する熱融解点(Tm)より約5℃低くなる様に選択される。Tmは、標的配列の50%が好ましく適合するプローブにハイブリダイズする温度（所定イオン強度とpHに於いて）である。各種Tm温度計算法が当分野既知であり、またDNA、RNA及びDNA-RNAハイブリッド及び各種長さのポリヌクレオチドプローブ配列に特異的である（Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition(Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989); Ausubelら、(編集)Current Protocols in Molecular Biology, (John Wiley and Sons, Inc. 1987); BergerとKimmel（編集）Guide to Molecular Cloning Techniques, (Academic Press, Inc. 1987);及びWetmur、Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 26:227 (1990))。OLIGO 6.0 (LSR;Long Lake, MN)及びPrimer Premier 4.0(Premier Biosoft International; Palo Alto, CA)の様な配列分析ソフトウェア、ならびにインターネットサイトは、特定配列の分析とユーザーが規定した基準に基づくTmの計算に利用可能なツールである。この様なプログラムは特定配列を一定条件下に分析することも、また好適なプローブ配列を特定することもできる。典型的には、長さの長い配列のハイブリダイゼーション（例えば>50塩基対）は、計算されたTmに比べ約20-25℃低い温度で実施される。より小さいプローブ（例えば<50塩基対）のハイブリダイゼーションは、典型的にはTm又はそれより5-10℃低い温度で実施される。これによりDNA-DNA及びDNA-RNAハイブリッドに関し、ハイブリダイゼーション率は最大になる。低温に於ける高厳密性は、緩衝液中のフォルムアミド濃度1%毎に、ハイブリッド温度を約1℃下げるフォルムアミドの添加により達成される。好適ストリンジェントハイブリダイゼーション条件は、以下を含む溶液に於ける42℃、5時間

から一晩のインキュベーションである：約40-50%のフォルムアミド、約6×までのSSC、約5×Denhardt溶液、0から10%までの硫酸デキストラン、及び約10-20 µg/mlの変性された市販のキャリアーDNA。一般にこのストリンジェント条件は、20-70℃の温度、及び6×までのSSC及び0-50%のフォルムアミドを含むハイブリダイゼーション液を含む；ハイブリダイゼーション後、フィルターは更に約2×までのSSCにて洗浄される。例えば、好適な洗浄条件は、0.1×SSCから2×SSC、0.1%SDS、55℃から65℃である。標的配列への最大の特異結合を達成することを目的とし、様々なストリンジェンシー度を利用することができる。典型的には、ハイブリダイゼーション後の洗浄では、ストリンジェンシー度を高めることによってハイブリダイズ複合体から非ハイブリダイズポリヌクレオチドプローブを除く。ハイブリダイゼーション及び洗浄のストリンジェント条件は、T_mの温度を反映し、プローブの長さ及び使用するハイブリダイゼーション液と洗浄液に依存し、そして日常的には当業者により経験的に決定される。

10

【0057】

前述の様に、単離された本発明のポリヌクレオチドはDNA及びRNAを含む。DNA及びRNAの調製方法は当分野公知である。一般にRNAは大量の α 11 RNAを産生する組織、又は細胞から分離される。これら組織及び細胞は、ノーザンブロッティングにより特定され(Thomas、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:5201, 1980)、及びPBLs、脾臓、胸腺及びリンパ組織、Raji細胞、ヒト赤白血病細胞株(例えばTF-1)、急性単球性白血病細胞株、その他リンパ腫及び造血性細胞株等を含む。総RNAはグアニジンイソチオシアネート抽出法と、それに続くCsCl勾配中での遠心分離による分離によって調製できる(Chirgwinら、Biochemistry 18: 52-94, 1979)。相補的DNA(cDNA)は既知の方法を利用し、ポリ(A)+RNAより調製される。あるいは、ゲノムDNAが分離できる。次に α 11ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、例えばハイブリダイゼーション法又はポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)(Mullis、米国特許第4,683,202号)により特定され、また分離される。

20

【0058】

α 11をコードする全長クローンは、通常のクローニング法により得ることができる。相補的DNA(cDNA)クローンが好ましいが、幾つかの応用では(例えば、トランスジェニック動物での発現)ゲノムクローンを利用すること、又は少なくとも1つの同遺伝子又は別遺伝子に由来するゲノミックイントロンを含む様にcDNAを変更することが好ましい。cDNA又はゲノミッククローンの調製方法は当分野公知であり、熟練者のレベル内であり、またライブラリーをプロービングし、又はプライミングすることへのここに開示された配列又はその一部の利用を含む。発現ライブラリーは、 α 11、受容体断片に対する抗体、又はその他特異的結合相手により探索できる。

30

【0059】

本発明ポリヌクレオチドは、DNA合成装置を使用して合成することもできる。今回選択された方法は、フォスフォルアミダイト法である。遺伝子又は遺伝子断片の合成の様な応用に化学的に合成された2本鎖DNAが必要な場合、各相補鎖は別々に合成される。短いポリヌクレオチド(60ないし80bp)の製造は、技術的には直線的に行われ、相補鎖を合成し、次にそれらをアニーリングすることで達成できる。しかし、より長い鎖を作る場合(>300bp)には、DNAの化学合成中の各サイクルの結合効率が100%になることは殆どないことから、特別な方策が通常用いられる。この問題を克服するために、20ないし100ヌクレオチド長の1本鎖断片から合成遺伝子(2本鎖)をモジュラー形式が組み立てられる。

40

【0060】

合成遺伝子を形成するための方法の1つでは、まずそれぞれが20ないし60ヌクレオチドの長さである重複する相補的オリゴヌクレオチドのセットを合成することを必要とする。遺伝子のそれぞれの内部部分は、近接する部分と正確に塩基対を形成する様に設計された相補的な3'末端及び5'末端突起を有している。即ち、この遺伝子を組み立てた場合、その工程は2本の鎖の骨格にそって存在している切れ目をT4DNAライゲーズを用いて埋めることで完了する。蛋白質コーディング域に加え、合成遺伝子はクローニングベクターの制限エンドヌクレアーゼ部位内への挿入を促進する、ターミナル配列を持つように設計できる。更

50

に、適当な転写及び翻訳の開始及び停止に関するシグナルを含む別の配列を加えることができる。

【0061】

完全長遺伝子を調製する別の方法は、重複するオリゴヌクレオチド（40ないし100ヌクレオチド）の特異的セットを合成することである。3'及び5'の短い重複した相補域（6ないし10ヌクレオチド）をアニーリングすると大きなギャップがまだ残っているものの、構造を一つに保持するのに十分な長さで安定性を持つ短い塩基対域ができる。このギャップを埋め、大腸菌DNAポリメラーゼIにより酵素的にDNAを合成することでDNA 2重鎖を完成させる。酵素による合成が終了した後、切れ目はT4DNAリガーゼにより埋められる。続いて2本鎖構築体は相互に結合され、全遺伝子が形成され、更にDNA配列分析により確認される。GlickとPasternak、Molecular Biotechnology, Principles & Applications of Recombinant DNA, ASM Press, Washington, D.C., 1994; Itakuraら、Annu. Rev. Biochem., 53: 323-56, 1984;及びClimieら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 633-7, 1990を見よ。

10

【0062】

本発明は更に別種（オルトログ）由来の対応するポリペプチド及びポリヌクレオチドも提供する。これら他種には哺乳動物、鳥類、両生類、は虫類、魚類、昆虫及びその他脊椎動物、並びに無脊椎動物が含まれるが、これに限定されない。特に興味深いものは、ネズミ、ブタ、ヒツジ、ウシ、イヌ、ネコ、ウマ及びその他霊長類ポリペプチドを含む、他哺乳動物種由来の α 11ポリペプチドである。ヒト α 11のオルトログは、本発明により提供される情報と組成物を、通常のクローニング技術と組み合わせることでクローン化できる。例えば、cDNAはここに開示される α 11を発現するタイプの組織又は細胞より得たmRNAを用い、クローン化できる。mRNAの好適供給源はここに開示された配列より設計されるプローブを用いたノーザンブロットをプロービングすることで特定できる。次に、陽性組織、又は細胞株のmRNAよりライブラリーが調整できる。次に α 11をコードするcDNAは、完全又は部分ヒトcDNAを用いたプロービング、又は開示配列に基づく1またはそれ以上の変性プローブのセットを用いたプロービングの如くの各種方法により分離できる。cDNAもここに開示された代表的ヒト α 11配列より設計されたプライマーを利用するポリメラーゼチェーンリアクション又はPCR (Mullis、上記)を用いクローン化できる。その他の方法では、cDNAライブラリーを用いて宿主細胞を形質転換、又はトランスフェクトすることができ、また所望cDNAの発現を α 11ポリペプチドに対する抗体により検出することができる。同様の技術はゲノムクローンの分離にも応用できる。

20

30

【0063】

サイトカイン受容体サブユニットは、細胞外ドメイン、細胞膜内にペプチドを固定するトランスメンブレンドメイン、及び細胞内ドメインを含む複数ドメイン構造により特徴付けられる。リガンド結合及びエフェクター機能は多量体受容体の別々のサブユニットに属すると考えられるが、細胞外ドメインはリガンド結合ドメインであり、細胞内ドメインはシグナル伝達に関係していると考えられている。リガンド結合ドメイン自体は多ドメイン構造体である。多量体受容体はホモダイマー（例えばPDGF受容体 $\alpha\alpha$ 及び $\beta\beta$ イソ型、エリスロポイエチン受容体、MPL、ならびにG-CSF受容体）、サブユニットそれぞれがリガンド結合及びエフェクタードメイン（例えばPDGF受容体 $\alpha\beta$ イソ型）ヘテロダイマー、及び異なる機能を持ったコンポーネントサブユニット（例えばIL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7及びGM-CSF受容体）を有する多量体を含む。幾つかの受容体レセプターは複数の受容体で共通である。例えばそれ自体の上にリガンドを結合できないがシグナル伝達ドメインを含むAIC2BサブユニットはIL-3及びGM-CSF受容体の構成成分である。多くのサイトカイン受容体はその構造と機能に基づく4つの関連ファミリーの一つに分類される。例えば造血性受容体は、保存されたシステイン残基及びWSXWSモチーフ（配列番号3）を含むドメインの存在によって特徴付けられる。サイトカイン受容体の構造についてはUrdal, Ann. Reports Med. Chem. 26:221-228, 1991及びCosman, Cytokine 5:95-106, 1993にレビューされている。新たな生物学的機能獲得に関する選択圧の下、既存受容体遺伝子の複製によ

40

50

り新規受容体ファミリーが生じ、多遺伝子ファミリーが存在する様になったのだろう。従ってファミリーメンバーは先祖遺伝子の痕跡を含んでおり、これら特徴的な特質は更なるファミリーメンバーの分離と同定に活用できる。即ち、サイトカイン受容体スーパーファミリーは更に例えば免疫グロブリンファミリー（CSF-1、MGF、IL-1及びPDGF受容体を含む）；造血因子ファミリー（IL-2受容体βサブユニット、GM-CSF受容体αサブユニット、GM-CSF受容体βサブユニット；及びG-CSF、EPO、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7ならびにIL-9の受容体を含む）；TNF受容体ファミリー（TNF9p80）TNF8p60）受容体、CD27、CD30、CD40、Fas及びNGF受容体）の様な複数のファミリーに分類される。

【0064】

zalpha11配列の解析は、これがIL-2受容体βサブユニット、IL-3、IL-4及びIL-6受容体と同一の受容体サブファミリーのメンバーであることを示唆している。このサブファミリー（例えばG-CSF）の特定受容体は結合し、シグナルを伝達するホモダイマーを形成する。このサブファミリーの他のメンバー（例えばIL-6、IL-11及びLIF受容体）は第2サブユニット（βサブユニットと呼ばれる）と連合してリガンドに結合し、シグナルを伝達する。特有のβサブユニットは複数の特異的サイトカイン受容体サブユニットに結合する。例えば、βサブユニットgp130（Hibiら、Cell 63:1149-1157, 1990）はIL-6、IL-11及びLIFに特異的な受容体サブユニットに結合する（Gearingら、EMBO J. 10:2839-2848, 1991; Gearingら、米国特許第5,284,755号）。オンコスタチンMはLIF受容体のヘテロダイマー及びgp130に結合する。CNTGはCNTF受容体、LIF受容体及びgp130サブユニットを含む3量体受容体に結合する。

【0065】

ヒトzalpha11のマウス相同体のポリヌクレオチド配列が同定されており、配列番号84に示され、そして対応するアミノ酸配列は配列番号85に示されている。配列番号84のDNA配列にコードされるマウスzalpha11ポリペプチドの分析は、19アミノ酸残基の推定分泌シグナルペプチド（配列番号2の残基1（Met）ないし残基19（Gly））及び510アミノ酸の成熟ポリペプチド（配列番号2の残基20（Cys）ないし残基529（Ser））を含む529アミノ酸（配列番号85）コードするオープンリーディングフレームを表した。配列番号85の残基214ないし218に相当するWSXWSモチーフ（配列番号3）に加え、受容体は約200アミノ酸残基（配列番号2の残基20（Cys）ないし237（His））のサイトカイン結合ドメイン；ドメインリンカー（配列番号85の残基120（Pro）ないし123（Pro））；末位から2番目の鎖領域（配列番号85の残基192（Lys）ないし202（Ala））；トランスメンブレンドメイン（配列番号85の残基238（Met）ないし254（Leu））；”ボックスI”シグナル伝達部位（配列番号85の残基266（Ile）ないし273（Pro）及び”ボックスII”シグナル伝達部位（配列番号2の残基301（Leu）ないし304（Val））を含む完全細胞内シグナル伝達ドメイン（配列番号85の残基255（Ile）ないし529（Ser））、を含む。ヒト及びマウスアミノ酸配列の比較は、ヒト及びオルトログポリペプチドが上記の対応する構造的特徴を含むことを示している（図2参照）。マウスzalpha11の成熟配列は、Cys20（配列番号85に示す）で開始するが、これはヒト配列中のCys20（配列番号2に示す）に相当する。マウスとヒト配列は、配列番号2及び配列番号85に相当する全体アミノ酸配列に関し約63%の同一性を有している。配列番号の残基20（Cys）ないし237（His）及び配列番号85の残基20（Cys）ないし237（His）に相当する細胞外サイトカイン結合ドメインについては、マウス及びヒトZalpha11配列間には約69%の同一性がある。配列番号の残基256（Lys）ないし538（Ser）及び配列番号85の残基255（Lys）ないし529（Ser）に相当する細胞内シグナル伝達ドメインに関しては、マウス及びヒトZalpha11配列間に約60%の同一性がある。上記%同一率は、ktup=1、ギャップオープンペナルティー（gap opening penalty）=12、ギャップエクステンションペナルティー（gap extension penalty）=2、及び置換マトリックス=BLOSUM62であり、その他パラメータがデフォルトに設定されたFASTAプログラムを用い決定された。上記のマウスzalpha11ポリペプチド域、ドメイン、モチーフ、残基及び配列をコードする対応ポリヌクレオチドは配列番号84に示されている。

【0066】

当業者は配列番号 1 開示の配列がヒト zalpha11 の 1 対立遺伝子を表すものであること、そして対立遺伝子及び変更スプライシングを含む自然変異の生起が予想されることを認識するだろう。この配列の対立遺伝子変異体は、cDNA 又は各種個体より通常法によって得たゲノムライブラリーをプロービングすることでクローン化できる。サイレント変異及びアミノ酸配列を変化させる突然変異を含む配列番号 1 に示す DNA 配列の対立遺伝子変異体、及び配列番号 2 の対立遺伝子変異体である蛋白質は本発明の範囲である。zalpha11 のポリペプチドの特性を保持する、別の形にスプライシングされた mRNA より生じた cDNA は、これら cDNA 及び mRNA によりコードされるポリペプチドが上記である場合は本発明の範囲である。これら配列の対立遺伝子変異及びスプライス変異は、当分野公知の標準的方法により各種個体又は組織より得た cDNA 又はゲノムライブラリーをプロービングすることで、クローン化できる。

10

【0067】

本発明は配列番号 2 のポリペプチド及びそれらのオルトログに本質的に類似である分離された zalpha11 ポリペプチドも提供する。用語 "本質的に類似" とは、ここでは配列番号 2 に示す配列又はそのオルトログに対し少なくとも 70%、より好ましくは少なくとも 80% の配列同一性を持つポリペプチドを意味するのに用いられる。この様なポリペプチドは、より好ましくは配列番号 2 又はそのオルトログに対し少なくとも 90%、最も好ましくは 95% 同一である。配列同一性は通常の方法によって決定される；例えば Altschul ら、Bull. Math. Bio. 48:603-616, 1986, 及び Henikoff と Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919, 1992 を参照せよ。簡単に述べると、2 つのアミノ酸配列を、ギャップオープンニングペナルティー 10、ギャップエクステンションペナルティー 1、そして表 3 (アミノ酸は通常 1 文字コードで示している) に示す Henikoff と Henikoff (上記) の "blosum62" スコアリングマトリックスを用い、アラインメントスコアが最適になるよう整列させる。次に同一性 % を次式より計算する：

20

同一適合の総数 $\times 100$

[2 配列を整列するために長い方の配列に加えた
ギャップ数 + 長い方の配列の長さ]

【0068】

【表 1】

表3

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4																			
R	-1	5																		
N	-2	0	6																	
D	-2	-2	1	6																
C	0	-3	-3	-3	9															
Q	-1	1	0	0	-3	5														
E	-1	0	0	2	-4	2	5													
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4										
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5							
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6						
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7					
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4				
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5			
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11		
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

【0069】

ポリヌクレオチド分子の配列同一性は上記に開示した割合を利用し、同様の方法によって決定される。

【0070】

当業者は2種類のアミノ酸配列の整列に利用できる確立されたアルゴリズムが多く存在することを認識している。PearsonとLipmanによる"FASTA"類似性検索アルゴリズムは、ここに開示されたアミノ酸配列と推定変異体zsig57ポリペプチドの持つ同一性レベルの検討に適した好適な蛋白質整列法である。FASTAアルゴリズムはPearsonとLipman、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444, (1988) 及びPearson、Meth. Enzymol. 183:63 (1990) により記述されている。

【0071】

簡単に述べると、FASTAはまず保存的なアミノ酸置換、挿入、あるいは欠失を考慮せずに同一性 (ktup変数が1の場合)、あるいは同一ペア (ktup=2の場合) の密度が最大になる様に、対象配列 (例えば配列番号2) と試験配列間に共有される領域を特定して配列の類似性を特徴付ける。次にアミノ酸置換マトリックスを用い、対合する全てのアミノ酸の類似性を比較し、最高のスコアになる様に残基を切断し領域端部を"切りそろえ"、最高の

同一性密度を示す10カ所の領域を再度スコア化する。 ”カットオフ” 値（配列の長さ $\times$ ktup値より前もって定められた式に従い計算された）よりも大きなスコアを示す領域が複数ある場合には、続いて切りそろえられた最初の領域を再度検討、領域を連結してギャップを持つ適当なアラインメントができるか調べる。最後に、アミノ酸挿入と欠失を考慮したNeedleman-Wunsh-Sellersのアルゴリズム（NeedlemanとWunsh, *J. Mol. Biol.* 48:444 (1970); Sellers, *SIAM J. Appl. Math.* 26: 787 (1974)）の変法を利用し、2アミノ酸配列の最高スコア域を揃え並べる。FASTA分析の好適パラメータは：ktup=1、ギャップオープニングペナルティー=10、ギャップエクステンションペナルティー=1、置換マトリックス=BLOSUM62である。これらパラメータは、Pearson, *Meth. Enzymol.* 183:63(1990)の付録2内に説明されているスコア化マトリックスファイル ("SMATRIX") を改良することで、FASTAプログラム内に導入。

10

【0072】

FASTAは、上記同様に比率を利用した核酸分子の配列同一性決定にも利用できる。ヌクレオチド配列の比較では、ktup値は1から6の間の範囲であり、好ましくは3から6、最も好ましくは3であり、その他のパラメータはデフォルトであることができる。BLOSUM62表（表3）は2,000の蛋白質配列断片を局所的に多数整列させたアラインメントに基づくアミノ酸置換マトリックスであり、500以上の関連蛋白質グループに於ける高度に保存された領域を表している（HenikoffとHenikoff, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89:10915(1992)）。従って、BLOSUM62置換頻度を利用し、本発明のアミノ酸配列内に導入できる保存的アミノ酸置換を規定することができる。化学的特性のみに基づきアミノ酸置換を設計することも可能である（以下考察の如く）が、 ”保存的アミノ酸置換” という語は望ましくはBLOSUM62の値が-1以上である置換を表す。例えば、アミノ酸置換は、その置換がBLOSUM62の値0、1、2又は3で特徴付けられる場合に保存的である。このシステムによれば、好ましい保存的アミノ酸置換は、少なくとも1（例えば1、2又は3）のBLOSUM62値により特徴付けられるが、より好ましい保存的アミノ酸置換は少なくとも2（例えば2又は3）のBLOSUM62値により特徴付けられる。

20

【0073】

変異体 α 11ポリペプチド又は本質的に相同な α 11ポリペプチドは、1又はそれ以上のアミノ酸置換、欠失、又は付加を持つことで特徴付けられる。これら変化は、好ましくは保存的アミノ酸置換（表4参照）又はポリペプチドの畳み込み、又は活性に大きく影響しないその他の置換；小さな欠失、典型的には1ないし約30アミノ酸；及び例えばアミノ末端メチオニン残基の様なアミノ-あるいはカルボキシル末端の延長、約20-25残基までの小リンカーペプチド又は親和性タグの様な軽微な性質のものである。従って本発明は、配列番号2の対応領域に少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、及びより好ましくは95%またはそれ以上相同である約489ないし約568アミノ酸残基のポリペプチドを含む。親和性タグを含むポリペプチドは更に、 α 11ポリペプチドと親和性タグとの間に蛋白質分解性切断部位を含むことができる。好ましい部位は、トロンビン切断部位及び第Xa因子切断部位を含む。

30

【0074】

表4 保存的アミノ酸置換	
塩基性：	アルギニン
	リジン
	ヒスチジン
酸性：	グルタミン酸
	アスパラギン酸
極性：	グルタミン
	アスパラギン
疎水性：	ロイシン
	イソロイシン
	バリン
芳香性：	フェニルアラニン
	トリプトファン
	トリプシン
小：	グリシン
	アラニン
	セリン
	スレオニン
	メチオニン

10

20

【0075】

本発明は更に、各種ポリペプチド融合体及び1又はそれ以上のポリペプチド融合体を含む関連多量体蛋白質も提供する。例えば、zalpha11ポリペプチドは米国特許第5,155,027号及び5,567,584号に開示の如くにして融合体ないし2量体として調製することができる。この観点での好ましい2量体蛋白質は免疫グロブリンの定常域ドメインを含む。免疫グロブリン-zalpha11ポリペプチド融合体は遺伝的に加工された細胞内にて発現し、多量体型のzalpha11類似体を産生することができる。補助ドメインをzalpha11ポリペプチドに融合させ、それらに特異的細胞、組織、又は高分子（例えばコラーゲン）に狙わせることができる。例えば、zalpha11ポリペプチド又は蛋白質は、zalpha11ポリペプチドを、標的細胞の表面上の受容体に特異的に結合するリガンドと融合することで、前もって決められた型の細胞を標的にできるだろう。zalpha11ポリペプチドは、例えば精製の為のタグ又は標的化もしくは2量体化ドメインの様な2又はそれ以上の成分と融合することができる。ポリペプチド融合体は、更に1又はそれ以上の切断部位を、特にドメイン間に具備することもできる。Tuanら、Connective Tissue Research 34: 1-9, 1996参照。

30

【0076】

本発明の蛋白質は、非天然に生じるアミノ酸残基を含む事ができる。非天然に生ずるアミノ酸には、トランス-3-メチルプロリン、2,4-メタノプロリン、シス-4-ヒドロキシプロリン、トランス-4-ヒドロキシプロリン、N-メチルグリシン、アロ-スレオニン、メチルスレオニン、ヒドロキシエチルシステイン、ヒドロキシエチルホモシステイン、ニトログルタミン、ホモグルタミン、ピペコリン酸、チアゾリジンカルボン酸、デヒドロプロリン、3-及び4-メチルプロリン、3,3-ジメチルプロリン、t-ロイシン、ノルバリン、2-アザフェニルアラニン、3-アザフェニルアラニン、4-アザフェニルアラニン及び4-フルオロフェニルアラニンが含まれるが、これに限定されるものではない。当分野では、非天然に生ずるアミノ酸残基を蛋白質内に取り込ませるための方法が複数知られている。例えば化学的にアミノアシル化した抑制性tRNAsを利用し、ナンセンス変異を抑制するインビトロシステムが利用できる。アミノ酸合成及びtRNAをアミノアシル化する方法は当分野既知である。ナンセンス変異を含むプラスミドの転写及び翻訳は大腸菌S30抽出物、及び市販の酵素及びその他試薬を含む無細胞系内で実施される。蛋白質はクロマトグラフィーにより精製される。例えば、Robertsonら、J. Am. Chem. Soc. 113:2722, 1991; Ellmanら、Methods Enzymol. 202: 301, 1991; Chungら、Science 259: 806-9, 1993; Chungら、Proc. Natl. Ac

40

50

ad. Sci. USA 90:10145-9, 1993) を参照せよ。第2の方法では、翻訳は変異mRNA及び化学的にアミノアシル化された抑制tRNAsをマイクロインジェクションを用い、Xenopus卵細胞内にて実施される (Turcattiら、J. Biol. Chem. 271:19991-8, 1996)。第3の方法では、大腸菌細胞は、置き換えられる予定の天然アミノ酸 (例えばフェニルアラニン) が無い状態、もしくは所望する非天然に作製されるアミノ酸 (例えば2-アザフェニルアラニン、3-アザフェニルアラニン、4-アザフェニルアラニン又は4-フルオロフェニルアラニン) 存在下に培養される。非天然型アミノ酸は、対応する天然型アミノ酸に代わって蛋白質内に取り込まれる。Koideら、Biochem. 33: 7470-7476, 1994参照せよ。天然に生ずるアミノ酸残基は、インビトロでの化学的修飾により非天然型に変換することができる。化学修飾は、部位特異的変異誘導と組合せることで、置換基の範囲を更に拡張できる (WynnとRichards、Protein Sci. 2: 395-403, 1993)。

10

【0077】

限定数の非保存的アミノ酸、遺伝子コードによりコードされていないアミノ酸、非天然に作製されたアミノ酸、及び非天然型アミノ酸がzalpha11アミノ酸残基と置換されるだろう。

【0078】

本発明のポリペプチド内にある必須アミノ酸は、部位特異的変異誘導又はアラニンスキャニング変異誘導法の様な当分野既知の方法により特定できる (CunninghamとWells、Science 244: 1081-5, 1989; Bassら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 4498-502, 1991)。後者の技術では、単一のアラニン変異を分子内の全ての残基について導入し、得られた変異体分子を以下に開示する様な生物活性について試験し、分子の活性に重要であるアミノ酸残基を同定する。Hiltonら、J. Biol. Chem. 271: 4699-4708, 1996も参照せよ。蛋白質-蛋白質又はその他生物学的相互作用部位も、核磁気共鳴、血漿分析、電子分散又はフォトアフィニティーラベリングの様な技術と、推定接触部位のアミノ酸の突然変異とを組合せることで決定される様な、構造体の物理分析より決定することもできる。例えばde Vosら、Science 255:306-312, 1992; Smithら、J. Mol. Biol. 224:899-904, 1992; Wlodaverら、FEBS Lett. 309: 59-64, 1992を参照せよ。必須アミノ酸の同定は、関連受容体との相同性を分析することで推論することもできる。

20

【0079】

構造の完全性を維持する上で重要な領域、又はドメイン内にあるアミノ酸残基を決定することができる。これら領域内では、変化により耐性である、又は耐性でない特異的残基、及び分子の全体的完全性を維持する特異的残基を決定することができる。配列構造体を分析する方法には、高いアミノ酸又はヌクレオチド同一性を持つ多数の配列のアランメント、及び利用可能なソフトウェア (tatoeb Insight IIRビューワー、及びモデリングツール; MSI, San Diego, CA)、二次構造特性、バイナリーパターン、相補的パッケージング、及び埋没極相互作用 (Barton, Current Opin. Struct. Biol. 5:272-376, 1995及びCorde sら、Current Opin. Struct. Biol. 6:3-10, 1996) を利用したコンピューター分析を含むが、これに限定されるものではない。一般に、分子の就職を計画する場合、及び特異的断片を特定する場合、構造の決定することで修飾分子の活性も評価されるだろう。

30

【0080】

生物学的活性に必須な高次構造の最少破壊を目的とし、zalpha11ポリペプチド内のアミノ酸配列を変化させる。例えば、Zalpha11ポリペプチドが1またはそれ以上の螺旋を含む場合、アミノ酸の変化は螺旋構造及び立体構造の変化が、例えば結合相手への分子の結合の様な重要機能を障害する様なその他分子成分を破壊しないようになされるだろう。アミノ酸配列の変化の影響は、例えば上記開示の様なコンピューターモデリングにより推測でき、又は結晶構造の分析 (例えば、Lapthornら、Nat. Struct. Biol. 2:266-268, 1995参照) により決定できるだろう。当分野高値の他技術は変位蛋白質の折りたたみを標準的分子 (例えば天然蛋白質) と比較する。例えば、変異体と標準分子内のシステインのパターンを比較することができる。還元及びアルキル化を利用したマスマススペクトロメトリー及び化学修飾は、ジスルフィド結合を伴う、あるいはこれら結合を持たないシステイン残基を決

40

50

定する方法を提供する (Beanら、Anal. Biochem. 201:216-226, 1992; Gray, Protein Sci., 2:1732-1748, 1993; 及び Pattersonら、Anal. Chem. 66:3727-3732, 1994)。修飾された分子が標準分子と同一のジスルフィド結合パターンを持たない場合、折りたたみに影響が及ぶと一般に考えられている。折りたたみの測定に関するその他の公知及び受け入れられている方法は、円偏光二色性(CD) である。変更された分子及び標準分子により作られるCDスペクトルを測定し、比較することは日常的作業である (Johnson、Proteins 7:205-214, 1990)。結晶学は、折りたたみ及び構造の分析に関する別の公知方法である。核磁気共鳴 (NMR)、消化ペプチドマッピング、及びエピトープマッピングも、蛋白質及びポリペプチド間の折りたたみ及び構造の類似性を分析する公知方法である (Schaananら、Science 257:961-964, 1992)。

10

【0081】

配列表 2 に示す zalpha11 蛋白質配列の Hopp/Woods 親水性プロフィールが作製できる (Hoppら、Proc. Natl. Acad. Sci. 78:3824-3828, 1981; Hopp, J. Immun. Meth. 88:1-18, 1986 及び Triquierら、Protein Engineering 11:153-169, 1998)。図 1 参照。プロフィールは 6 残基枠のスライディングに基づいている。埋没した G、S、及び T 残基、及び露出した H、Y、及び W 残基は無視した。例えば zalpha11 では、親水性領域は配列表 2 のアミノ酸残基 55 ないし 60、配列表 2 のアミノ酸残基 56 ないし 61、配列表 2 のアミノ酸残基 139 ないし 144、配列表 2 のアミノ酸残基 227 ないし 232、及び配列表 2 のアミノ酸残基 364 ないし 369 を含む。

20

【0082】

当業者は、zalpha11 のアミノ酸配列内に変化を企画する場合には、親水性又は疎水性を考慮し、全体構造及び生物学的プロフィールを破壊しないようにすることを認識するだろう。特に興味深い置換は、Val、Leu 及び Ile より成るグループ、又は Met、Gly、Ser、Ala、Tyr 及び Trp より成るグループから選択される疎水性残基である。例えば、置換の残基寛容性、配列表 2 に示す残基を含むことが出来るだろう。しかし、システイン残基は比較的置換に不寛容である。

【0083】

必須アミノ酸の同定も、クラス I サイトカイン受容体ファミリーメンバーと zalpha11 との間の配列類似性の分析より可能である。前記の "FASTA" 分析の様な方法を利用することで、高い類似性を持つ領域を蛋白質がファミリー内に同定され、保存域に関するアミノ酸配列の分析に利用される。構造に基づく別の変位体 zalpha11 ポリヌクレオチド同定方法は、潜在的 zalpha11 ポリヌクレオチドをコードする核酸分子が上記の配列番号 1 のヌクレオチド配列を有する核酸分子にハイブリダイズできるか決定するものである。

30

【0084】

本発明のポリペプチド中の必須アミノ酸を同定する別の方法は、部位特異的突然変異導入法あるいはアラニン・スキニング突然変異法 (Cunningham と Wells、Science 244: 1081(1989); Bassら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 4498 (1991)、Coombs と Corey、"Site-Directed Mutagenesis and Protein Engineering," in Proteins; Analysis and Design. Angeletti (編集)、ページ 259-311 (Academic Press, Inc. 1998)。後者の技術では、単一のアラニン変異を分子内の全ての残基について導入し、得られた変異体分子を以下に開示する様な生物活性について試験し、分子の活性に重要であるアミノ酸残基を同定する。Hiltonら、J. Biol. Chem. 271: 4699-708, 1996 も参照せよ。

40

【0085】

本発明は zalpha11 ポリペプチドの機能的断片及びそれら機能的断片をコードする核酸分子も含む。ここに規定する "機能的" zalpha11 又はその断片は、その増殖又は分化活性により、特定細胞機能を誘導または阻害するその能力、又は抗 zalpha11 抗体又は zalpha11 リガンド (可溶性または固定化された) に特異的に結合する能力により特徴付けられる。前記の如く、zalpha11 はクラス I サイトカイン受容体構造により特徴付けられている。即ち、本発明は以下を含む融合蛋白を更に提供する: (a)ここに記した細胞外又は細胞内ドメインを含むポリペプチド分子; 及び (b) 1 またそれ以上のこれらドメインを含む機能的断片

50

。融合蛋白質の他ポリペプチド部分は、別のクラス I サイトカイン受容体、例えば IL-2 受容体 β サブユニット及び β 共通サブユニット（即ち IL3、IL-5 及び GM-CSF 受容体 β サブユニット）により提供されるか、又は融合蛋白質の分泌を促進する非天然及び／又は無関係の分泌シグナルペプチドにより提供される。

【0086】

核酸分子の通常の欠失分析を実施することで、zalpha11 ポリペプチドをコードする核酸分子の機能的断片を得ることができる。例示として、配列番号 1 のヌクレオチド配列またはその断片を有する DNA 分子を Bal31 ヌクレアーゼで消化し、一連の両端欠失体を得ることができる。次にこれら DNA 断片は発現ベクターの適当なリーディングフレーム内に挿入され、発現されたポリペプチドは分離され、zalpha11 活性に関し、また抗 zalpha11 抗体又は zalpha11 リガンドに結合する能力について試験される。エクソヌクレアーゼ消化の代替法の一つは、オリゴヌクレオチド部位指定突然変異を利用し、所望 zalpha11 断片の産生を指定する欠失又はストップコドンを誘導する方法である。あるいは、ポリメラーゼチェーンリアクションを利用し、zalpha11 ポリヌクレオチドの特定断片を合成することができる。

【0087】

機能的ドメインを同定する標準的方法は、当分野熟練者に公知である。例えば、インターフェロンの一端又は両端の切断に関する研究は Horsberger と Di Marco, Pharmac. Ther. **6**:507(1995) にまとめられている。更に蛋白質の機能分析に関する標準的方法は、例えば Treuter ら、Molec. Gen. Genet. **240**:113(1993); Content ら、"Expression and preliminary deletion analysis of the 42 kDa 2-5 A synthetase induced by human interferon" in Biological Interferon Systems. Proceedings of ISIR-TNO Meeting on Interferon Systems, Cantell (編集)、ページ 65-72 (Nijhoff 1987); Herschman, "The EGF Receptor," in Control of Animal Cell Proliferation **1**, Boynton ら、(編集) ページ 169-199 (Academic Press 1985); Coumaille ら、J. Biol. Chem. **270**:29270(1995); Fukunaga ら、J. Biol. Chem. **270**:25291(1995); Yamaguchi ら、Biochem. Pharmacol. **50**: 1295(1995); 及び Meisel ら、Plant Molec. Biol. **30**:1(1996) により記述されている。

【0088】

Reidhaar-Olson 及び Sauer (Science **241**:53-57, 1988) 又は Bowie 及び Sauer (Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**:2152-2156, 1989) により開示されている様な、既知突然変異法を用いることで、多アミノ酸置換を行い、また試験することができる。簡単に述べると、これら著者らはポリペプチド中の 2 又はそれ以上の部位を同時に無作為化すること、機能的ポリペプチドを選別すること、そしてその後変異したポリペプチドの配列を分析し、部位毎に可能な置換基のスペクトルを決定する方法を開示している。利用可能なその他の方法には、ファージディスプレイ（例えば、Lowman ら、Biochem. **30**: 10832-10837, 1991; Ladner ら、米国特許第 5,223,409 号；Huse、WIPO 公開 W092/062045 号）及び部位特異的変異誘導（Derbyshire ら、Gene **46**:145, 1986; Ner ら、DNA **7**:127, 1988）が含まれる。

【0089】

開示された zalpha11 DNA の変異体及びポリペプチド配列は Stemmer、Nature **370**, 389-91, 1994、Stemmer、Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**:10747-51, 1994 及び WIPO 公開 W097/20078 号に開示されているような DNA シャッフリング法により作製することができる。簡単に述べると、変異型 DNA は、親 DNA を無作為に断片化した後に PCR を使い組立て直し、その結果無作為に導入された点突然変異体を得るインビトロでの相同的組み換えにより作製される。この技術は、対立遺伝子変異体又は異なる種に由来する DNA の様な親 DNA のファミリーを利用することで、工程に更に多様性を加える様に変更できる。更に変異導入とアッセイを繰り返し所望活性に関し選別し、又はスクリーニングすることで、有害な変化について同時に選別しながら所望変異を選別するため、迅速な "展開" が提供される。

【0090】

ここに開示される変異導入法は、大量処理可能な、自動化されたスクリーニング法と組み合わせることができ、宿主細胞内にクローン化され、変異導入されたポリペプチドの活性を検出することができる。活性なポリペプチド（例えばシグナル伝達、又は結合活性）を

コードする変異導入DNA分子は宿主細胞より回収でき、現代的装置を利用し迅速に配列決定することができる。これら方法は、問題のペプチド内の個々のアミノ酸残基の重要を迅速に決定でき、構造不明なポリペプチドにも応用できる。

【0091】

更に、本発明の蛋白質（又はそのポリペプチド断片）は別の生物活性分子、特に他のサイトカインと結合でき、多機能性分子を提供する。例えばzalpha11由来の1又はそれ以上の螺旋を他のサイトカインと結合し、それらの生物学的特性または産生効率を高めることができる。

【0092】

従って本発明は、zalpha11の1またはそれ以上の螺旋を含む断片が別のポリペプチドと融合している一連の新規のハイブリッド分子を提供する。融合はDNAレベルのスプライシングにより好ましく行われ、組換え体産生システムにキメラ分子の発現を可能にする。続いて得られた分子は改良された可溶性、改良された安定性、延長された排除寿命、改良された発現及び分泌レベル、及び薬物動態といった特性に関しアッセイされる。この様なハイブリッド分子は、成分蛋白質又はポリペプチド間に別のアミノ酸残基（例えばポリペプチドリンカー）を更に含むだろう。

【0093】

ここに考察された方法を利用することで、当業者は配列番号2の、又は例えば野生型zalpha11蛋白質の結合、細胞-細胞連絡、又はシグナル伝達活性を保持している各種ポリペプチド断片又はその変異種を同定し、及び／又は調製することができる。例えば、サイトカイン結合ドメイン（配列番号2の残基20(Cys)ないし237(His)又はその対立遺伝子変異体あるいは種オルトログ）に実質的に相同であり、また野生型のzalpha11蛋白質のリガンド結合活性を保持する各種ポリペプチドを調製することでzalpha11”可溶性レセプター”を作ることができる。この様なポリペプチドは例えばトランスメンブレン及び細胞内ドメインの一部又は全てに由来する追加のアミノ酸を含むだろう。この様なポリペプチドは一般的にここに開示される様に、アフィニティータグの様な追加のポリペプチド断片も含むだろう。

【0094】

変異体及び融合蛋白質を含むzalpha11ポリペプチドに関し、当業者は上記表1及び2記載の情報を利用し、この変異体をコードする完全な縮重ポリヌクレオチド配列を容易に作成することができる。

【0095】

全長ポリペプチド、生物学的に活性な断片、及び融合ポリペプチドを含む本発明のzalpha11ポリペプチドは、通常技術を用い遺伝的に作られた宿主細胞内にて産生させることができる。好適宿主細胞は、外因性DNAで形質転換又はトランスフェクションでき、培地中にて増殖できる細胞であり、そして細菌、真菌細胞ならびに培養高等真核細胞を含む。真核細胞、特に多細胞生物の培養細胞が好ましい。クローン化DNA分子を取り扱い、外因性DNAを各種宿主細胞に導入するための技術は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989,及びAusubelら、編集、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987に開示されている。

【0096】

一般に、zalpha11ポリペプチドをコードしているDNA配列は、一般には転写プロモーター及びターミネーターを含む、発現ベクター内でのその発現に必要なその他の遺伝的要素に作用可能式に連結されている。ベクターはまた通常1またはそれ以上の選択可能なマーカー、及び1又はそれ以上の複製起点を有しているが、当業者はあるシステム内では選択可能マーカーが別のベクター上に供給され、そして外因性DNAの複製が宿主ゲノム内への組み込みによって提供されることを認識するだろう。プロモーター、ターミネーター、選択可能マーカー、ベクター及びその他要素の選択は、当分野通常技術の範囲にある通常設計の問題である。多くのこれら要素は文献中に記載されており、また販売会社を通じ入手で

10

20

30

40

50

きる。

【0097】

zalpha11ポリペプチドを宿主細胞の分泌経路に乗せる為には、分泌シグナル配列（リーダー配列、プレプロ配列、又はプレ配列としても知られる）が発現ベクター内に供給される。分泌シグナル配列はzalpha11の分泌シグナル配列、又はその他の分泌蛋白質（例えばt-PA）に由来する、又は新たに合成された分泌シグナル配列である。分泌シグナル配列は、zalpha11DNA配列と作用可能式に連結し、即ち2配列は正しい読みとり枠内に結合し、新たに合成されたポリペプチドを宿主細胞内の分泌経路内に向かわせる位置に配置される。分泌シグナル配列は通常所望するポリペプチドをコードするDNA配列の5'側に位置するが、特定のシグナル配列は所望するDNA配列内の何れかの場所に位置することもある（Welch 10
ら、米国特許第5,037,743号；Hollandら、米国特許第5,143,830号を参照せよ）。

【0098】

あるいは、本発明のポリペプチド内に含まれる分泌シグナル配列は他のポリペプチドを分泌経路に向かわせるのに利用される。本発明はこの様な融合ポリペプチドを提供する。シグナル融合ポリペプチドは、当分野既知であり又ここに開示される方法を使い、配列番号2のアミノ酸残基1（Met）ないし残基19（Gly）に由来する分泌シグナル配列が作用可能式に他ポリペプチドをコードするDNA配列に連結されることで作製できる。本発明の融合ポリペプチド内に含まれる分泌シグナル配列は、追加のペプチドにアミノ末端を介して好ましく融合し、追加ペプチドを分泌経路内に導く。この様な構築体は当分野既知の多くの応用を持っている。例えばこれら新規分泌シグナル配列融合構築体は、通常は非分泌型である蛋白質の活性成分を分泌に導くことができる。この様な融合体は、インビボ又はインビトロでのペプチドの分泌経路への方向付けに用いられる。 20

【0099】

培養した哺乳動物細胞は本発明での利用に好適な宿主である。外因性DNAを哺乳動物細胞内に導入する方法には、リン酸カルシウム伝達トランスフェクション法（Wiglerら、Cell 14:725, 1978; CorsaroとPearson, Somatic Cell Genetics 7:603, 1981; GrahamとVander Eb, Virology 52:456, 1973）、エレクトロポレーション法（Neumannら、EMBO J. 1:841-845, 1982）、DEAE-デキストラン伝達トランスフェクション法（Ausubelら、上記）、及びリポソーム伝達トランスフェクション法（Hawley-Nelsonら、Focus 15:73, 1993; Ciccaroneら、Focus 15:80, 1993、及びウイルスベクター（MillerとRosman, BioTechniques 7:980-90, 1989; WangとFiner, Nature Med. 2: 714-716, 1996）が含まれる。培養哺乳動物細胞内での組換え体ポリペプチドの産生は、例えばLevinsonら、米国特許第4,713,339号；Hagenら、米国特許第4,784,950号；Palmiterら、米国特許第4,579,821号；及びRingold、米国特許第4,656,134号に開示されている。好適哺乳動物培養細胞にはCOS-1（ATCC No.CRL 1650）、COS-7（ATCC No. CRL 1651）、BHK（ATCC No. CRL 1632）、BHK 570（ATCC No.CRL 10314）、293（ATCC No. CRL 1573; Grahamら、J. Gen. Virol. 36:59-72,1977）及びチャイニーズハムスター卵巣（CHO-K1；ATCC No. CCL 61）細胞株が含まれる。追加の好適細胞株は当分野既知であり、米国標準培養体コレクション、マナサス、バージニア州、（American Type Culture Collection, Manassas, VA）等の公的供託機関より入手することができる。一般に、SV-40またはサイトメガロウイルス由来のプロモーターの様な強い転写プロモーターが好まれる。米国特許4,956,268号参照。その他好適プロモーターには、メタロチオネン遺伝子（米国特許第4,579,821号及び、4,601,978号）及びアデノウイルス主後期プロモーターが含まれる。 30
40

【0100】

外来DNAが挿入された培養哺乳細胞に関しては、一般には薬物選択を用いて選別が行われる。この様な細胞は一般には”トランスフェクタント”と呼ばれる。選択薬剤存在下に培養され、所望遺伝子をその子孫に伝達することができる細胞は、”安定トランスフェクタント”と呼ばれる。好適選択マーカーは抗生物質であるネオマイシンに対する耐性をコードしている遺伝子である。選択は、G-418等のネオマイシン型薬物の存在下に行われる。選択システムは所望遺伝子の発現レベルの増加にも利用でき、この工程は”増幅”と呼ば 50

れている。増幅はトランスフェクタントを低レベルの選択薬剤存在下に培養し、続いて選択薬剤の量を増加し、導入遺伝子の産物を高レベルに産生する細胞を選択することで、実施される。好ましい増幅可能な選択マーカーはジヒドロ葉酸還元酵素であり、メトトレキセートに対する耐性を付与する。その他薬剤耐性遺伝子（例えばヒグロマイシン耐性、多剤耐性、ピューロマイシンアセチルトランスフェラーゼ）も利用できる。別の表現形を導入する、例えば緑色蛍光蛋白質、又はCD4、CD8、クラス I MHCの様な細胞表面蛋白質、胎盤性アルカリフォスファターゼの様な別のマーカーは、FACSソーティング、又は磁性ビーズ分離法の様な手段により、非トランスフェクト細胞よりトランスフェクト細胞を選別するのに利用されるだろう。

【0101】

昆虫細胞、植物細胞及び鳥類細胞を含む他の高等真核細胞も宿主として利用できる。植物細胞での遺伝子発現に関するベクターとしての *Agrobacterium rhizogenes* の利用は Sinkar ら、J. Biosci. (Bangalore) 11:47-58, 1987 にレビューされている。昆虫細胞の形質転換、及びその中での外来性ポリペプチドの酸性は Guarino ら；米国特許第 5,162,222 号及び WIPO 公開 W094/06463 号により開示されている。昆虫細胞も、一般に *Autographa californica* 多核性ポリヘドロシスウイルス (AcMNPV) に由来する組換え体バキュロウイルスベクターを使って感染させることができる。King, L.A. 及び Possee, R.D., The Baculovirus Expression System; A Laboratory Guide, London, Chapman & Hall; O'Reilly, D.R. ら、Baculovirus Expression Vectors; A Laboratory Manual, New York, Oxford University Press., 1994; 及び、Richardson, C. D., 編集., Baculovirus Expression Protocols. Methods in Molecular Biology, Totowa, NJ, Humana Press, 1995 を参照せよ。組換え体 *zalphall* バキュロウイルスを作製する第 2 の方法は、Luckow (Luckow, V.A. ら、J Virol 67: 45-66-79, 1993) 記載のトランスポゾンベースとした系を利用する。トランスファーベクターを利用するこの系は Bac-to-Bac T M キットとして市販されている (Life Technologies, Rockville, MD)。このシステムは Tn7 トランスポゾンを含むトランスファーベクター *pFastBac1 T M* (Life Technologies) を利用し、*zalphall* ポリペプチドをコードする DNA を大腸菌中に維持している "bacmid" と呼ばれる大形プラスミドであるバキュロウイルスゲノム中に移す。Hill-Perkins, M.S. 及び Possee, R.D. Gen Virol 71:971-6, 1990; Bonning, B.C. ら、J Gen Virol 75:1551-6, 1994 及び、Chazenbalk, G.D., と Rapoport, B., J Biol Chem 270:1543-9, 1995 参照。更にトランススファーベクターは、発現した *zalphall* ポリペプチドの C-又は N-末端にエピトープタグ、例えば Glu-Glu エピトープタグ (Grussmeyer, T. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 7952-4, 1985) をコードする DNA のインフレーム融合体を含むことができる。*zalphall* を含むトランスファーベクターは当分野既知の技術を用いて大腸菌内に導入され、組換え体バキュロウイルスの指標である切断された *lacZ* 遺伝子を含む *bacmids* についてスクリーニングされる。組換え体バキュロウイルスゲノムを含む *bacmid* DNA は、一般的方法により分離され、これを用い *Spodoptera frugiperda* 細胞、例えば Sf9 細胞をトランスフェクトする。これにより *zalphall* を発現する組換え体ウイルスが作られる。組換え体ウイルスのストックは、当分野一般的に用いられる方法により作成される。

【0102】

組換え体ウイルスは、宿主細胞、典型的にはアワヨトウ、*Spodoptera frugiperda* の幼虫より得た細胞株の感染に用いられる。一般には Glick 及び Pasternak, Molecular Microbiology: Principles and Applications of Recombinant DNA, ASM Press, Washington, D. C., 1994 を見よ。別の好適細胞株は *Trichoplusia ni* (米国特許第 5,300,435 号) 由来の High Five 0 T M 細胞株 (Invitrogen) である。市販の無血清培地を使い、細胞を増殖及び維持する。好適な培地は、Sf9 細胞については Sf900 II T M (Life Technologies) 又は EST921 T M (Expression Systems) である；*T.ni* 細胞に関しては Ex-cell 10405 T M (JBH Biosciences, Lenexa, KS) 又は Express Five 0 T M (Life Technologies) である。上清からの *zalphall* ポリペプチド精製は、ここに記述した方法を用い行うことができる。

【0103】

酵母細胞を含む真菌細胞も本発明に利用できる。この観点において特に興味ある酵母種には、*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*及び*Pichia methanolica*が含まれる。*S. cerevisiae*細胞を外因性DNAにて形質変換し、それより組換え体ポリペプチドを産生する方法は、例えばKawasaki、米国特許第4,599,311号、Kawasakiら、米国特許第4,931,373号；Brake、米国特許第4,870,008号；Welchら、米国特許第5,037,743号；及びMurrayら、米国特許第4,845,075号により開示されている。形質転換細胞は選択可能マーカー、一般的には薬剤耐性、あるいは特定栄養素（例えばロイシン）欠損状態での増殖能によって決定される表現形により選別される。*Saccharomyces cerevisiae*での利用に適した好適ベクターシステムはKawasakiらにより開示されている（米国特許第4,931,373号）、グルコース含有培地中の増殖により形質変換細胞が選択できるPCT1ベクターシステムである。酵母での利用に適した好適プロモーター及びターミネーターには、糖分解酵素遺伝子由来（例えばKawasaki、米国特許第4,599,311号；Kingsmanら、米国特許第4,615,974号；及びBitter、米国特許第4,977,092号を見よ）及びアルコール脱水素酵素遺伝子由来のものが含まれる。米国特許第4,990,446号、5,063,154号、第5,139,936号及び第4,661,454号も参照せよ。当分野では*Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Ustilago maydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia guilliermondii*及び*Candida maltosa*を含むその他酵母に適した形質変換システムが知られている。例えば、Gleesonら、*J. Gen. Microbiol.*, 132: 3459-3465, 1986及びCregg、米国特許第4,882,279号を参照せよ。アスペルギルス細胞はMcKnightら、米国特許第4,935,349号の方法に従い利用されるだろう。*Acremonium chrysogenum*を形質変換する方法は、Suminoら、米国特許第5,162,228号により開示されている。ニューロスポラを形質転換する方法はLambowitz、米国特許第4,486,533号により開示されている。

【0104】

*Pichia methanolica*の組換え体蛋白質産生に関する宿主としての利用はWIPO公開W097/17450号、W097/17451号、W098/02536号及びW098/02565号に開示されている。*P. methanolica*の形質転換へ利用に適したDNA分子は、一般には2本鎖の環状プラスミドとして調製され、これは形質転換前に直鎖化することが好ましい。*P. methanolica*でのポリペプチド産生に関しては、プラスミド中のプロモーター及びターミネーターは、*P. methanolica*遺伝子、例えば*P. methanolica*アルコール利用遺伝子（AUG1又はAUG2）のプロモーター及びターミネーターが好ましい。その他の有用なプロモーターには、ジヒドロキシアセトン合成酵素（DHAS）、蟻酸脱水素酵素（FMD）、及びカタラーゼ（CAT）遺伝子のプロモーターが含まれる。宿主染色体へのDNAの組み込みを促進するには、プラスミドの全発現断片が両端で宿主DNA配列により連結されることが好ましい。*Pichia methanolica*の利用に関する好適な選択可能マーカーは、*ade2*宿主細胞をアデニン無しの状態で増殖させるフォスホリボシル-5-アミノイミダゾールカルボキシラーゼ（AIRC; EC4.1.1.21）をコードする*P. methanolica*のADE2遺伝子である。メタノールの利用を最小化することが望まれる大規模な工業工程に関しては、メタノール利用遺伝子（AUG1及びAUG2）が欠失した宿主細胞の利用が好ましい。分泌蛋白質の産生に関しては空胞性プロテアーゼ遺伝子（PEP4及びPRB1）を欠く宿主細胞が好ましい。目的のポリペプチドをコードするDNAを含むプラスミドの*P. methanolica*細胞内への導入を促進するために、エレクトロポレーションが利用される。*P. methanolica*は対数的に減衰する、2.5ないし4.5kV/cm、好ましくは約3.75kV/mの強度と1ないし40ミリ秒、最も好ましくは約20ミリ秒である一定時間のパルス状電場を用いたエレクトロポレーションにより形質転換されることが好ましい。

【0105】

Escherichia coli, *Bacillus*及びその他の属の細菌株を含む前核生物宿主細胞も、本発明での有用な宿主細胞である。これら宿主を形質転換し、その中にクローン化された外来性DNA配列を発現させる技術は当分野公知である（Sambrookら、上記参照）。*E. coli*の様な細菌に於いて α 11ポリペプチドを発現させる場合、ポリペプチドは典型的には不溶性の顆粒球として細胞質内に保持されるか、細菌由来の分泌配列によって細胞周辺腔内に送られる。前者の場合、細胞は溶解され、顆粒を回収し、例えばグアニジンイソチオシアネ

ート又は尿素により変性させられる。次に尿素及び還元型ならびに酸化型グルタチオンの溶液に透析し、続いて緩衝生理食塩水に対し透析する様にし、変性剤を希釈して変性したポリペプチドを再度折り畳ませ、ダイマー化する。後者の場合、細胞を破壊し（例えば超音波処理、又は浸透圧ショックにより）細胞周辺腔含有物を放出させ、蛋白質を回収することでポリペプチドを可溶性及び機能的な形で回収することができるため、変性や再折りたたみの必要がない。

【0106】

形質転換又はトランスフェクトされた宿主細胞は、通常の方法に従い栄養素及び選択した細胞の増殖に必要なとされるその他成分を含む培地中にて培養される。限定培地や複合培地を含む各種好適培地が当分野既知であり、一般には炭素源、窒素源、必須アミノ酸、ビタミン及びミネラルが含まれる。培地は更に成長因子又は血清の様な成分を随意含むだろう。一般に増殖培地は、例えば薬剤選択により、あるいは発現ベクター上に乗せられ、又は宿主細胞にコトランスフェクトされた選択マーカーによって補償されている必須栄養素の欠失により、外来性に加えられたDNAを含む細胞を選別する。P.methanolica細胞は適当な炭素源、窒素源、微量栄養素源を含む培地中、約25℃ないし50℃の温度にて培養される。液体培地には、小型フラスコの振盪、又はファーマンターの噴霧散布の様な通常の方法によって十分な通気が行われる。P.methanolicaに取って好ましい培地はYEPD（2%D-グルコース、2%Bacto T M ペプトン（Difco Laboratories, Detroit, MI）, 1% Bacto T M 酵母抽出物（Difco Laboratories）、0.004%アデニン及び0.006%L-ロイシンである）。

【0107】

本発明の観点の一つでは、zalpha11サイトカイン受容体（膜貫通及び細胞内ドメインを含む）は培養細胞により産生され、また細胞は天然リガンド及び天然リガンドのアゴニスト及びアンタゴニストを含む、受容体に対するリガンドのスクリーニングに利用される。この方法を概略すると、cDNA又はレセプターをコードする遺伝子はその発現に必要なとされる他の遺伝的エレメント（例えば転写プロモーター）に結合され、そして得られた発現ベクターは宿主細胞内に挿入される。DNAを発現し、機能的受容体を産生する細胞を選択し、各種スクリーニングシステム内にて使用する。

【0108】

本発明の新規受容体の発現、及び受容体介在シグナル伝達への利用に好適な哺乳動物細胞には、gp130の様なベータサブユニットを発現する細胞、ならびにgp130及びLIF受容体を共発現する細胞が含まれる（Gearingら、EMBO J. 10:2839-2848, 1991; Gearingら、米国特許第5,284,755号）。この観点では、一般にはそれら細胞が必要とするシグナル伝達経路を含んでいることから、IL-6又はLIFの様な同一ファミリーの受容体に結合する他のサイトカインに反応する細胞を使用することが好ましい。このタイプの好適細胞には、ヒトTF-1細胞株（ATCC番号CRL-2003）及びDA-1細胞株（Branchら、Blood 69:1782,1987; Broudyら、Blood 75:1622-1626,1990）が含まれる。あるいは、好適宿主細胞はβサブユニット又は所望細胞反応に必要なその他細胞構成成分を産生するように加工することができる。例えばマウス細胞株BaF3（PalaciosとSteinmetz、Cell 41:727-734, 1985; Mathey-Prevo tら、Mol. Cell. Biol. 6:4133-4135, 1986）、ベビーハムスター腎臓（BHK）細胞株、又はC TLL-2細胞株（ATCC TIB-214）をトランスフェクトし、zalpha11に加えてマウスgp130サブユニット、あるいはマウスgp130及びLIF受容体を発現させることができる。宿主細胞と受容体は同一種起源のもとを利用することが一般には好ましいが、この方法ではいずれの種に由来する複数の受容体サブユニットを発現する様に細胞株を加工することができ、それにより種特異性に拠る潜在的限界を克服することができる。あるいは、BaF3細胞株でのマウスcDNAの様に、ヒト受容体cDNAの種相同体をクローン化し、同一種由来の細胞株内にて利用することができる。即ちIL-3の様な造血性増殖因子に依存した細胞株を、zalpha11リガンド依存性に加工することができる。

【0109】

機能的zalpha11を発現している細胞はスクリーニングアッセイに利用される。各種好適アッセイが当分野に知られている。これらアッセイは標的細胞中の生物学的反応の検出に基

10

20

30

40

50

づく。この様なアッセイの一つは細胞増殖アッセイである。細胞を試験化合物存在下、又は非存在下に培養し、細胞の増殖を例えばトリチウム標識チミジンの取り込みを測定することにより、又はAlymar Blue™ (AccuMed, Chicago, IL) 又は3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイド (MTT) (Mosman, J. Immunol. Meth. 65: 55-63, 1983) の代謝性bんかいに基づく発色アッセイにより検出される。代替アッセイフォーマットは、レポーター遺伝子を発現するように更に加工された細胞を利用する。レポーター遺伝子は受容体連結経路に反応するプロモーターエレメントに連結されており、またアッセイはレポーター遺伝子の転写の活性化を検出する。この観点に於いて好ましいプロモーターエレメントは、血清反応エレメント又はSRE (例えば、Shawら、Cell 56;5630572, 1989参照) である。この様な好適レポーター遺伝子はルシフェラーゼ遺伝子 (de Wetら、Mol. Cell. Biol. 7.725, 1987) である。ルシフェラーゼ遺伝子の発現は当分野既知の方法を利用し、ルシフェラーゼにより検出される (例えば、Baumgartnerら、J. Biol. Chem. 269:19094-29101, 1994; SchenbornとGiffin, Promega Notes 41:11, 1993)。ルシフェラーゼアッセイキットは、例えばPromega Corp., Madison, WIの如く市販されている。このタイプの標的細胞株は化学物質、細胞コンディショニング培養媒体、真菌ブロス、土壌サンプル、水サンプル等のライブラリーのスクリーニングに利用できる。例えば、細胞又は組織コンディショニング媒体サンプルのバンクを標的細胞上にアッセイし、リガンドを産生する細胞を同定することができる。次に陽性細胞を用いて哺乳動物細胞発現ベクター内にcDNAライブラリーを作製し、これをプールに分割し、宿主細胞をトランスフェクションして、発現させる。次にトランスフェクトされた細胞由来の媒体サンプルをアッセイし、プールを更に分割し、再度トランスフェクションし、培養し、陽性細胞を再度アッセイしてリガンドを発現するクローン化細胞株を分離する。腎臓、肝臓、脾臓、胸腺、その他リンパ系組織又はT細胞によりコンディショニングされた媒体サンプルが、スクリーニング法での利用に適したリガンド源である。

【0110】

zalpha11に関する天然リガンドは、zalpha11を発現するサイトカイン依存性細胞株を突然変異誘導し、その細胞をオートクリン増殖に関し選択する条件下に培養することで同定することができる。WIPO公開W095/21930号参照。典型的な方法では、zalpha11を発現している細胞をEMSの様なもので突然変異誘導する。次に細胞を必要とするサイトカイン存在下に快復させ、続いてこのサイトカインを欠く培地中に移す。例えば可溶性 (リガンド結合) 受容体ポリペプチドを培地に加えることにより、又は野生型細胞及びzalpha11を発現しているトランスフェクト細胞のコンディショニング培地についてアッセイすることで、生存細胞をzalpha11に対するリガンドの産生についてスクリーニングする。この方法での利用に適した細胞株には、gp130又はLIF受容体と組み合わせgp130を発現する様にトランスフェクトされた細胞を含む。この様な好適宿主細胞株には、トランスフェクトされたCTL-2細胞 (GillisとSmith, Nature 268:154-156, 1977) 及びトランスフェクトされたBaF3細胞が含まれる。

【0111】

更に、zalpha11可溶性受容体ポリペプチドを利用した分泌トラップ法を使い、zalpha11リガンドを分離することができる (Aldrichら、Cell 87:1161-1169, 1996)。既知又は推定リガンド源より調製されたcDNA発現ライブラリーをCOS-7細胞にトランスフェクトする。cDNAライブラリーベクターは一般にはCOS-7細胞での増幅に適したSV40起源、及び高発現に適したCMVプロモーターを有している。トランスフェクトされたCOS-7細胞は単層に増殖され、次に固定され、透過処理される。次にここに記すタグ付き、又はビオチンラベルしたzalpha11可溶性受容体を細胞層に接触させ、抗相補性分子、即ちzalpha11リガンドを発現する単層中の細胞に結合させる。その結果リガンドを発現している細胞は受容体分子と結合するだろう。西洋ワサビパーオキシダーゼ (HRP) で標識された抗タグ抗体 (Ig融合体に関する抗Ig、M2又はFLAGタグ付き融合体に対する抗FLAG、ストレプトアビジン等) を使い、タグの付いた、又はビオチンでラベルされたzalpha11可溶性受容体が結合した細胞を視覚化する。HRPはチラミド試薬、例えばチラミドFITCの蓄積を触媒する。市販のキットを

この検出に利用できる（例えばRenaissance TSA-Direct T Mキット、NEN Life Science Products, Boston, MA）。zalpha11受容体リガンドを発現する細胞は、蛍光顕微鏡下に緑色の細胞として同定され、その後Aldrichら、上記によるプラスミドレスキュー法を用いてリガンドスクリーニングを行い、更に単クローンが同定されるまで分泌トラップアッセイを繰り返すために採取される。

【0112】

受容体として、zalpha11ポリペプチドの活性は、細胞外の酸度、又は受容体結合に関連したプロトン分泌及びその後の生理学的細胞反応を測定するシリコンをベースとするバイオセンサーマイクロフィジオメーターにより測定できる。装置の例としてはMolecular Devices, Sunnyvale, CA製造のCytosensor T Mマイクロフィジオメーター がある。細胞増殖、イオン輸送、エネルギー産生、炎症反応、制御又は受容体活性化等の各種細胞反応は、この方法で測定できる。例えばMcConnell, H.M.ら、Science 257: 1906-1912, 1992; Pitchford, Sら、Meth. Enzymol. 228:84-108, 1997; Arimilli, S.ら、J.Immunol. Meth. 212:40-59, 1998; Van Liefde, I.ら、Eur. J. Pharmacol. 346:87-95, 1998を見よ。マイクロフィジオメーターは真核生物、前核生物、接着性又は非接着性細胞のアッセイに利用できる。細胞培地中の細胞外酸度変化を経時的に測定することで、マイクロフィジオメーターはzalpha11ポリペプチドのアゴニスト、リガンド、又はアゴニストを含む各種刺激に対する細胞反応を直接測定する。好ましくは、マイクロフィジオメーターを用いzalpha11発現真核細胞の反応を測定し、zalpha11ポリペプチドを発現していないコントロールの真核細胞と比較する。zalpha11発現真核細胞は、ここに記した如くにその中にzalpha11がトランスフェクトされた細胞を含み、zalpha11変調刺激に対し反応する細胞を作り、又はリンパ系組織、脾臓、胸腺組織又はPBLsに由来するzalpha11発現細胞の様なzalpha11を天然に発現する細胞である。細胞外酸度の増加又は減少により測定されるコントロールに対するzalpha11発現細胞の反応差は、zalpha11変調細胞反応を直接示す測定値である。更に、この様なzalpha11変調反応は各種刺激下にアッセイできる。また、マイクロフィジオメーターを利用し、zalpha11ポリペプチドを発現している細胞を提供すること、試験化合物が存在しない状態で細胞の第1部分を培養すること、試験化合物が存在する状態で細胞の第2部分を培養すること、そして細胞の第1部分に比べた細胞の第2部分の細胞反応の増加又は減少を検出することを含む、zalpha11ポリペプチドのアゴニスト及びアンタゴニストを同定する方法が提供される。この方法を利用することで、zalpha11ポリペプチドの天然リガンドを含むアンタゴニスト及びアゴニストを迅速に同定することができる。

【0113】

本発明により提供されるその他アッセイには、ハイブリッド受容体ポリペプチドの利用が含まれる。これらハイブリッドポリペプチドは大きく2クラスに分けられる。第1のクラスでは、配列番号2のおおよその残基256 (Lys) ないし528 (Ser) を含むzalpha11の細胞内ドメインは第2受容体のリガンド結合ドメインに結合される。第2受容体はmpl受容体 (Souyriら、Cell 63:1137-1147, 1990) の様な造血性サイトカイン受容体であることが好ましい。ハイブリッド受容体は更に何れかの受容体に由来するトランスメンブレンドメインも含むだろう。次にハイブリッド受容体をコードするDNA構築体は宿主細胞内に挿入される。ハイブリッド受容体が発現する細胞を結合ドメインに関するリガンド存在下に培養し、反応についてアッセイする。このシステムは、利用可能なリガンドを容易に利用し、zalpha11により伝達されるシグナル伝達を分析する手段を提供する。本システムは特定の細胞株がzalpha11により伝達されるシグナルに反応できるか決定するのに利用することもできる。ハイブリッド受容体ポリペプチドの第2のクラスは、第2受容体、好ましくはサイトカイン受容体の細胞質ドメイン、及びトランスメンブレンドメインと共にzalpha11 (配列番号2のおおよその残基20 (Cys) ないし237 (His)) の細胞外 (リガンド結合) ドメインを含む。このトランスメンブレンドメインは何れかの受容体に由来するだろう。この第2のクラスのハイブリッド受容体は、第2受容体により誘導されるシグナルに反応できることが既知の細胞内に発現される。合わせて、これら2つのクラスのハイブリッド受容体は、受容体をベースとするアッセイシステム内で広範囲タイプの細胞の利用を可能に

する。

【0114】

次にzalpha11に関するリガンドを発現することが知られている細胞を利用し、上記開示の如くにリガンドをコードするcDNA分離のためのcDNAライブラリーを調製される。即ち、本発明は新規受容体ポリペプチドに加え、受容体に関するポリペプチドリガンドをクローニングする方法も提供する。

【0115】

zalpha11発現の組織特異性は、初期胸腺細胞の発生及び免疫反応制御に於ける役割を示唆している。これらプロセスは、同起源受容体に対する1又はそれ以上のサイトカインの結合への反応としての細胞増殖及び分化の促進を含む。本受容体に観察されている組織分布を見ると、アゴニスト（天然リガンドを含む）及びアンタゴニストは多くのインビトロ及びインビボ応用の可能性を有する。受容体アゴニストとして同定された化合物はインビトロ及びインビボでの標的細胞の増殖及び発生の刺激に有用である。例えば、アゴニスト化合物は限定細胞培地の成分として有用であり、単独または他のサイトカインやホルモンと組合せ利用し、細胞培養に一般的に利用されている血清の代替になるだろう。従ってアゴニストは培養T細胞、B細胞及びその他のリンパ系及び骨髄系細胞、ならびに造血細胞の増殖及び／又は発生の促進に特に有用である。

【0116】

zaopha11に関するアゴニストリガンドは、特定のウイルス感染を含む免疫抑制に関係する感染症の治療の様な細胞性免疫の促進及びリンパ細胞増殖の促進に有用であろう。アゴニストリガンドを利用し、T細胞、NK（ナチュラルキラー）細胞又はLAK（リンパ細胞活性化キラー）細胞の様なエフェクター細胞の活性化を通じ伝達される、あるいはアポトーシス経路を介し直接伝達される細胞傷害性を誘導できるだろう。アゴニストリガンドは症状を示す型の細胞のレベルを増加することによる白血球減少症の治療、及び骨髄移植後のT細胞レパトリーの再生の促進にも有用である。

【0117】

アンタゴニストリガンド又は化合物は、リウマチ関節炎、多発性硬化症、糖尿病、炎症性大腸疾患、クローン病等を含む自己免疫疾患の治療の様な、免疫系の抑制に有用性を見いだせる。免疫抑制を利用することで、組織または器官移植片及び移植体の拒絶を減らし、そして症状を表しているタイプの細胞の増殖を阻害することでT細胞特異的白血病またはリンパ腫を治療することができる。

【0118】

zalpha11はリガンド血中レベルの検出に関する診断システムに利用できるだろう。関連実施態様では、抗体又はzalpha11と特異的に結合する他の作用物質を利用し、血液中の受容体ポリペプチドを検出することができる。リガンド又は受容体ポリペプチドのレベルの増加、又は低下は癌を含む病的状態の表示であろう。可溶性受容体ポリペプチドはおそらく病的プロセスに関係しており、基礎疾患の間接的マーカーに成るだろう。例えばヒト血清中の可溶性IL-2受容体のレベル増加には心筋梗塞、喘息、重症筋無力症、リウマチ性関節炎、急性T細胞白血病、B細胞リンパ腫、慢性リンパ細胞性白血病、大腸癌、乳癌及び卵巣癌の様な各種炎症性、及び新生物性の状態が関係している（Heaneyら、Blood 87:847-857, 1996）。

【0119】

zalpha11受容体のリガンド結合性ポリペプチド、又は“可溶性受容体”は、zalpha11サイトカイン結合ドメイン（ヒト受容体（配列番号2）のおおよその残基20（Cys）から残基237（HIs））又は非ヒト型受容体の対応領域をコードする切断DNAを発現させることで表性できる。細胞外ドメインは実質的にトランスメンブレン及び細胞内ポリペプチド部分を含まない形に調製されることが好ましい。更に上記のzalpha11サイトカイン結合ドメイン内のリガンド結合ポリペプチド断片は、ここに記載の利用に関するzalpha11可溶性受容体としても機能できる。宿主細胞から受容体ポリペプチドを外に向かわせるためには、受容体DNAに例えばt-PA分泌ペプチド又はzalpha11分泌ペプチドの様な分泌ペプチドをコードす

る第2のDNAを連結する。分泌された受容体ポリペプチドの精製を促すために、ポリヒスチジンタグ、サブスタンスP、フラッグTMペプチド（Hoppら、Bio/Technology 6:1204-1210, 1998; Eastman Kodak Co., New Haven, CTより入手可能）又は抗体又はそのた特異的結合作用物質が利用できる他のポリペプチド又は蛋白質を受容体ポリペプチドに融合することができる。

【0120】

別の方法では、免疫グロブリン重鎖定常域、典型的には受容体細胞外ドメインは2つある定常域ドメインは含むが可変域を欠くFc断片を持つ融合体として発現することができる。これら融合体は典型的にはFc部分が相互にジスルフィド結合し、そして2つの受容体ポリペプチドが相互に近接し並列している多量体分子として分泌される。このタイプの融合体はインビトロアッセイの道具として、溶液中からの同種リガンドのアフィニティー精製、特異的なリガンド滴定によるインビトロのシグナル遮断に、及び非腸管的に投与して血中リガンドに結合させ血液よりそれを排除するインビボのアンタゴニストとして利用できる。リガンドを精製するために、zalpha11-Igキメラをリガンド（例えば細胞コンディショニング培地、又は組織抽出物）を含むサンプルに、受容体ーリガンド結合を促進する条件下に添加える（典型的には、生理学的に近い温度、pH及びイオン強度）。次にキメラリガンド複合体は、固相支持体（例えば不溶性樹脂ビーズ）上に固定されたプロテインAを利用した混合体により分離される。続いてリガンドは塩又はpH勾配の様な通常の化学技術を利用して溶出される。あるいは、キメラ自体を固相支持体に結合させ、上記同様に結合及び溶出することができる。収集した分画は所望レベルの純度に達するまで再分画できる。

【0121】

更に、zalpha11可溶性受容体は”リガンドシンク”、即ちインビボ又はインビトロでリガンドに結合するアンタゴニストとして、リガンドの存在が望ましくない治療又はその他応用に使用できる。例えば、大量の生物活性的zalpha11リガンドを発現している癌では、zalpha11可溶性受容体をインビボでのリガンドに対する直接的アンタゴニストとして利用することができる、疾患の進行及びそれに伴う症状の緩和を支援するだろう。更に、zalpha11可溶性受容体を利用し、zalpha11受容体を過剰発現している癌の増殖を促進するであろうリガンドをインビボに結合することで、これら癌の進行を遅延させることができる。同様に、zalpha11可溶性受容体のインビトロ応用は、例えばzalpha11リガンドの非存在下で増殖する細胞株を選択するネガティブ選別に利用できる。

【0122】

更に、zalpha11可溶性受容体は、インビボ又は組織サンプル中のzalpha11リガンドを発現している癌を検出する診断応用に利用することができる。例えばzalpha11可溶性受容体はここに記した様な放射標識体、又は蛍光標識体と結合でき、そしてインビトロでのリガンドー受容体型結合アッセイ、又は蛍光イメージングアッセイを利用することで、組織サンプル中のリガンドの存在の検出に利用できる。更に、放射標識zalpha11可溶性受容体はインビボに投与でき、当分野既知の放射線イメージング法により、リガンド発現固形癌を検出することができるだろう。

【0123】

この新規DNAに対応するmRNAの組織分布の分析は、胸腺、非存、リンパ節及び末梢血白血球を含むリンパ系組織での発現を示した。これらデータは免疫細胞の増殖、分化及び／又は活性化に於けるzalpha11の役割を指示するものであり、免疫反応の発生及び制御に於ける役割を示唆している。データは更に、zalpha11とそのリガンドとの相互作用が、骨髓細胞の増殖及び発生を刺激し、IL-2、IL-6、LIF、IL-11及びOSM（Baumannら、J. Biol. Chem. 268:8414-8417, 1993）等の急性期蛋白質の肝臓での合成を誘導する可能性を示唆している。

【0124】

本発明の蛋白質は純度 $\geq 80\%$ 、より好ましくは $\geq 90\%$ 、さらにより好ましくは $\geq 95\%$ に精製することが好ましく、そして特に汚染高分子、特に他種蛋白質及び核酸に関しての純度

が99.9%以上であり、感染及び発熱物質を含まない、医薬品としての純粋状態が特に好ましい。好ましくは、精製蛋白質は他種蛋白質、特に動物起源の他種蛋白質を実質上含まない。

【0125】

発現された組換え体zalpha11蛋白質（又はキメラzalpha11ポリペプチド）は、分画法、及び／又は通常の蛋白質精製法及び媒体を利用し精製することができる。硫酸沈殿及びSan又はカオトロープ抽出はサンプルの分画に利用できるだろう。精製段階の例には、ハイドロキシアパタイト、分子篩、FPLC、及び逆相高性能液体クロマトグラフィーが含まれる。好ましいクロマトグラフィー媒体には、誘導化デキストラン、アガロース、セルロース、ポリアクリルアミド、特殊シリカ等が含まれる。PEI、DEAE、QAE及びQ誘導体が好ましい。クロマトグラフィー媒体の例には、フェニル、ブチル、又はオクチル基により誘導化されたこれら媒体、例えばフェニルーセファロースFF（Pharmacia）、Toyopearlブチル650（Toso、Hass、Montgomeryville、PA）、オクチルーセファロース（Pharmacia）等；又はAmberchrom CG71(Toso Hass)等の様なポリアクリル性樹脂が含まれる。好適な固相支持体には、ガラスビーズ、シリカベース樹脂、セルロース性樹脂、アガロースビーズ、架橋アガロースビーズ、ポリスチレンビーズ、架橋ポリアクリルアミド樹脂及び、それらが用いられる条件下に不溶性である同等のものが含まれる。これら支持体は、アミノ基、カルボキシル基、スルフヒドリル基、ヒドロキシル基及び／又は炭水化物成分により蛋白質の結合を可能にする反応基により修飾されるだろう。共役化学物質の例にはブロモシアン活性化、N-ヒドロキシスクシンイミド活性化、エポキシド活性化、スルフヒドリル活性化、ヒドラジド活性化及びカルボジイミド共役化学に関するカルボキシル及びアミノ誘導体が含まれる。これら及びその他固体媒体は当分野公知であり、また広く利用されており、市販品より入手できる。支持媒体への受容体ポリペプチドを結合させる方法は、当分野既知である。具体的な方法の選択は通常業務の問題であり、選択される支持体の特性により一部決定される。例えば、Affinity Chromatography: Principles & Methods, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden, 1988を参照せよ。

【0126】

本発明のポリペプチドは、その生化学的、構造的、及び生物学的特性を活用することで分離できる。例えば、固定化された金属イオン吸収（IMAC）クロマトグラフィーを利用し、ポリヒスチジンタグを含む富ヒスチジン蛋白質を精製することができる。要約すると、まずゲルに2価金属イオンを付加し、キレートを形成させる（Sulkowski、Trends in Biochem. Sci. 3:1-7,1985）。富ヒスチジン蛋白質は、使用する金属イオンに依存し、マトリックスに様々な親和性で吸着され、そして競合溶出、pHの低下、又は強キレート剤の利用によって溶出されるだろう。その他の精製方法には、レシチン親和性クロマトグラフィー及びイオン交換クロマトグラフィーによるグリコシレート蛋白質の精製が含まれる（Methods in Enzymol., Vol. 182, "Guide to Protein Purification", M. Deutscher, (編集), Academic Press, San Diego, 1990, pp.529-39）。発明の別の実施態様では、精製を容易にするために目的のポリペプチド及びアフィニティータグ（例えばマルトース結合蛋白質、免疫グロブリンドメイン）の融合体が構築される。

【0127】

更に、ポリペプチド融合体又はハイブリッドzalpha11蛋白質は、当分野記載の方法を用いて発明のzalpha11の領域又はドメインを他のヒトサイトカイン受容体ファミリー蛋白質又は異種蛋白質の上記領域又はドメインと組み合わせることで構築される（Sambrookら、上記；Altschulら、上記；Picard、Cur. Opin. Biology, 5:511-5, 1994、及びその中の参考文献）。これら方法により、目的のポリペプチド中にあるより大きなドメイン、又は領域の生物学的重要性を決定できる。これらハイブリッドは、反応動態、結合を変化させ、基質特異性を抑制し、又は拡張し、ポリペプチドの組織及び細胞局在を変え、また未知構造のポリペプチドに応用できる。

【0128】

融合ポリペプチド又は蛋白質は、融合蛋白質の成分及びそれらを化学的に結合する成分を

別々に調製することで、当分野熟練者既知の方法により調製できる。あるいは、適当なリーディングフレーム内に融合蛋白質の1またはそれ以上の成分をコードするポリヌクレオチドを既知技術により作製し、ここに記載の方法により発現することもできる。例えば、生物学的機能を付与するドメインの一部又は全ては、本発明のzalpha11と別のファミリーメンバー由来の機能的に等価なドメインとの間で交換できるだろう。この様なドメインには、ここに開示されている分泌シグナル配列、細胞外サイトカイン結合ドメイン、トランスメンブレンドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメイン、ボックスI及びボックスII部位を含むが、もとよりこれに限定されない。この様な融合蛋白質は、構築された融合体に依存して本発明のポリペプチド、またはそれが融合する蛋白質と同一、又は近似している生物学的に機能的なプロフィールを持つと考えられている。更に、これら融合蛋白質はここに開示された様なその他特性を示す。

10

【0129】

標準的分子生物学及びクローニング技術を利用することで、zalpha11ポリペプチドおよびそれが融合する相手との間で相当ドメインを交換することができる。一般に所望ドメイン、例えば上記ドメインをコードするDNA断片、例えばここに記したzalpha11ドメインは、追加のポリペプチド（例えばIL-2受容体の様な他サイトカイン受容体由来のドメインまたは領域）をコードする少なくとも1の他DNA断片と作用可能式にフレーム内に連結され、そしてここに記載の様な適当な発現ベクター内に挿入される。一般にDNA構築体は、ポリペプチドの対応領域をコードする複数のDNA断片が作用可能式にフレーム内に連結して全融合蛋白質、またはその機能部分を形成する様に作製される。例えばDNA構築体は、その後

20

にサイトカイン結合ドメイン、トランスメンブレンドメイン、細胞内シグナル伝達ドメインが順番につながる単一のシグナルポリペプチドを含む融合蛋白質をN末端からC末端にかけコードしている。この様な融合蛋白質は、ここに記載した活性に対し発現でき、分離でき、そしてアッセイできる。

【0130】

zalpha11ポリペプチド、またはその断片は、化学的合成によっても調製できる。zalpha11ポリペプチドは、モノマー又は多量体である；グリコシル化されているか非グリコシル化型であり；ペギル化又は非ペギル化状態；及び開始メチオニンアミノ酸残基を含まないだろう。

30

【0131】

本発明のポリペプチドは、排他的固相合成法、部分固相法、断片濃縮又は古典的液相合成法によっても合成できる。ポリペプチドの合成方法は当分野公知である。例えばMerrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149, 1963; Kaiserら, *Anal. Biochem.* 34:595, 1970を参照せよ。固相支持体上での所望ペプチドの全合成の後、ペプチド樹脂は樹脂よりポリペプチドを切り離す試薬で処理され、側鎖保護基の大部分が取り除かれる。この様な方法は当分野でよく確立されている。

【0132】

本発明の分子の活性は、特定の型の細胞の増殖及び／又は分化を測定する各種アッセイを利用し測定することができる。

【0133】

本発明の蛋白質は例えばリンパ性、免疫性、炎症性、脾臓性、血液性又は骨性の疾患の治療に有用であり、そして培養細胞を利用し、あるいはクレームの発明分子を適当な動物モデルに投与することでインビボに測定できる。例えば、zalpha11可溶性受容体ポリペプチドを発現している宿主細胞はアルギン酸塩環境内に包埋でき、レシピエント動物内に注射（移植）することができる。アルギン酸塩-ポリLリジンマイクロカプセル化、選択透過型膜カプセル化、及び拡散型チャンバーはトランスフェクトされた哺乳動物細胞又は初代哺乳動物細胞を捕捉するための手段である。これら非免疫原性型の”カプセル化”は、捕捉された細胞から分泌又は放出される蛋白質及びその他高分子のレシピエント動物への拡散を可能にする。最も重要なことは、カプセルが外来物である包埋細胞をレシピエント動物の免疫反応から隠蔽し、遮蔽することである。この様なカプセル化は注入細胞の寿命を

40

50

数時間又は数日間（裸細胞）から数週間（包埋細胞）に延長することができる。アルギニン酸化系は包埋細胞作製に関する簡便かつ迅速な手段を提供する。

【0134】

アルギニン酸系を作製するのに必要な材料は当分野既知である。方法の一例では、3%アルギニン酸を無菌H₂O内に調製し、無菌濾過する。アルギニン酸系の調製直前にアルギニン酸塩溶液を再度濾過する。約50%の細胞懸濁液（約 5×10^5 ないし約 5×10^7 細胞/mlを含む）を3%アルギニン酸塩溶液と混合する。アルギニン酸塩／細胞懸濁液1mlを100mMの滅菌濾過したCaCl₂溶液内に～15分間かけて押し出し、“糸”を作製する。次に押し出された糸を50mMのCaCl₂溶液内に移し、続いて25mM CaCl₂内に移す。次に糸を脱イオン水で濯ぎ、そして糸を0.01%のポリLリジン液内にインキュベーションしコーティングする。最後に、糸を乳糖付加リンガー液で濯ぎ、シリンジ筒（針無し）内に入れる。大口径の針をシリンジに取り付け、最少量の乳糖付加リンガー液内の糸をレシピエント内に腹腔内注射する。

10

【0135】

本発明の蛋白質をアッセイするインビボの方法は、ウイルス供給システムを含む。本牧的のウイルスの例には、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、レトロウイルス、及びアデノ関連ウイルス（AAV）が含まれる。アデノウイルスは2本鎖DNAウイルスで、現在最も研究されている異種核酸の供給に関する遺伝子輸送ベクターである（レビューとしては、T. C. Beckerら、Meth. Cell Biol. 43: 161-89, 1994;及びJ.T.DouglasとD.T.Curiel、Science & Medicine 4: 44-53, 1997を見よ）。アデノウイルスシステムは、幾つかの利点を有する：アデノウイルスは(i)比較的大きなDNA挿入体に適合しており；(ii)高力価まで増殖し、(iii)広範囲の哺乳動物細胞に感染し、そして(iv)各種プロモーターを含む数多くの入手可能なベクターに利用できる。また、アデノウイルスは血液中で安定であることから、それらは静脈注射により投与することができる。

20

【0136】

アデノウイルスゲノムの一部を欠失させることで、より大きな異種DNA挿入体に適合できる。これら挿入体は、直接接続、又はコトランスフェクトしたプラスミドとの相対的組み換えによってウイルスDNA内に取り込ませることができる。例示的システムでは、必須E1遺伝子をウイルスベクターより欠失させると、E1遺伝子が宿主細胞（例えばヒト293細胞株）から提供されるまでウイルスは複製しなくなる。無償の動物に静脈投与した場合、アデノウイルスは主に肝臓を標的とする。アデノウイルス供給システムがE1遺伝子を欠失している場合、ウイルスは宿主細胞内では複製できない。しかし、宿主組織（例えば肝臓）は異種蛋白質を発現し、また加工（ならびにシグナル配列がある場合には分泌し）するだろう。分泌された蛋白質は高度に血管形成された肝臓内の血流に入り、そして感染動物に対する作用を決定することができる。

30

【0137】

更に、各種ウイルス遺伝子の欠失を持つアデノウイルスベクターを利用し、ベクターに対する免疫反応を除く試みができる。この様なアデノウイルスはE1欠失であり、また更にE2A又はE4の欠失も含む（Lusky、Mら、J. Virol. 72:2022-2032,1998, Raper, S.E.ら、Human Gene Therapy 9:671-679, 1998)。更に、E2bの欠失は免疫反応を低下させると報告されている（Amalfitano, A.ら、J. Virol. 72:926-933,1998)。更に、全アデノウイルスゲノムを欠失させることで、非常に大きな異種DNAの挿入に対応できる。全てのウイルス遺伝子が欠失した“gutless”と呼ばれるアデノウイルスの生成は、異種DNAの大きな挿入には特に有益である。レビューとしては、Yeh、P.とPerricaudet, M., FASEB J. 11:615-623, 1997を見よ。

40

【0138】

アデノウイルスシステムはインビトロでの蛋白質産生にも利用できる。アデノウイルスを感染させた非293細胞を、細胞が迅速に分裂しない条件下に培養することで、細胞は長時間にわたり蛋白質を産生することができる。例えば、BHK細胞は細胞向上内にて周密的に増殖され、次に問題の分泌蛋白質をコードするアデノウイルスベクターに曝される。続いて細胞は、感染細胞が数週間明瞭な細胞分裂なしに生存できる無血清状態下に増殖される

50

。あるいは、アデノウイルスベクターが感染した293細胞は、比較的高細胞密度で接着細胞として、又は懸濁細胞中に増殖し、大量の蛋白質を産生することができる（Garnierら、Cytotechnol.15:145-55, 1994参照）。いずれのプロトコールでも、発現され、分泌された異種蛋白質は、発現蛋白質の細胞内での蓄積状態によって細胞培養上清、溶解体、または膜分画から繰り返し分離できる。感染293細胞産生法では、非分泌型蛋白質も効果的に得ることができるだろう。

【0139】

zalpall1に関し観察された組織分布の観点では、アゴニスト（天然リガンド／置換基／コファクター等を含む）及びアンタゴニストはインビトロ及びインビボ両方の応用に多くの可能性を有している。zalpall1アゴニストとして同定された化合物は各種インビトロ及びインビボに於ける免疫及び造血細胞の増殖の刺激に関し有用であろう。例えば、zalpall1アゴニスト化合物は、限定細胞培養培地の成分として有用であり、そして単独又は他のサイトカイン及びホルモンと組合せ、細胞培養に通常利用されている血清の代替となる。即ち、アゴニストはT細胞、B細胞、及びリンパ系ならびに骨髓系培養細胞の増殖及び／又は発生の特異的促進に有用である。更にzalpall1可溶性受容体、アゴニスト、またはアンタゴニストは初代骨髓分離培養体からのコロニー形成の促進を計測するアッセイにインビトロ利用できるだろう。この様なアッセイは当分野既知である。

【0140】

zalpall1はその活性に関する阻害剤（アンタゴニスト）の同定にも利用できる。試験化合物はここに開示されたアッセイに加えられ、zalpall1の活性を阻害する化合物が同定される。これらここに開示されたアッセイに加え、サンプルはzalpall1結合、オリゴマー形成、又はzalpall1依存性細胞反応の促進／阻害を測定することを目的とした各種アッセイ内に利用し、zalpall1の阻害について試験することができる。例えば、zalpall1発現細胞株は、zalpall1刺激細胞経路に反応するレポーター遺伝子構築体によりトランスフェクトすることができる。このタイプのレポーター遺伝子構築体は当分野公知であり、また一般にはルシフェラーゼの様なアッセイ可能な蛋白質をコードする遺伝子と作用可能式に連結されたzalpall1-DNA反応要素を含むだろう。DNA反応要素は、環状AMP反応要素（CRE）、ホルモン反応要素（HRE）、インシュリン反応要素（IRE）（Nasrin ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:5273-7, 1990）及び血清反応要素（SRE）（Shaw ら、Cell 56: 563-72, 1989）を含むことができるが、これに限定されるものではない。環状AMP反応要素はRoestlerら、J. Biol. Chem. 263 (19):9063-6; 1988及び Habener, Molec. Endocrinol.4 (8):1087-94; 1990にレビューされている。ホルモン反応要素はBeato, Cell 56:335-44; 1989によりレビューされている。候補化合物、溶液、混合体、又は抽出物は、レポーター遺伝子発現のzalpall1による促進を低下させることで証明される標的細胞に対するzalpall1活性の阻害能力について試験される。このタイプのアッセイは、受容体への結合を介して、またはシグナルカスケードの一部を刺激することによるzalpall1シグナル伝達活性を直接刺激する化合物を検出するだろう。これら同様、zalpall1ポリペプチドに反応性である細胞を提供すること、細胞の第2部分を試験化合物存在下に培養すること、そして細胞の第1部分に比べた細胞の第2部分の細胞反応の増加を検出することを含む、zalpall1ポリペプチドのアゴニストを同定する方法を提供する。更に上記のレポーター遺伝子構築体を含むがzalpall1受容体は発現していない第3の細胞をコントロール細胞に利用し、非特異的又は非zalpall1介在型の受容体刺激を評価することができる。従って、天然リガンドを含むアゴニストはzalpall1ポリペプチド機能の刺激または増加に有用である。

【0141】

ここに開示されたサイトカイン結合ドメインの様なzalpall1リガンド結合ポリペプチドは、リガンド精製にも利用できる。ポリペプチドはアガロースビーズ、架橋型アガロース、ガラス、セルロース性樹脂、シリカをベースとする樹脂、ポリスチレン、架橋したポリアクリルアミド等の使用条件下に安定である素材である固相支持体上に固定される。固相支持体へのポリペプチド結合法は当分野既知であり、アミン化学、プロモシアン活性化、N-ヒドロキシスクシンイミド活性化、エポシド活性化、スルフィドリル活性化、及びヒドラ

10

20

30

40

50

ジド活性化を含む。得られた媒体は一般にカラムの形に形成され、リガンドを含む溶液をこのカラムに1回以上通し受容体ポリペプチドにリガンドを結合させる。続いてリガンドは塩濃度、カオトロピック剤（グアニジンHCl）、又はpHの変化を利用しリガンドー受容体結合を破壊し、溶出される。

【0142】

リガンド結合受容体（または抗体、補体／抗補体対の一員）またはその結合断片、ならびに市販のバイオセンサー計器を用いる検定系を用いるのが有益である（例えば、BIAcore, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ; またはSELDI technology, Ciphergen, Inc., Palo Alto, CA）。このような受容体、抗体、補体／抗補体対または断片は、受容体チップの表面に固定される。この計器の使用は、Karlsson, J. Immunol. Methods 145:229-240, 1991およびCunningham and Wells, J. Mol. Biol. 234:554-63, 1993に開示されている。受容体、抗体、成員または断片は、アミンまたはスルフヒドリル化学作用を用いて、流動細胞内の金皮膜に結合されるデキストラン繊維と共有結合される。リガンド、エピトープあるいは補体／抗補体対の反対成員が試料中に存在する場合、それはそれぞれ固定化受容体、抗体または成員と結合して、培地の屈折率の変化を引き起こし、これは金皮膜の表面プラスモン共鳴の変化として検出される。この系は、結合親和性が算出され得るオンーおよびオフレート測定、ならびに結合の化学量論の査定を可能にする。

10

【0143】

リガンド結合受容体ポリペプチドも、当業界で既知のその他の検定系内で用いられ得る。このような系としては、結合親和性の測定のためのScatchard分析が挙げられる（Cunningham et al., Science 253:545-48, 1991; Cunningham et al., Science 245:821-25, 1991）。

20

【0144】

Zalpha11ポリペプチドも、Zalpha11エピトープ、ペプチドまたはポリペプチドと結合する抗体を調製するために用いられ得る。Zalpha11ポリペプチドまたはその断片は、動物に接種し、免疫応答を引き出すための抗原（免疫原）として役立つ。抗原または免疫原性エピトープは、ポリペプチドによって約10アミノ酸からポリペプチドの約全長までまたはそれより長い鎖状ポリペプチド内の一続きのアミノ酸で構成され得る、と当業者は認識する。適切な抗原としては、配列番号2によりコードされるZalpha11ポリペプチド：アミノ酸20（Cys）～アミノ酸538（Ser）またはそのアミノ酸断片AA9～519が挙げられる。抗原として用いるための好ましいペプチドは、サイトカイン結合ドメイン、細胞内シグナリングドメイン、本明細書中で開示されているボックスIおよびボックスII部位、ならびに例えば、埋没G、SおよびT残基および露出H、YおよびW残基を無視し、滑り6残基ウィンドウを基礎にしたHopp/Woods親水性プロファイルから決定された疎水性プロットから当業者が予測したようなZalpha11親水性ペプチドである（図1参照）。Zalpha11親水性ペプチドとしては、（1）配列番号2のアミノ酸51（Trp）～アミノ酸61（Glu）；（2）配列番号2のアミノ酸136（Ile）～アミノ酸143（Glu）；（3）配列番号2のアミノ酸187（Pro）～アミノ酸195（Ser）；（4）配列番号2のアミノ酸223（Phe）～アミノ酸232（Glu）；（5）配列番号2のアミノ酸360（Glu）～アミノ酸368（Asp）；から成る群から選択されるアミノ酸配列を包含するペプチドが挙げられる。さらに、保存モチーフおよびZalpha11の保存モチーフ間の可変部は、適切な抗原である。さらに、マウスZalpha11ポリペプチド（配列番号85）の対応する残基は、マウスZalpha11に対する抗体を生成するために用いられ得る。この免疫応答から生成される抗体は、本明細書に記載したように単離し、精製し得る。ポリクローナルおよびモノクローナル抗体の調製および単離方法は、当業者には周知である（例えば、Current Protocols in Immunology, Cooligan, et al. (eds.), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, NY, 1989; およびHurrell, J. G. R., Ed., Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1982参照）。

30

40

【0145】

50

当業者には明らかなように、ポリクローナル抗体は、種々の温血動物、例えばウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ニワトリ、ウサギ、マウスおよびラットにZalpha11ポリペプチドまたはその断片を接種することにより生成され得る。Zalpha11ポリペプチドの免疫原性は、アジュバント、例えばミョウバン（水酸化アルミニウム）またはフロイント完全または不完全アジュバントの使用により増大され得る。免疫感作に有用なポリペプチドとしては、融合ポリペプチド、例えばZalpha11またはその一部の免疫グロブリンポリペプチドとの、またはマルトース結合タンパク質との融合体も挙げられる。ポリペプチド免疫原は、全長分子またはその一部であり得る。ポリペプチド部分が「ハプテン様」である場合、このような部分は、有益には、免疫感作のために高分子担体（例えばカギアナカサガイヘモシアニン（K L H）、ウシ血清アルブミン（B S A）または破傷風毒素）と連結または結合され得る。

10

【0146】

本明細書中で用いる場合、「抗体」という用語は、ポリクローナル抗体、アフィニティ精製ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体および抗原結合断片、例えばF（a b '）₂およびF a b タンパク質分解性断片を含む。遺伝子工学処理無傷抗体または断片、例えばキメラ抗体、F v 断片、一本鎖抗体等、ならびに合成抗原結合ペプチドおよびポリペプチドも含まれる。非ヒト抗体は、非ヒトC D Rをヒト枠組み構造および定常部上に移植することにより、または全非ヒト可変ドメインを組み入れることにより、ヒト化され得る（任意に、露出残基の置換によりヒト様表面でそれらを「被う」が、この場合、その結果は「薄く被われた」抗体である）。いくつかの場合には、ヒト化抗体は、適正な結合特徴を増強するために、ヒト可変部枠組み構造ドメイン内に非ヒト残基を保持し得る。抗体をヒト化することにより、生物学的半減期が増大され、ヒトに及ぼすどう予示の悪免疫応答の可能性が低減される。

20

【0147】

本明細書中で有用な抗体を生成または選択するための代替的技法としては、Zalpha11タンパク質またはペプチドへのリンパ球のin vitro曝露、およびファージまたは類似のベクター中での抗体表示ライブラリーの選択が挙げられる（例えば、固定化または標識化Zalpha11タンパク質またはペプチドの使用による）。潜在的Zalpha11ポリペプチド結合ドメインを有するポリペプチドをコードする遺伝子は、ファージで（ファージディスプレイ）または細菌、例えば大腸菌で表示される無作為ペプチドライブラリーをスクリーニングすることにより得られる。ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、多数の方法で、例えば無作為突然変異誘発および無作為ポリヌクレオチド合成により得られる。これらの無作為ペプチド表示ライブラリーは、タンパク質またはポリペプチド、例えばリガンドまたは受容体、生物学的または合成高分子、あるいは有機または無機物質であり得る既知の標的と相互作用するペプチドに関し得スクリーニングするために用いられ得る。このような無作為ペプチド表示ライブラリーを作製およびスクリーニングするための技法は、当業界で既知であり（Landner et al., 米国特許第5,223,409号；Landner et al., 米国特許第4,946,778号；Landner et al., 米国特許第5,403,484号およびLandner et al., 米国特許第5,571,698号）、そして無作為ペプチド表示ライブラリーおよびこのようなライブラリーをスクリーニングするためのキットは、例えばClontech (Palo Alto, CA)、Invitrogen Inc. (San Diego, CA)、New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) およびPharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ) から市販されている。無作為ペプチド表示ライブラリーを本明細書中に開示したZalpha11配列を用いてスクリーニングして、Zalpha11と結合するタンパク質を同定し得る。Zalpha11ポリペプチドと相互作用するこれらの「結合ペプチド」は、細胞をタグ処理するために、アフィニティ精製により相同ポリペプチドを単離するために用いられ得る。それらは、直接または間接的に、薬剤、毒素、放射性核種等と共役され得る。これらの結合ペプチドは、例えば発現ライブラリーおよび中和活性をスクリーニングするための分析方法に用いられ得る。結合ペプチドは、Zalpha11ポリペプチドの循環レベルを測定するために、根元的病状または疾患のマーカーとして可溶性Zalpha11ポリペプチドを検出または低減するために、用いられ得る。これらの結合ペプチドは

30

40

50

、in vitroおよびin vivoのZalpha11結合およびシグナル伝達を遮断するために、Zalpha11「拮抗物質」としても作用し得る。これらの抗-Zalpha11結合ペプチドは、Zalpha11と結合するリガンドの作用を抑制するのに有用である。

【0148】

抗体は、1) それらが閾値レベルの結合活性を示すか、および/または2) それらが関連ポリペプチド分子と有意に交差反応する場合に、特異的に結合すると確定される。第一に、抗体は、本明細書中では、それらがZalpha11ポリペプチド、ペプチドまたはエピトープと、(非Zalpha11)ポリペプチドを制御するための結合親和性より少なくとも10倍の親和性で結合する場合、特異的に結合する。抗体が、10⁶ M⁻¹またはそれより大きい、好ましくは10⁷ M⁻¹またはそれより大きい、さらに好ましくは10⁸ M⁻¹またはそれより大きい、最も好ましくは10⁹ M⁻¹またはそれより大きい結合親和性(K_a)を示すのが好ましい。抗体の結合親和性は、例えばScatchard分析(Scatchard, G., Ann. NY Acad. Sci. 51:660-672, 1949)により、当業者が容易に確定し得る。

【0149】

第二に、抗体は、それらが関連ポリペプチドと有意に交差反応しない場合に、特異的に結合することが確定される。抗体は、例えばそれらが、標準ウエスタンブロット分析(Ausubel et al., 同上)を用いて、Zalpha11を検出するが、しかし既知の関連ポリペプチドを検出しない場合、関連ポリペプチド分子と有意に交差反応しない。既知の関連ポリペプチドの例は、タンパク質族の成員である同一種からのタンパク質である、オルトログ(例えば、IL-6)、Zalpha11ポリペプチドおよび非ヒトZalpha11である。さらに、抗体は、本発明のポリペプチドと特異的に結合する集団を単離するために、既知の関連ポリペプチド「に対してスクリーニングされ」得る。例えば、Zalpha11に対して生じた抗体は、不溶性マトリックスに付着した関連ポリペプチドに吸着される。Zalpha11に特異的な抗体は、適正な緩衝条件下でマトリックスを通して流動する。このようなスクリーニングは、密接に関連したポリペプチドと非交差反応性であるポリクローナルおよびモノクローナル抗体の単離を可能にする(Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; Current Protocols in Immunology, Cooligan, et al. (eds.), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995)。特異抗体のスクリーニングおよび単離は、当業界で周知である(Fundamental Immunology, Paul (eds.), Raven Press, 1993; Getzoff et al., Adv. in Immunol. 43:1-98, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Goding, J.W. (eds.), Academic Press Ltd, 1996; Benjamin et al., Ann. Rev. Immunol. 2:67-101, 1984参照)。

【0150】

Zalpha11タンパク質またはペプチドと特異的に結合する抗体を検出するために、当業者に既知の種々の検定が利用され得る。検定例は、Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988に詳述されている。このような検定の代表的例としては、以下のものが挙げられる: 同時免疫電気泳動、ラジオイムノアッセイ、放射性免疫沈降、酵素結合イムノソルベント検定(ELISA)、ドットブロットまたはウエスタンブロット検定、抑制または競合検定、ならびにサンドイッチ検定。さらに、抗体は、野生型対突然変異体Zalpha11タンパク質またはポリペプチドとの結合に関してスクリーニングされ得る。

【0151】

Zalpha11に対する抗体は、Zalpha11を発現する細胞をタグ処理するために、アフィニティー精製によりZalpha11を単離するために、Zalpha11ポリペプチドの循環レベルを確定するための診断検定のために、根元的病状または疾患のマーカーとしての可溶性Zalpha11を検出または定量するために、FACSを用いる分析方法に、発現ライブラリーをスクリーニングするために、抗イディオタイプ抗体を生成するために、そしてin vitroおよびin vivoのZalpha11活性を遮断するための中和抗体としてまたは拮抗剤として、用いられ得る。適切な直接タグまたは標識としては、放射性核種、酵素、基質、補因子、阻害剤、蛍光マ

ーカー、化学発光マーカー、磁気粒子等が挙げられる。間接的タグまたは標識は、中間体としてのビオチン-アビジンまたはその他の補体／抗補体対の使用を特徴とする。抗体は、直接または間接的に、本明細書中では、薬剤、毒素、放射性核種等と共役され、これらの共役体は、in vivo診断または治療用途に用いられ得る。さらに、Zalpha11またはその断片に対する抗体は、検定、例えばウエスタンブロットまたは当業界で既知のその他の検定において、変性Zalpha11またはその断片を検出するために、in vitroで用いられ得る。

【0152】

Zalpha11に対する抗体は、可溶性受容体ポリペプチドの循環レベルを確定するために診断検定内で、アフィニティー精製のために、受容体を発現する細胞をタグ処理し、そしてZalpha11発現レベルを検定するために有用である。検定方法は、蛍光活性化細胞分類法を用いる。二価抗体は、Zalpha11リガンドの作用を模倣するための作動剤として用いられ得る。

10

【0153】

抗体は、本明細書中では、直接または間接的に、薬剤、毒素、放射性核種等とも共役され、これらの共役体は、in vivo診断または治療用途に用いられ得る。例えば、本発明のZalpha11を認識する抗体または結合ポリペプチドは、対応する抗補体分子（即ち、Zalpha11受容体）を発現する組織または器官を同定または治療するために用いられ得る。特に、抗Zalpha11抗体あるいはその生物活性断片またはペプチドは、検出可能または細胞傷害性分子と結合され、そしてZalpha11分子を発現する細胞、組織または器官を有する動物に送達され得る。

20

【0154】

適切な検出可能分子は、直接または間接的に、Zalpha11を結合するポリペプチド（前記の結合ペプチドを含めた「結合ポリペプチド」）、抗体、あるいは生物活性断片またはその一部と結合され得る。適切な検出可能分子としては、放射性核種、酵素、基質、補因子、阻害剤、蛍光マーカー、化学発光マーカー、磁気粒子等が挙げられる。適切な細胞傷害性分子は、直接または間接的に、ポリペプチドまたは抗体に結合され、その例としては、細菌または植物毒素（例えば、ジフテリア毒素、シュードモナス外毒素、リシン、アブリン等）、ならびに治療用放射性核種、例えばヨウ素-131、レニウム-188またはイットリウム-90（ポリペプチドまたは抗体に直接的に結合されるか、または例えばキレート化部分の手段を介して間接的に結合される）が挙げられる。結合ポリペプチドまたは抗体は、細胞傷害性剤、例えばアドリアマイシンとも共役され得る。検出可能または細胞傷害性分子の間接的結合のためには、検出可能または細胞傷害性分子は、補体／抗補体の一成員と共役され得る。この場合、他方の成員は結合ポリペプチドまたは抗体部分に結合される。これらの目的のために、ビオチン／ストレプトアビジンは補体／抗補体対の一例である。

30

【0155】

別の実施態様では、結合ポリペプチド-毒素融合タンパク質または抗体-毒素融合タンパク質は、標的化細胞または組織の抑制または除去のために（例えば、癌細胞または組織を治療するために）用いられ得る。あるいは、結合ポリペプチドが多重機能ドメイン（即ち、活性化ドメインまたはリガンド結合ドメイン+ターゲティングドメイン）、ターゲティングドメインのみを含む融合タンパク質は、検出可能分子、細胞傷害性分子または補体分子を問題の種類の細胞または組織に向けるのに適している。単一ドメインのみを含む融合タンパク質が補体分子を含む場合、抗補体分子は検出可能または細胞傷害性分子と共役され得る。このようなドメイン-補体分子融合タンパク質は、したがって、遺伝子抗補体-検出可能／細胞傷害性分子共役体の細胞／組織特異的送達のための遺伝子ターゲティングビヒクルを表す。

40

【0156】

別の実施態様では、Zalpha11結合ポリペプチド-サイトカインまたは抗体-サイトカイン融合タンパク質は、結合ポリペプチド-サイトカインまたは抗Zalpha11抗体が過増殖性細胞を標的化する場合、標的組織（例えば、血液、リンパ、結腸および骨髄癌）のin vivo殺害を増強するために用いられ得る（一般的に、Hornick et al., Blood 89:4437-47, 19

50

97参照)。彼等は、作用の所望部位へのサイトカインのターゲッティングを可能にし、それによりサイトカインの局所濃度の増大を提供する融合タンパク質を記載する。適切な抗Zalpa11抗体は、望ましくない細胞または組織（即ち腫瘍または白血病）を標的にし、融合サイトカインは、エフェクター細胞により標的細胞溶解の改良を媒介する。この目的のための適切なサイトカインとしては、例えば、インターロイキン2および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）が挙げられる。

【0157】

あるいは、本明細書中に記載したZalpa11結合ポリペプチドまたは抗体融合タンパク質は、Zalpa11介在性アポトーシス経路を直接的に刺激することにより標的組織のin vivo殺害を増強し、Zalpa11を発現する過増殖性細胞の細胞死を引き起こすために用いられ得る。

10

【0158】

本明細書中に記載した生物活性結合ポリペプチドまたは抗体共役体は、経口的に、静脈内に、動脈内に、または導管内に送達され得るか、あるいは意図された作用部位に局所的に導入され得る。

【0159】

サイトカイン受容体と結合する4-らせん束サイトカイン、ならびに活性化リンパ球により産生されるその他のタンパク質は、身体全体の細胞分化、活性化、漸増およびホメオスタシスに重要な生物学的役割を演じる。療法的効用としては、慢性関節リウマチ、多発性硬化症、重症筋無力症、全身性エリテマトーデスおよび糖尿病のような自己免疫疾患を含めた免疫調節を必要とする疾患の治療が挙げられる。可溶性受容体および天然リガンドを含めたZalpa11拮抗薬または作動薬は炎症の調節に重要であり、したがって、慢性関節リウマチ、喘息、潰瘍性結腸炎、炎症性腸疾患、クローン病、および敗血症を治療するのに有用である。可溶性受容体および天然リガンドを含めたZalpa11拮抗薬または作動薬は、腫瘍誘発の媒介にある役割を演じ、したがって癌の治療に有用であり得る。可溶性受容体および天然リガンドを含めたZalpa11拮抗薬または作動薬は、移植片拒絶を低減するために重要である免疫系抑制に治療的可能性を有し得る。Zalpa11リガンドは、移植片対宿主病の防止に有用性を有し得る。

20

【0160】

あるいは、可溶性受容体および天然リガンドを含めたZalpa11拮抗薬または作動薬は、感染性疾患に対する免疫を増強し、HIV溶性患者のような免疫無防備状態患者を治療し、あるいはワクチンを改良するのに重要である免疫系を活性化し得る。特に、可溶性受容体および天然リガンドを含めたZalpa11拮抗薬または作動薬は、NK細胞またはそれらの先祖を調節し、刺激または拡充し、そしてウイルス感染の治療における、そして抗新生物形成因子としての療法的価値を提供する。NK細胞は、転移性腫瘍細胞の排除に主要な役割を演じると考えられ、そして転移性および固形の両方の腫瘍を有する患者はNK細胞活性を示していた（Whiteside et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 230:221-224, 1998）。

30

【0161】

Zalpa11ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、Zalpa11活性を増大または抑制するのが望ましい遺伝子療法用途内で有用である。哺乳類が突然変異化Zalpa11遺伝子を有するかまたはZalpa11遺伝子を有さない場合、Zalpa11遺伝子が哺乳類の細胞中に導入され得る。一実施態様では、Zalpa11ポリペプチドをコードする遺伝子がin vivoでウイルスベクターに導入される。このようなベクターとしては、弱毒化または欠陥DNAウイルス、例えば、単純ヘルペスウイルス（HSV）、パピローマウイルス、エプスタインバーウイルス（EBV）、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス（AAV）等が挙げられるが、これらに限定されない。ウイルス遺伝子を完全に、またはほぼ完全に欠いた欠陥ウイルスが好ましい。欠陥ウイルスは、細胞に導入後は感染性でない。欠陥ウイルスベクターの使用は、ベクターが他の細胞を感染する可能性を心配することなく、特異的局限化領域における細胞への投与を可能にする。特定のベクターの例としては、欠陥単純ヘルペス

40

50

ウイルス 1 (H S V 1) ベクター (Kaplitt et al., Molec. Cell. Neurosci. 2:320-30, 1991) ; 弱毒化アデノウイルスベクター、例えばStratford-Perricauder et al., J. Clin. Invest. 90:626-30, 1992に記載されたベクター ; および欠陥アデノ関連ウイルスベクター (Samulski et al., J. Virol. 61:3096-101, 1987; Samulski et al., J. Virol. 63:3822-8, 1989) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0162】

別の実施態様では、Zalpha11遺伝子は、例えばAnderson等、米国特許第5,399,346号 ; Mann et al., Cell 33:153, 1983; Temin等、米国特許第4,650,764号 ; Temin等、米国特許第4,980,289号 ; Markowitz et al., J. Virol. 62:1120, 1988 ; Temin等、米国特許第5,124,263号 ; 国際特許公告WO 95/07358 (Dougherty等、1995年3月16日公開) ; およびKuo et al., Blood 82:845, 1993に記載されているように、レトロウイルスベクターに導入され得る。あるいは、ベクターは、リポソームを用いて、in vivoでのリポフェクションにより導入され得る。合成陽イオン性脂質は、マーカーをコードする遺伝子のin vivoトランスフェクションのためのリポソームを調製するために用いられ得る (Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7, 1987; Mackey et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8027-31, 1988)。特定の器官にin vivoで外因性遺伝子を導入するためのリポフェクションの使用は、ある種の実際の利点を有する。特定細胞へのリポソームの分子ターゲティングは、利点の一領域を表す。特に、特定細胞に対するトランスフェクションの指示は、利点の一領域を表す。例えば、特定細胞型へのトランスフェクションの指示は、脾臓、肝臓、腎臓および脳のような細胞不均一性を有する組織において特に有益である。脂質は、ターゲティングの目的のためにその他の分子と化学的に結合され得る。標的化ペプチド (例えば、ホルモンまたは神経伝達物質)、抗体のようなタンパク質、または非ペプチド分子は、リポソームと化学的に結合され得る。

【0163】

裸DNAプラスミドとしてベクターを導入し、次に身体に形質転換化細胞を再移植するために、身体から標的化細胞を取り出すことができる。遺伝子療法のための裸DNAベクターは、当業界で既知の方法により、例えばトランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、形質導入、細胞融合、DEAEデキストラン、リン酸カルシウム沈降、遺伝子銃の使用またはDNAベクター輸送体の使用により所望の宿主細胞中に導入され得る (例えば、Wu et al., J. Biol. Chem. 267:963-7, 1992; Wu et al., J. Biol. Chem. 263:14621-4, 1988参照)。

【0164】

アンチセンス法は、Zalpha11遺伝子転写を抑制するために、例えばin vivoで細胞増殖を抑制するために用いられ得る。Zalpha11コードポリペプチド (例えば、配列番号1で記述されるようなポリヌクレオチド) のセグメントと相補的なポリヌクレオチドは、Zalpha11コードmRNAと結合し、そしてこのようなmRNAの翻訳を抑制するよう設計される。このようなアンチセンスポリヌクレオチドは、細胞培養中での、または被験者における、Zalpha11ポリペプチドコード遺伝子の発現を抑制するために用いられる。

【0165】

さらに、細胞表面分子として、Zalpha11ポリペプチドは、細胞中への遺伝子療法の導入のための標的として用いられ得る。この適用は、Zalpha11が常態で発現される細胞、例えばリンパ様組織およびPBF、またはZalpha11ポリペプチドを発現する癌細胞中に治療用遺伝子を導入するのに特に適している。例えば前記のようなウイルス遺伝子療法は、ウイルス受容体というよりむしろZalpha11ポリペプチドのような細胞性受容体を発現する特異的細胞型に対して標的化され得る。抗体、または標的細胞表面のZalpha11分子を認識するその他の分子は、標的細胞に遺伝子療法物質をウイルスが感染させ、投与するのを指図するために用いられ得る (Woo, S.L.C, Nature Biotech. 14:1538, 1996; Wickham, T.J. et al., Nature Biotech. 14:1570-1573, 1996; Douglas, J.T. et al., Nature Biotech. 14:1574-1578, 1996; Rihova, B., Crit. Rev. Biotechnol. 17:149-169, 1997; およびVile, R.G. et al., Mol. Med. Today 4:84-92, 1998参照)。例えば、Zalpha11特異的抗体

と結合したウイルス中和 F a b 断片を含有する二特異的抗体は、Zalpha11受容体を発現する細胞にウイルスを向け、遺伝子阻止を含有するウイルスの細胞への侵入を可能にするために用いられ得る（例えば、Wickham, T.J., et al., J. Virol. 71:7663-7669, 1997; および Wickham, T.J., et al., J. Virol. 70:6831-6838, 1996 参照）。

【0166】

本発明は、診断適用に用途を見出す試薬も提供する。例えば、Zalpha11、Zalpha11 D N A または R N A を包含するプローブ、あるいはその亜配列は、Zalpha11 遺伝子が第 16 染色体上に存在するか否か、または突然変異が起きているか否かを確定するために用いられ得る。Zalpha11 は、第 16 染色体の 16p11.1 領域に局限される（実施例 3 参照）。Zalpha11 遺伝子座での検出可能染色体異常としては、異数性、遺伝子コピー数変化、挿入、欠失、制限部位変化および再配列が挙げられるが、これらに限定されない。このような異常は、制限断片長多型（R F L P）分析、蛍光 in-situ ハイブリダイゼーション法、P C R 技法を用いる短タンデム反復（S T R）分析および当業界で既知のその他の遺伝子連鎖分析法（Sambrook et al., 同上; Ausubel et al., 同上; Marian, Chest 108:255-65, 1995）のような分子遺伝子技術を用いることにより、本発明のポリヌクレオチドを用いて検出され得る。

【0167】

遺伝子の位置についての正確な知識は、例えば：1）配列が既存のコンティグの一部であるか否かを確定して、Y A C、B A C または c D N A クローンのような種々の形態の付加的周囲遺伝子配列を得て、2）同一染色体領域との連鎖を示す遺伝性疾患に対する考え得る候補遺伝子を提供し、そして 3）特定の遺伝子がどの機能を有し得るかを確定する助けとなり得るマウスのようなモデル生物を相互参照することを含めた多数の目的のために有用であり得る。

【0168】

Zalpha11 遺伝子は、第 16 染色体の 16p11.1 領域に局限される。既知の機能を有するいくつかの遺伝子が、この領域に認められる。例えば、造血素受容体族の一員であるインターロイキン 4（I L - 4）サイトカイン受容体 α サブユニットは、16p12.1~p11.2 に認められる。このサブユニットは、Zalpha11 とヘテロ二量体を形成し得る。さらに、Zalpha11 ポリヌクレオチドプローブは、I L - 4 受容体の欠損に関連した異常または遺伝子型、例えばいくつかのアレルギー性炎症性疾患および喘息に関連するものを検出するために用いられ得る（Deichman, K.A. et al., Exp. Allergy 28:151-155, 1998; Mitsuyasu, H. et al., Nature Genet. 19:119-120, 1998）。さらに、Zalpha11 ポリペプチドプローブは、感受性マーカーが 16p12~q13 に認められる炎症性腸疾患に関連した異常または遺伝子型を検出するために用いられ得る（Cho, J.H. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 95:7502-7507, 1998）。さらに、Zalpha11 ポリペプチドプローブは、16pter~p13.3 に位置するヘモグロビンに関連した異常または遺伝子型、特に胎児水症のような α サラセミア症候群に関連したヘモグロビン α 欠損を検出するために用いられ得る（例えば、Chui, M.P. and Waye, J.S., Blood 91:2213-2222, 1998 参照）。さらに、他の遺伝子座の中で、I I I 型ウィルムス腫瘍（16q）、ルービンスタイン-タービ症候群（16p13.3）、重症乳児多嚢胞性腎疾患（16p13.3）はすべて、ヒトの疾患状態でそれ自体現れて、ヒトゲノムのこの領域に認められる。第 16 染色体のこの領域に関しては、オンラインヒトメンデル性遺伝 Online Mendelian Inheritance of Man (OMIM) 遺伝子地図、およびその中の参考文献を参照していただきたい（WWW サーバー（<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/getmap?chromosome=16p11.1>））。これらはすべて、Zalpha11 遺伝子と同一染色体領域との連鎖を示す遺伝性疾患に関する潜在的候補遺伝子として役立つ。

【0169】

同様に、Zalpha11 遺伝子座それ自体の欠損は、遺伝性ヒト疾患状態を引き起こし得る。本発明の分子、例えば本発明のポリペプチド、拮抗薬、作動薬、ポリヌクレオチドおよび抗体は、Zalpha11 遺伝子欠損に関連した検出、診断、予防および治療に役立つ。

【0170】

「トランスジェニックマウス」と呼ばれるZalpha11遺伝子を発現するよう工学処理されたマウス、および「ノックアウトマウス」と呼ばれるZalpha11遺伝子機能の完全不在を示すマウスも生成され得る (Snouwaert et al., Science 257:1083, 1992; Lowell et al., Nature 366:740-42, 1993; Capecchi, M.R., Science 244:1288-1292, 1989; Palmiter, R. D. et al., Annu Rev Genet, 20:465-499, 1986)。例えば、遍在的に、あるいは組織特異的または組織制限性プロモーター下で、Zalpha11を過剰発現するトランスジェニックマウスを用いて、過剰発現が表現型を生じるか否かを調べ得る。例えば、野生型Zalpha11ポリペプチド、ポリペプチド断片またはその突然変異体の過剰発現は、正常細胞工程を変えて、Zalpha11発現が機能的に関連する組織を同定する表現型を生じ得るし、Zalpha11、その作動薬または拮抗薬に関する治療標的を示し得る。例えば、工学処理するための好ましいトランスジェニックマウスは、「優性ネガティブ」表現型を発現するもの、例えば結合したトランスメンブレンドメインを有するZalpha11細胞外サイトカイン結合ドメインを過剰発現するものである (配列番号2の約アミノ酸20 (Cys) ~255 (Leu))。さらに、このような過剰発現は、ヒト疾患との類似性を示す表現型を生じ得る。同様に、ノックアウトZalpha11マウスを用いて、Zalpha11がin vivoで絶対必要であるか否かを確定し得る。ノックアウトマウスの表現型は、例えば本明細書中に記載したようなZalpha11拮抗薬が有し得るin vivo作用を予測する。マウスまたはヒトZalpha11 cDNAを用いて、ネズミZalpha11 mRNA、cDNAおよびゲノムDNAを単離し、その後これを用いて、ノックアウトマウスを生成し得る。これらのマウスは、in vivo系におけるZalpha11遺伝子およびそれによりコードされるタンパク質を調べるために用いられ得るし、対応するヒト疾患のin vivoモデルとして用いられ得る。さらに、本明細書中に記載したZalpha11に対して向けられるZalpha11アンチセンスポリヌクレオチドまたはリボザイムのトランスジェニックマウス発現は、前記のトランスジェニックマウスと同様に用いられ得る。

【0171】

製薬的使用に関しては、本発明の可溶性受容体ポリペプチドは、慣用的方法による非経口的、特に静脈内または皮下送達のために処方される。静脈内投与は、1~数時間という典型的時間のボーラス注射または注入による。概して、製剤処方物は、Zalpha11可溶性受容体ポリペプチドを、製薬上許容可能なビヒクル、例えば緩衝化食塩水、水中の5%デキストロース等と組合せて包含する。処方物は、1つ又はそれ以上の賦形剤、防腐剤、可溶化剤、緩衝剤、ウイルス表面のタンパク質損失を防止するためのアルブミン等をさらに含み得る。処方は当業界で周知であり、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 19th ed., 1995に開示されている。治療用量は、一般的には0.1~100 µg/患者の体重1 kg/日の範囲、好ましくは0.5~20 µg/患者の体重1 kg/日であって、的確な用量は、治療される症状の性質および重症度、患者の特徴等を考慮して、許容基準にしたがって臨床医が決定する。用量の決定は、当業者の水準内である。タンパク質は、短期治療のために、1週間またはそれ未満に亘って、しばしば1~3日間投与され得るし、あるいは長期治療に、数ヶ月または数年間用いられ得る。概して、Zalpha11可溶性受容体ポリペプチドの治療的有效量は、臨床的に有意の作用を生じるのに十分な量である。

以下の実施例により本発明をさらに説明するが、本発明はそれらに限定されない。

【0172】

実施例

実施例1

全長Zalpha11を得るためにEST配列を用いたヒトZalpha11の同定
翻訳化DNAデータベースの走査により、クラスIサイトカイン受容体族の一成員であることが判明し、Zalpha11と呼ばれている発現化配列タグ (EST) 配列を同定した。

【0173】

ESTの元となったcDNAの配列分析により、EST配列を確証した。このcDNAクローンを生成し、以下のプライマーを用いてシーケンシングした: ZC447 (配列番号5)、ZC976 (配列番号6)、ZC19345 (配列番号7)、ZC19346 (配列番号8)、Z

C 19349 (配列番号 9)、Z C 19350 (配列番号10)、Z C 19458 (配列番号11)、Z C 19459 (配列番号12)、Z C 19460 (配列番号13)、Z C 19461 (配列番号14)、Z C 19572 (配列番号15)、Z C 19573 (配列番号16)、Z C 19657 (配列番号17)。挿入物は2945 bp で、全長であった。

【0174】

実施例 2

組織分布

ヒト多組織ノーザンブロット (MTN I、MTN IIおよびMTN III) (Clontech) を用いて、ノーザンブロット分析を実施した。プライマーとしてオリゴ Z C 19,181 (配列番号18) および Z 19,182 (配列番号19) を用いて、P C R 反応で、実施例 1 に記載した c D N A を用いた。P C R 条件を以下に示す：94℃ で1.5分；94℃で15秒、次に68℃で30秒を35回；72℃で10分；4℃一夜。P C R 反応生成物の試料を、1.5% アガロースゲル上を走行させた。175 bp という予測サイズの帯域が観察された。175 bp P C R 断片を、市販キット (QiaexII; Qiagen) を用いてゲル精製し、次に、メーカーの使用説明書にしたがって、Rediprime II (Amersham) 無作為プライム標識系を用いて³²P-d C T P で放射能標識した。次に、メーカーの使用説明書にしたがって、Nuc-Trapカラム (Stratagene) を用いて、プローブを精製した。ExpressHyb (Clontech) 溶液を予備ハイブリダイゼーションのために、ノーザンブロット用ハイブリダイズ溶液として用いた。ハイブリダイゼーションは、1~2x10⁶ cpm/ml の標識化プローブを用いて、65℃で一夜実施した。次にプローブを2X SSC/1%SDS 中で25℃で4回洗浄し、その後0.1X SSC/0.1%SDS 中で50℃で洗浄した。約3 kbおよび5 kbの転写体を、リンパ節、末梢血液白血球および胸腺で検出した。

【0175】

ヒト R N A Master Blots (Clontech) を用いて、ドットブロットも実行した。ドットブロットの方法および条件は、前記の多組織ブロットと同一である。ドットブロットは、胸腺、リンパ節および脾臓で最強シグナルを有した。

【0176】

ヒト癌細胞株 M T N (Clontech) を用いて、ノーザン分析も実行した。プライマーとしてオリゴ Z C 19,907 (配列番号20) および Z 19,908 (配列番号21) を用いて、P C R 反応で、実施例 1 に記載した c D N A を用いた。P C R 条件を以下に示す：95℃で1分、次に60℃で1分を35回；72℃で1.5分；72℃で10分；4℃一夜。P C R 反応生成物の試料を、1.5% アガロースゲル上を走行させた。1.2 kb という予測サイズの帯域が観察された。1.2 kb P C R 断片を、メーカーの使用説明書にしたがって、市販キット (QiaexII ゲル抽出キット; Qiagen) を用いてゲル精製し、次にPrime-It II (Stratagene) 無作為プライム標識系を用いて³²P-d C T P で放射能標識した。次に、メーカーの使用説明書にしたがって、Nuc-Trapカラム (Stratagene) を用いて、プローブを精製した。ExpressHyb (Clontech) 溶液を予備ハイブリダイゼーションのために、ノーザンブロット用ハイブリダイズ溶液として用いた。ハイブリダイゼーションは、1~2x10⁶ cpm/ml の標識化プローブを用いて、65℃で2時間実施した。次にプローブを2X SSC/1%SDS 中で25℃で4回洗浄し、その後0.1X SSC/0.1%SDS 中で50℃で洗浄した。バーキットリンパ腫由来のRaji細胞株中で、強シグナルを観察した。

【0177】

実施例 3

Zalpal1遺伝子の P C R ベースの染色体マッピング

市販の「GeneBridge 4放射線ハイブリッドパネル」 (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL) を用いて、Zalpal1を第16染色体にマッピングした。GeneBridge 4放射線ハイブリッドパネルは、93の放射線ハイブリッドクロンの各々からの P C R 可能 D N A + 2つの対照 D N A (H F F ドナーおよびA23レシピエント) を含有した。WWWサーバー (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/contig/rhmapper.pl>) は、GeneBridge 4放射線ハイブリッドパネルを用いて構築されたWhitehead Institute/MIT Center for Genome Researchのヒトゲノムの放射線ハイブリッドマップ (“WICGR” 放射線ハイブリッドマップ

）と比較したマッピングを可能にした。

【0178】

「GeneBridge 4RHパネル」を用いたZalphan1のマッピングのために、20 μ lの反応物を96ウェルマイクロタイタープレート（Stratagene, La Jolla, CA）中に用意し、「RoboCycler Gradient 96」熱サイクラー（Stratagene）中で用いた。95のPCR反応物は各々、2 μ lの10X PCR反応緩衝液（Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA）、1.6 μ lのdNTPミックス（各2.5 Mm、Perkin-Elmer, Foster City, CA）、1 μ lのセンスプライマー、ZC19,954（配列番号22）、1 μ lのアンチセンスプライマー、ZC19,955（配列番号23）、2 μ lの「ReadLoad」（Research Genetics, Inc., Huntsville, AL）、0.4 μ lの50X Advantage KlenTaqポリメラーゼミックス（Clontech）、個々のハイブリッドクローンまたは対照からの25 ngのDNAおよび全容積を20 μ lにするための蒸留水。反応物を等量の鉱油で被い、密封した。PCRサイクラー条件を以下に示す：最初に94°Cで4分の変性を1回；94°Cで45分、68°Cで45秒および72°Cで1分を35回；その後72°Cで7分。2%アガロースゲル（Life Technologies）上での電気泳動により、反応物を分離した。

10

【0179】

結果は、Zalphan1が、第16染色体WICGR放射線ハイブリッドマップ上に、枠組み構造マーカーWI-3768から、9.54 cR 3000に認められるということを示した。近位および遠位枠組み構造マーカーは、それぞれWI-3768およびTIGER-A002K05であった。周囲マーカーの使用は、一体化LD第16染色体マップueno 16p11.1領域にZalphan1を配置する（The Genetic Location Database, University of Southampton, WWW server: <http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public.html/>）。

20

【0180】

実施例4

ヒトMPL-Zalphan1ポリペプチドキメラの構築：Zalphan1細胞内シグナリングドメインと融合したMPL細胞外およびTMドメイン

MPL受容体の細胞外および細胞内ドメインを、プライマーZ17,212（配列番号24）およびZC19,914（配列番号25）によるPCRを用いて、MPL受容体（PHZ1/MPLプラスミド）を含有するプラスミドから単離した。反応条件を以下に示す：95°Cで1分；95°Cで1分、45°Cで1分、72°Cで2分を35回；その後72°Cで10分；次に10°Cで浸漬。PCR反応生成物を、1%低融点アガロース（Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN）上を走行させ、1.5 kb bMPL受容体断片を、メーカーの使用説明書にしたがって、QiaexII ゲル抽出キット（Qiagen）を用いて単離した。

30

【0181】

Zalphan1の細胞内ドメインを、プライマーZ19,913（配列番号26）およびZC20,097（配列番号27）によるPCRを用いて、Zalphan1受容体cDNAを含有するプラスミドから単離した。Zalphan1受容体コード配列に対応するポリヌクレオチド配列は、配列番号1のヌクレオチド69～1682で示される。反応条件は前記と同様であった。PCR生成物を、1%低融点アガロース（Boehringer Mannheim）上を走行させ、900 bpのZalphan1断片を、メーカーの使用説明書にしたがって、QiaexII ゲル抽出キットを用いて単離した。

【0182】

前記の単離断片の各々を1:1の容量比で混合して、プライマーZ17,212（配列番号24）およびZC20,097（配列番号27）を用いるPCRで使用して、MPL-Zalphan1キメラを作製した。反応条件を以下に示す：95°Cで1分；95°Cで1分、55°Cで1分、72°Cで2分を35回；その後72°Cで10分；次に10°Cで浸漬。PCR反応生成物を、1%低融点アガロース（Boehringer Mannheim）上を走行させ、約2.4 kbMPLZalphan1キメラ断片を、メーカーの使用説明書にしたがって、QiaexII ゲル抽出キット（Qiagen）を用いて単離した。MEL-Zalphan1キメラ断片を、メーカーの使用説明書にしたがって、EcoRI（BRL）およびXbaI（Boehringer Mannheim）で消化した。全消化物を、1%低融点アガロース（Boehringer Mannheim）上を走行させ、切断MPLZalphan1キメラ断片を、メーカーの使用説明書にしたがって、QiaexII ゲル抽出キット（Qiagen）を用いて単離した。その結果生じた

40

50

切断M P L-Zalpa11キメラを、前記と同様に発現ベクター中に挿入した。

【0183】

レシピエント発現ベクターp Z P-5 Nを、メーカーの使用説明書にしたがって、E c o R I (BRL) およびH i n d I I I (BRL) で消化し、前記と同様にゲル精製した。このベクター断片を、結紮反応において、前記で単離したE c o R I およびX b a I 切断M P L-Zalpa11キメラおよびX b a I /H i n d I I I リンカー断片と併合した。T 4 リガーゼ (BRL) を用いて、15℃で一夜、結紮を実行した。結紮の試料を、D H10 B E l e c t r o M A X エレクトロコンピテント大腸菌細胞 (25 μF、200 Ω、2.3V) 中で電気穿孔処理した。形質転換体をL B + アンピシリンプレート上に載せ、単一コロニーをP C R によりスクリーニングして、Z C 17,212 (配列番号24) およびZ C 20,097 (配列番号27) を用いてM P L-Zalpa11キメラを調べた。P C R 条件は前記と同様であった。

10

【0184】

以下のプライマーを用いた配列分析により、M P L-Zalpa11キメラ配列を確認した：Z C 12,700 (配列番号28)、Z C 5,020 (配列番号29)、Z C 6,675 (配列番号30)、Z C 7,727 (配列番号31)、Z C 8,290 (配列番号32)、Z C 19,572 (配列番号15)、Z C 6,622 (配列番号33)、Z C 7,736 (配列番号34) およびZ C 9,273 (配列番号35)。挿入物は2.4 bpで、全長であった。

【0185】

実施例 5

Alamar Blueを用いたB A F 3 検定におけるM P L-Zalpa11ベースの増殖

20

A. M P L-Zalpa11キメラを発現するB a F 3 細胞の構築

ネズミ骨髄由来インターロイキン-3 (I L-3) 依存性前リンパ様細胞株であるB a F 3 (Palacios and Steinmetz, Cell 41:727-734, 1985; Mathey-Prevot et al., Mol. Cell Biol. 6:4133-4135, 1986) を、10%加熱不活性化ウシ胎仔血清、2 ng/mlネズミI L-3 (m I L-3) (R & D, Minneapolis, MN)、2 mM L-グルタミン酸 (Gibco, BRL)、1 mM ビルビン酸ナトリウム (Gibco, BRL) およびP S N 抗体 (Gibco, BRL) を補給した完全培地 (R P M I 培地 (JRH Bioscience Inc., Lenexa, KS)) 中に保持した。電気穿孔前に、p Z P-5 N /M P L-Zalpa11 D N A (実施例 4) を、メーカーの使用説明書にしたがって、Qiagen Maxi Prepキット (Qiagen) を用いて調製し、精製した。電気穿孔用のB a F 3 細胞をR P M I 培地中で1回洗浄して、次に107細胞/mlの細胞濃度でR P M I 培地中に再懸濁した。1 mlの再懸濁B a F 3 細胞を30 μgのp Z P-5 N /M P L-Zalpa11プラスミドD N Aと混合し、別個の使い捨て電気穿孔小室 (Gibco, BRL) に移した。室温で15分間インキュベーション後、電気穿孔装置 (CELL-PORATOR; GIBCO BRL) で送達される連続衝撃 (800 lFad/300V; 1180 lFad/300V) を細胞に与えた。5分間の回復時間後、電気穿孔処理細胞を50 mlの完全培地に移して、インキュベーター中に15~24時間 (37℃、5% C O 2) 入れた。次に細胞を回転沈降させて、T-162 フラスコ中のG eneticin (Gibco) 選択液 (500 μg/ml, G418) を含有する50 mlの完全培地中に再懸濁して、G 4 1 8 耐性プールを単離した。トランスフェクト化B a F 3 細胞のプール (以後、B a F 3 /M P L-Zalpa11細胞と呼ぶ) を、下記のようにシグナリング能力に関して検定した。

30

40

【0186】

B. Alamar Blueを用いたB a F 3 /M P L-Zalpa11細胞のシグナリング能力の検定

前記と同様にB a F 3 /M P L-Zalpa11細胞を遠心分離して、完全培地中で洗浄したが、但し、m I L-3 (以後、「m I L-3 無含有培地」と呼ぶ) は用いなかった。細胞を遠心分離して、3回洗浄し、m I L-3 を確実に除去した。次に細胞を血球計で計数した。細胞を、m I L-3 無含有培地を用いて、100 μl / ウェルの容量で、5000細胞 / ウェルで96ウェルフォーマットでプレート化した。

m I L-3 無含有培地で500 ng/ml、250 ng/ml、125 ng/ml、62 ng/ml、30 ng/ml、15 ng/ml、7.5 ng/ml、1.8 ng/ml、0.9 ng/ml、0.5 ng/ml および0.25 ng/ml濃度に希釈したトロンボポイエチン (T P O) を用いて、B a F 3 /M P L-Zalpa11細胞の増殖を査定し

50

た。100 μ lの稀釈TPOをBAF3/MPL-Zalpha11細胞に付加した。全検定容量は、200 μ lである。陰性対照を、mIL-3無含有培地のみを用いて、TPOを付加せずに、平衡して走行させた。検定プレートを37°Cで5%CO₂で3日間インキュベートし、その時点でAlamar Blue (Accumed, Chicago, IL) を20 μ l/ウェルで付加した。Alamar Blueは生細胞の数を基礎にして蛍光測定読み取り値を生じた。したがって、これは陰性対照と比較した場合、細胞増殖の直接測定値である。プレートを再び37°Cで5%CO₂で24時間インキュベートした。プレートを、544 (励起) および590 (発光) の波長で、SoftMax Proプログラムを用いてFmaxプレート読取機 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) で読み取った。

【0187】

10

結果は、62 ng/ml以上のバックグラウンドの約10倍のトロンボポイエチン誘導性増殖として、Zalpha11の細胞内部分のシグナリング能力を確認した。

【0188】

実施例6

全長Zalpha11を発現する発現ベクターの構築

プライマーZ19,905 (配列番号36) およびZC19,906 (配列番号37) によるPCRを用いて、Zalpha11受容体cDNAを含有するプラスミドから全Zalpha11受容体を単離した。反応条件を以下に示す：95°Cで1分；95°Cで1分、55°Cで1分、72°Cで2分を35回；その後72°Cで10分；次に10°Cで浸漬。PCR反応生成物を、1%低融点アガロース (Boehringer Mannheim) 上を走行させ、約1.5 kbZalpha11cDNA断片を、メーカーの使用説明書にしたがって、QiaexII ゲル抽出キット (Qiagen) を用いて単離した。

20

【0189】

精製Zalpha11cDNAを、メーカーの使用説明書にしたがって、BamHI (Boehringer Mannheim) およびEcoRI (BRL) で消化した。全消化物を、1%低融点アガロース (Boehringer Mannheim) 上を走行させ、メーカーの使用説明書にしたがって、QiaexII ゲル抽出キットを用いて切断Zalpha11断片を精製した。その結果生じた切断Zalpha11キメラを、下記のようにして、発現ベクター中に挿入した。

【0190】

レシピエント発現ベクターpZP-5Nを、前記と同様にメーカーの使用説明書にしたがって、BamHI (Boehringer Mannheim) およびEcoRI (BRL) で消化し、ゲル精製した。このベクター断片を、結紮反応において、前記で単離したBamHIおよびEcoRI切断Zalpha11断片と併合した。T4リガーゼ (BRL) を用いて、15°Cで一晩、結紮を実行した。結紮の試料を、DH10B ElectroMAXエレクトロコンピテント大腸菌細胞 (25 μ F, 200 Ω , 2.3V) 中で電気穿孔処理した。形質転換体をLB+アンピシリンプレート上に載せ、単一コロニーをPCRによりスクリーニングして、ZC19,905 (配列番号36) およびZC19,906 (配列番号37) を用いてZalpha11配列に関して調べた。PCR条件は前記と同様であった。

30

【0191】

以下のプライマーを用いた配列分析により、MPL-Zalpha11配列を確認した：ZC12,700 (配列番号28)、ZC5,020 (配列番号29)、ZC20,114 (配列番号38)、ZC19,459 (配列番号12)、ZC19,954 (配列番号39) およびZC20,116 (配列番号40)。挿入物は約1.6 kbで、全長であった。

40

実施例7

Alamar Blueを用いたBAF3検定におけるZalpha11ベースの増殖

A. Zalpha11受容体を発現するBAF3細胞の構築

前記の実施例6に記載したZalpha11発現ベクター30 μ gを用いて、前記の実施例5Aと同様に、全長Zalpha11受容体を発現するBAF3を構築した。Zalpha11受容体mRNAを発現するBAF3細胞を消化して、BAF3/Zalpha11とした。これらの細胞を用いて、実施例8および12に後述するように、Zalpha11活性に関してスクリーニングした。

【0192】

50

実施例 8

Alamar Blue増殖検定を用いた B a F 3 /Zalpa11細胞を用いたZalpa11活性に関するスクリーニング

A. Zalpa11活性の存在に関して検定するために用いられるサル一次供給源
一次サル脾臓細胞からのコンディショニング培地を用いて、下記のように活性の存在を検定した。サル脾臓細胞を5 ng/mlのフォルボール 1 2 -ミリステートー 1 3 -アセテート (PMA) (Calbiochem, San Diego, CA) および0.5 µg/mlイオノマイシン (Calbiochem) を用いて72時間、活性化した。刺激サル脾臓細胞からの上清を用いて、B a F 3 /Zalpa11細胞の増殖を後述のように検定した。

【0193】

10

B. Alamar Blue増殖検定を用いた B a F 3 /Zalpa11細胞を用いたZalpa11活性に関するスクリーニング

B a F 3 /Zalpa11細胞を遠心分離して、m I L - 3 無含有培地中で洗浄した。細胞を遠心分離して、3回洗浄し、m I L - 3 を確実に除去した。次に細胞を血球計で計数した。細胞を、m I L - 3 無含有培地を用いて、100 µl / ウェルの容量で、5000細胞 / ウェルで96ウェルフォーマットでプレート化した。

【0194】

m I L - 3 無含有培地で50 %、25%、12.5%、6.25%、3.12%、1.5%、0.75%および0.375%濃度に希釈した活性化サル脾臓 (前記実施例 8 A 参照) から状態調節培地を用いて、B a F 3 /Zalpa11細胞の増殖を査定した。全検定容量は、200 µl である。検定プレートを37℃で5% C O 2 で3日間インキュベートし、その時点でAlamar Blue (Accumed, Chicago, IL) を20 µl / ウェルで付加した。プレートを再び37℃で5% C O 2 で24時間インキュベートした。プレートを、前記 (実施例 5) と同様に、F m a x プレート読取機 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) で読み取った。

20

【0195】

結果は、活性化サル脾臓状態調節培地中に存在する因子に対する B a F 3 /Zalpa11細胞の増殖応答を確認した。測定されたように、応答は、50%濃度でのバックグラウンドの約4倍であった。B a F 3 野生型細胞はこの因子に応答して増殖せず、これは、この因子がZalpa11受容体に特異的であることを示す。

【0196】

30

C. Zalpa11活性を単離するために用いられるヒト一次供給源

6名のドナーの各々から、100 mlの血液を採血した。血液は、ヘパリンを含入する10 x 10 mlバキュウテナー管を用いて採血した。6名のドナーからの血液 (600 ml) をプールし、P B S 中で1 : 1 に希釈し、Ficoll-Paque P L U S (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を用いて分離した。フィコール勾配の分離後に産生された単離一次ヒト細胞は、1.2 x 10⁹細胞であった。

【0197】

9.6 mlのM A C S 緩衝液 (P B S、0.5% E D T A、2 mM E D T A) 中に細胞を懸濁した。1.6 mlの細胞懸濁液を取り出して、0.4 mlのC D 3 マイクロビーズ (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) を付加した。混合物を4℃で15分間インキュベートした。C D 3 ビーズで標識したこれらの細胞を、30 mlのM A C S 緩衝液で洗浄し、次に2 mlのM A C S 緩衝液中に再懸濁した。

40

【0198】

V S + カラム (Miltenyi) を、メーカーの使用説明書にしたがって、調製した。V S + カラムを次にVarioM A C S 磁場 (Miltenyi) に入れた。カラムを5 mlのM A C S 緩衝液で平衡させた。単離一次ヒト細胞を次にカラムに適用した。C D 3 陰性細胞をそこに通した。カラムを9 ml (3 x 3 ml) のM A C S 緩衝液ですすいだ。次にカラムを磁場から取り出して、15 mlのファルコン管に入れた。5 mlのM A C S 緩衝液をカラムに入れて、C D 3 + 細胞を溶離し、メーカーにより提供されたプランジャーを用いて、結合細胞を洗い落とした。C D 3 磁気ビーズとともに細胞をインキュベートし、洗浄して、前記のV S + カラ

50

ム工程（インキュベーション～溶離）をさらに5回反復した。その結果生じたC D 3 + 6回のカラム分離からの分画をプールした。C D 3 + 選定ヒトT細胞の収量は、全部で3 x 10⁸細胞であった。

【0199】

プールしたC D 3 + 選定ヒトT細胞の試料を取り出して、染色し、蛍光抗体細胞分類機（FACS）で分類して、その純度を査定した。C D 3 + 選定ヒトT細胞は91% C D 3 + 細胞であった。

【0200】

R P M I + 5% F B S + P M A 10 ng/mlおよびイオノマイシン0.5 μg/ml（Calbiochem）中で37℃で13時間インキュベートすることにより、C D 3 + 選定ヒトT細胞を活性化した。これらの活性化C D 3 + 選定ヒトT細胞からの上清を、下記のようにZalphi11活性に関して検定した。

【0201】

D. B a F 3 /Zalphi11細胞および Alamar Blue増殖検定を用いたZalphi11活性に関する活性化C D 3 + 選定ヒトT細胞からの上清の検定

B a F 3 /Zalphi11細胞を遠心分離して、m I L - 3 無含有培地中で洗浄した。細胞を遠心分離して、3回洗浄し、m I L - 3 を確実に除去した。次に細胞を血球計で計数した。細胞を、m I L - 3 無含有培地を用いて、100 μl / ウエルの容量で、5000細胞 / ウエルで96ウェルフォーマットでプレート化した。

【0202】

m I L - 3 無含有培地で50 %、25%、12.5%、6.25%、3.125%、1.5%、0.75%および0.375%濃度に希釈した活性化C D 3 + 選定ヒトT細胞（前記実施例8 C 参照）からコンディショニング培地を用いて、B a F 3 /Zalphi11細胞の増殖を査定した。100 μlの希釈状態調節培地をB a F 3 /Zalphi11細胞に付加した。全検定容量は200 μlである。検定プレートを前記の実施例8 Bと同様にインキュベートし、検定した。

【0203】

結果は、活性化C D 3 + 選定ヒトT細胞状態調節培地中に存在する因子に対するB a F 3 /Zalphi11細胞の増殖応答を確証した。測定されたように、応答は、50%濃度でのバックグラウンドの約10倍であった。B a F 3 野生型細胞はこの因子に応答して増殖せず、これは、この因子がZalphi11受容体に特異的であることを示す。

【0204】

実施例9

z a l p h a 1 1 可溶性レセプター；z a l p h a 1 1 C E E、z a l p h a 1 1 C F L G、z a l p h a 1 1 C H I S 及びz a l p h a 1 1 - F c 4 を発現する哺乳動物発現ベクターの構築

A. z a l p h a 1 1 C E E、z a l p h a 1 1 C F L G 及びz a l p h a 1 1 C H S を含むz a l p h a 1 1 哺乳動物発現ベクターの構築

z a l p h a 1 1 ポリペプチドの可溶性細胞外ドメインの発現のため、発現ベクターp C 4 z a l p h a 1 1 C E E を調製した。ここで、この構築体は推定開始メチオニンを含んで成り、推定トランスメンブランドメインの隣りでトランスケーショされ、そしてC - 末端G l u - G l u タグを有するz a l p h a 1 1 ポリペプチドを発現するようにデザインされている（S E Q I D N O : 4 1 ）。

【0205】

7 0 0 b p の P C R 構築z a l p h a 1 1 D N A フラグメントをP C R プライマーとしてZ C 1 9 , 9 3 1 （S E Q I D N O : 4 2 ） 及びZ C 1 9 , 9 3 2 （S E Q I D N O : 4 3 ） を用いて構築し、A s p 7 1 8 及びB a m H I 制限部位を付加した。z a l p h a 1 1 レセプターc D N A を含むプラスミドを鋳型として用いた。z a l p h a 1 1 フラグメントのP C R 増幅は下記の通りに実施した。9 4 ° C 、 0 . 5 分を2 5 サイクル；9 4 ° C を1 0 秒、5 0 ° C 3 0 秒、6 8 ° C を4 5 秒を5 サイクル；次いで4 ° C に維持。反応体はクロロホルム / フェノール抽出及びイソプロパノール沈殿により精製し、そしてA s

10

20

30

40

50

p718及びBamHI (Gibco BRL)でその製造者のプロトコールに従って消化した。推定サイズ700bpのバンドを1%のアガロースゲル電気泳動により目視化し、切り出し、そしてQiaexII (商標) 精製システム (Qiagen) を利用し、その製造者の仕様書に従って精製した。

【0206】

切り出したDNAをBamHI及びAsp718で切断したプラスミドpC4EEにサブクローニングした。pC4zalpha11CEE発現ベクターは天然zalphaIIシグナルペプチドを利用し、そしてGlu-Gluタグ (SEQ ID NO: 41) をzalpha11ポリペプチドコードポリヌクレオチド配列のC末端に付加する。プラスミドpC4EEはマウスメタロチオネイン-1プロモーター、コード配列の挿入のための多重制限部位、停止コドン及びヒト成長ホルモントミネーターを有する発現カセットを含む哺乳動物発現ベクターである。このプラスミドは更にE. コリ複製起点、SVプロモーター、エンハンサー及び複製起点を有する哺乳動物選択マーカー発現ユニット、DHFR遺伝子及びSV40ターミネーターを有する。

【0207】

約30ngの制限消化zalpha11インサート及び約12ngの消化ベクターを16℃で一夜かけてライゲーションした。1μlの各ライゲーション反応体を個別のDH10Bコンピテント細胞 (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) の中に製造者の指示に従ってエレクトロポレーションし、そして50mg/mlのアンプシリンを含むLBプレート上にプレーティングし、そして一夜インキュベーションした。コロニーを2mlの個々のコロニーの液体を培養物から調製したDNAの制限分析によりスクリーニングした。陽性クローンのインサート配列を配列分析に確認した。大量スケールプラスミド調製をQIAGEN (登録商標) Maxi prepキット (Qiagen) を用い、製造者の仕様書に従って行った。

【0208】

一列に並んだ6個のHis残基から成るC末端histag、及びC末端フラグ (SEQ ID NO: 49) タグ、zalpha11CFLAGを有するzalpha11可溶性レセプターを調製するために同じ手順を利用した。これらの構築体を構築するため、上記のベクターはglu-gluタグ (SEQ ID NO: 4) の代わりにHIS又はFLAG (登録商標) のいずれかを有する。

【0209】

B. 可溶性zalpha11レセプターzalpha11-Fc4の哺乳動物発現構築zalpha11をコードするポリヌクレオチド全体又は一部を含む発現プラスミドを相同組換えを介して構築した。zalpha11レセプターの細胞外ドメイン由来のポリヌクレオチド配列を含むzalpha11cDNAのフラグメントをPCRを利用して単離した。zalpha11フラグメントの製造に用いた2つプライマーは：(1) 各々が5'から3'末端にかけて：40bpのベクターフランキング配列 (インサートの5') 及びzalpha11細胞外ドメインの5'末端と対応する17bp (SEQ ID NO: 44) を含むPCR用プライマー；並びに(2) 40bpのFc4ポリヌクレオチド配列の5'末端 (SEQ ID NO: 45) 及びzalpha11細胞外ドメインの3'末端と対応する17bp (SEQ ID NO: 46) とした。zalpha11との融合のためのFc4のフラグメントは同じようにしてPCRにより作った。Fc4フラグメントの製造に利用した2つのプライマーは：(1) zalpha11細胞外ドメインの3'末端から40bpの配列及びFc4の5'末端の17bp (SEQ ID NO: 47) から成る5'プライマー；並びに(2) ベクター配列の40bp (インサートの3') 及びFc4の3'末端の17bp (SEQ ID NO: 48) から成る3'プライマー；とした。

【0210】

上記の各々の反応のPCR増幅は下記の通りにして実施した：94℃、2分を1サイクル；94℃で30秒、60℃で30秒、72℃で1分を25サイクル；72℃で5分を1サ

10

20

30

40

50

イクル；次いで4℃で保持。100μlのPCR反応物のうち10μlを分析のために0.8%のLMPアガロースゲル（Seaplaque GTG）上に1×TBEバッファで泳動させた。残りの90μlの反応物は5μlの1MのNaCl及び250μlの無水エタノールの添加により沈殿させた。使用した発現ベクターはプラスミドpCZR199（American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209に寄託され、No. 98668と番号付与されている）とし、そしてSmaI（BRL）で切った。この発現ベクターはプラスミドpCZR199に由来し、そしてCMV即時初期プロモーター、マウスイムノグロブリン重鎖座の可変領域由来の共通イントロン、コード配列の挿入のための多重制限部位、停止コドン及びヒト成長ホルモンターミネーターを有する発現カセットを含む。この発現ベクターはE. コリ複製起点、SV40プロモーター、エンハンサー及び複製起点を有する哺乳動物選択マーカー発現ユニット、DHFR遺伝子及びSV40ターミネーターを有する。使用した発現ベクターはpCZR199から、メタロチオネインプロモーターのCMV即時初期プロモーターとの置換により構築した。

10

【0211】

100μlのコンピテント酵母細胞（*S. cerevisiae*）を約1mgずつのzalpha11及びFc4インサートを含む10μl並びに100ngのSmaI（BRL）消化発現ベクターと合わせ、そして0.2cmのエレクトロポレーションキュベットに移した。酵母／DNA混合物を0.75kV（5kV/cm）、「無限」ohm、25μFでエレクトロパルスした。各キュベットに600μlの1.2Mのソルビトールを加え、そして酵母を2つの300μlのアリコートにわけて2枚のURA-Dプレートに載せ、そして30℃でインキュベーションした。

20

【0212】

48時間後、一枚のプレートに由来するUra+酵母形質転換体を1mlのH₂Oに再懸濁し、そして軽く遠心分離して酵母細胞をペレットにした。この細胞ペレットを1mlの溶解バッファ（2%のTriton X-100、1%のSDS、100mMのNaCl、10mMのトリス、pH8.0、1mMのEDTA）に再懸濁した。500μlのこの溶解混合物を300μl、酸洗浄ガラスビーズ及び200μlのフェノールクロロホルムを含むエッペンドルフチューブに入れ、1分の間隔で2又は3回ボルテックスにかけ、次いでエッペンドルフ遠心機で最大スピードで5分遠心分離した。300μlの水性相を新鮮なチューブに移し、そしてDNAを600μlのエタノール（EtOH）で沈殿させ、次いで4℃で10分遠心分離した。このDNAペレットを100μlのH₂Oに再懸濁した。

30

【0213】

エレクトロコンピテントE. コリ細胞（DH10B、Gibco BRL）の形質転換は0.5～2mlの酵母DNAプレップ及び40μlのDH10B細胞で行った。細胞を2.0kV、25mF及び400ohmでエレクトロパルスした。エレクトロポレーションの後、1mlのSOC（2%のBactoe Tryptone（Difco, Detroit, MI）、0.5%の酵母エキス（Difco）、10mMのNaCl、2.5mMのKCl、10mMのMgCl₂、10mMのMgSO₄、20mMのグルコース）を250μlのアリコートで4枚のLB AMPプレート（LBブロス（Lennox）、1.8%のBacto Agar（Difco）、100mg/Lのアンプシリン）にまいた。

40

【0214】

zalpha11-Fc4についての適正な発現構築体を保有する個々のクローンを制限消化により固定し、zalpha11-Fc4の存在を確認し、且つ様々なDNA配列が互いと連結し合ったかを確認した。陽性クローンのインサートを配列分析にかけた。大量スケールプラスミドDNAはQiagen Maxiキット（Qiagen）を利用し、製造者の仕様に従って単離した。

50

【0215】

実施例10

Zal p h a 1 1可溶性レセプターポリペプチドのトランスフェクションおよび発現
27継代のBHK 570細胞(ATCC No. CRL-10314)を 1.2×10^6 細胞/穴(6穴プレート)で、800 μ lの血清を含まない(SF) DMEM培地(D
MEM, Gibco/BRL High Glucose)(Gibco BRL, G
a i t h e r s b u r g, MD)中で培養した。細胞を、Lipofectin(商標)
(Gibco BRL)を用い、血清を含まない(SF) DMEM中で、上述のzal p
h a 1 1 C E E / C F L G / C H I Sを含む発現プラスミドでトランスフェクションした
。zal p h a 1 1 C E E / C F L G / C H I Sのそれぞれ3マイクログラムを別々に1
。5mlチューブ中で全最終容積100 μ lのSF DMEMまで希釈した。別々なチュ
ープ中で、15 μ lのLipofectin(商標)(Gibco BRL)を100 μ
lのSF DMEMと混合した。Lipofectin(商標)ミックスを室温で30~
45分培養し、DNAミックスを加えて室温で約10~15分培養した。

10

【0216】

全DNA:Lipofectin(商標)混合物を培養した細胞に加え、それらに均一に
分配した。細胞を37℃で約5時間培養し、最終容積30mlのDMEM/5%ウシ胎仔
血清(FBS)(Hyclone, Logan, UT)で別々な150mm MAMIプ
レートに移した。プレートを37℃、5%CO₂で終夜培養し、翌日DNA:Lipof
e c t i n(商標)混合物を選択培地(1 μ Mメトトレキサート(MTX)を含む5%F
B S / D M E M)と交換した。

20

【0217】

トランスフェクション後約10~12日に、プレートを10ml SF DMEMで洗浄
した。洗浄媒体を吸引し7.25mlの血清を含まないDMEMと交換した。SF DM
EMに予備浸漬した滅菌済みテフロン網(Spectrum Medical Ind
u s t r i e s, L o s A n g e l e s, C A)をクローン細胞コロニーの上に置いた
。SF DMEMに予備浸漬した滅菌済みニトロセルロースフィルターを網の上に置いた
。ニトロセルロースの方向付けマークを培養皿に移した。プレートを37℃、5%CO₂
のインキュベーター中で5~6時間インキュベーションした。

30

【0218】

インキュベーションの後、フィルター/網を除去し、培地を吸引して1 μ MのMTXを含
む5% FBS/DMEMと交換した。10%脱脂粉乳/Western Aバッファー
(Western A:50mM Tris pH7.4, 5mM EDTA, 0.05
%NP-40, 150mM NaClおよび0.25%ゼラチン)中で、回転震盪器を用
い15分間室温でフィルターをブロックした。フィルターを、それぞれ抗-Glu-Glu
、anti-FLAGまたは抗-HIS抗体-HRPコンジュゲートとともに、2.5
%脱脂粉乳/Western Aバッファー中で、回転震盪器を用い1時間室温で培養し
た。フィルターを室温で、各洗浄毎5~10分間Western Aで3回洗浄した。フ
ィルターをultra ECL試薬(Amersham Corp., Arlington
H e i g h t s, I L)でメーカーの指示どおり現像し、Lumi-Imager(
R o c h e C o r p.)上に映像化した。

40

【0219】

正の発現クローンコロニーを機械的に12穴プレートの5 μ M MTXを含む5%FCS
/DMEMの1ml中に拾って移し、集密まで成長させた。コンディショニング済み培地
試料を、SDS-PAGEおよびWestern分析により発現レベルについて試験した
。各コンストラクトについて最も高い3つの発現クローンを拾った。3つのうち2つは
バックアップとして凍結し、1つをマイコプラズマ試験および大規模工場播種のために展開
した。

【0220】

B. 可溶性zal p h a 1 1レセプターzal p h a 1 1 - F c 4の哺乳類発現

50

BHK 570細胞(ATCC No:CRL-10314)を10cm細胞培養皿で培養し、DMEM/FBS培地(DMEM, Gibco/BRL High Glucose, (Gibco BRL, Gaithersburg, MD)、5%ウシ胎仔血清(Hyclone, Logan, UT)、1mM L-グルタミン(JRH Biosciences, Lenexa, KS)、1mMピルビン酸ナトリウム(Gibco BRL)中で、37℃、5%CO₂で終夜約50~70%の集密度まで成長させた。次いで細胞を、血清を含まない(SF)培地配合物(DMEM, 10mg/mgトランスフェリン, 5mg/mlインシュリン, 2mg/mlフェチュイン, 1%L-グルタミンおよび1%ピルビン酸ナトリウム)中で、Lipofectamine(商標)(Gibco BRL)を用い、zalpha11-Fc4(実施例9参照)を含むプラスミドでトランスフェクションした。zalpha11-Fc4を含むプラスミドを15mlチューブ中で、SF培地で全最終容積640mlに希釈した。35mlのLipofectamine(商標)(Gibco BRL)を605mlのSF培地と混合した。Lipofectamine(商標)ミックスをDNAミックスに加え、室温で約30分間培養した。5mlのSF培地をDNA:Lipofectamine(商標)混合物に加えた。細胞を5mlのSF培地で1回すすぎ、吸引して、DNA:Lipofectamine(商標)混合物を加える。細胞を37℃で5時間培養し、次いで6.4mlのDMEM/10%FBS, 1%PSN培地を各プレートに加えた。プレートを37℃で終夜培養し、翌日DNA:Lipofectamine(商標)混合物を新鮮な5%FBS/DMEM培地と交換した。トランスフェクション後2日目に、細胞を、150mmプレート中の選択培地(上記のDMEM/FBS培地に1mMメトトレキセート(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)を加えたもの)中に1:10, 1:20および1:50で分割した。細胞上の培地はトランスフェクション後5日目に新鮮な選択培地と交換した。トランスフェクション後約10日目に、各トランスフェクションからのメトトレキセート耐性コロニーの150mm培養皿2つをトリプシン処理し、細胞をT-162フラスコに溜めて培養し、大規模培養へと移した。

【0221】

実施例11

BHK570細胞からのzalpha11可溶性レセプターの精製

A. BHK570からのzalpha11CEEポリペプチドの精製

特に記さない限り、全ての操作は4℃で行った。以下の手順により、C-末端GluGlu(EE)タグを含むzalpha11ポリペプチドを精製した。細胞工場コンディショニング済み培地30リットルを、ProFlux A30でAmicon S10Y3らせん型カートリッジを用い1.6リットルに濃縮した。プロテアーゼインヒビター溶液を、トランスフェクションされたBHK570細胞から得た(実施例10参照)濃縮された1.6リットルの細胞工場コンディショニング済み培地に加え、最終濃度を2.5mMのエチレンジアミン四酢酸(EDTA, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO)、0.003mMのロイペプチン(Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN)、0.001mMのペプスタチン(Boehringer-Mannheim)および0.4mMのPefabloc(Boehringer-Mannheim)とした。試料を分析のために除き、大部分を、精製を始めるまで-80℃で凍結した。濃縮された細胞工場コンディショニング済み培地の全標的タンパク質濃度は、SDS-PAGEまたは抗-EE HRP複合抗体を用いたウェスタンブロット分析により決定した。

【0222】

100mlカラムの抗-EE G-Sepharose(以下で述べるように調製)を、Waters AP-5、5cm×10cmガラスカラムに注いだ。カラムをフローバックし、BioCad Sprint(PerSeptive Biosystems, Framingham, MA)でpH7.4のリン酸緩衝食塩水(PBS)と平衡化した。濃縮された細胞工場コンディショニング済み培地を解凍し、0.2ミクロン滅菌済みフィ

10

20

30

40

50

ルターに通し、pHを7.4に調整し、次いで1ml/分の流量で終夜カラムに充填した。カラムを、10カラム体積(CVs)のリン酸緩衝食塩水(PBS, pH7.4)で洗浄し、5ml/分で0.5mg/ml EEペプチド(Anaspec, San Jose, CA)を含むPBS(pH6.0)の200mlでプラグ溶出させた。使用したEEペプチドは、配列EYMPME(SEQ ID NO:41)を有する。カラムを10カラム体積のPBSで洗浄し、5カラム体積の0.2MグリシンpH3.0で溶出した。グリシン溶出カラムのpHを2カラム体積の5X PBSで7.0に調整し、PBS(pH7.4)中で平衡化した。溶出クロマトグラフィー全体にわたり5mlのフラクションを集め、280および215nmでの吸光度をモニターした。通過液および洗浄用液体も取っておき分析した。EEポリペプチド溶出ピークフラクションを、SDS-PAGE銀染色および抗-EE HRP複合抗体を用いたウェスタンブロットにより、標的タンパク質について分析した。目的とするポリペプチド溶出フラクションを溜め、10,000ダルトン分子量カットオフ膜スピン濃縮器(Millipore, Bedford, MA)を用いメーカーの指示に従い60mlから5.0mlに濃縮した。

【0223】

z alpha 11CEEとともに精製された他のタンパク質から分離するため、濃縮ポリペプチド溶出液を溜めたフラクションを、pH8.0でPOROS HQ-50(PerSeptive Biosystems, Framingham, MAの強アニオン交換樹脂)にかけた。1.0×6.0cmカラムを注ぎ、BioCad Sprintでフローパックした。カラムに対しイオンを充填し、20mM Tris pH8.0(トリス(ヒドロキシメチルアミノメタン))で平衡化した。試料を1:13に希釈し(PBSのイオン強度を下げるため)、次いでPoros HQカラムに5ml/分で充填した。カラムを10カラム体積の20mM Tris pH8.0で洗浄し、10ml/分で20mM Tris/1M 塩化ナトリウム(NaCl)の40カラム体積勾配で溶出した。溶出クロマトグラフィー全体にわたり1.5mlのフラクションを集め、280および215nmでの吸光度をモニターした。溶出ピークフラクションを、SDS-PAGE銀染色で分析した。目的とするフラクションを溜め、10,000ダルトン分子量カットオフ膜スピン濃縮器(Millipore, Bedford, MA)を用いメーカーの指示に従い1.5~2.0mlに濃縮した。

【0224】

z alpha 11CEEポリペプチドを遊離EEペプチドおよび同時に精製される汚染性のタンパク質から分離するため、溜めておいた濃縮フラクションを、BioCad sprintを用い、PBSで平衡化しそれを充填してある1.5×90cm Sephadex S200(Pharmacia, Piscataway, NJ)カラムのカラムクロマトグラフィーに1.0ml/分でかけた。溶出クロマトグラフィー全体にわたり1.5mlのフラクションを集め、280および215nmでの吸光度をモニターした。ピークフラクションを、SDS-PAGE銀染色でキャラクタリゼーションし、最も純粋なフラクションのみを集めた。この物質は、z alpha 11CEEポリペプチドを表している。

【0225】

最後に、残存するエンドトキシンを除くため、この精製された物質を4ml ActiClean Ettox(Sterogene)カラムにかけた。試料を、PBSで平衡化したグラビティーカラムに4回通し、次いでカラムを3mlのPBSで洗浄しそれを「浄化された」試料とともに溜めた。前記物質を、0.2ミクロン滅菌済みフィルターに通し、小分けするまで-80℃で保存した。

【0226】

ウェスタンブロットを行ったクマジーブルーおよび銀染色SDS-PAGEゲル上で、z alpha 11CEEポリペプチドは、見かけの分子量50,000ダルトンの単一の主要なバンドであった。このバンドの移動性は、還元性および非還元性ゲルで同じであった。

10

20

30

40

50

【0227】

精製された物質のタンパク質濃度は、BCA分析（Pierce, Rockford, IL）により決定し、タンパク質を等分し、発明者らの標準手順により -80°C で保存した。このタンパク質はIEF（等電収束）ゲル上で4.5未満のPIで移動する。zalphal1CEEポリペプチドの濃度は 1.0mg/ml であった。

【0228】

精製されたzalphal1CEEポリペプチドをウサギへの注射用に調製し、抗体製造のためR&R Research and Development（Stanwood, WA）に送った。ウサギに注射し、抗-huzalphal1-CEE-BHK血清（以下の実施例15）を製造した。

10

【0229】

抗-EE Sepharoseを調製するため、 100ml 床容積のプロテインG-Sepharose（Pharmacia, Piscataway, NJ）を、 500ml のNalgene 0.45ミクロンフィルターユニットを用いて、0.02%のアジ化ナトリウムを含むPBS 100ml で3回洗浄した。ゲルを、6容積の 200mM のトリエタノールアミンpH8.2（TEA, Sigma, St. Louis, MO）で洗浄し、 900mg の抗体を含む等容積のEE抗体溶液を添加した。 4°C で終夜培養後、未結合の抗体を、上述のとおり 200mM のTEA 5容積で樹脂を洗浄することにより除いた。樹脂を2容積のTEA中に再懸濁し、適当な容器に移し、TEAに溶解しているジメチルピミリミデート- 2HCl （Pierce, Rockford, IL）を加えて、プロテインG-Sepharoseゲルの最終濃度を 36mg/ml にした。ゲルを室温で45分間震盪し、上述のとおりフィルターユニットを用いて液体を除いた。ゲル上の非特異的部位を、 200mM のTEA中の 20mM エタノールアミン5容積により室温で10分間培養することによりブロックした。0.02%のアジ化ナトリウムを含む5容積のPBSでゲルを洗浄し、この溶液中に 4°C で保存した。

20

【0230】

B. BHK570から得たzalphal1CFLAGポリペプチドの精製
特に断りのない限り、全ての操作は 4°C で行った。以下の手順により、C末端FLAG（FLAG）（Sigma-Aldrich Co.）タグを含むzalphal1ポリペプチドを精製した。30リットルの細胞工場コンディショニング済み培地をProFlux A30でAmicon S10Y3らせん型カートリッジを用い1.7リットルに濃縮した。プロテアーゼインヒビター溶液を、トランスフェクションされたBHK570細胞から得た（実施例10参照）濃縮された細胞工場コンディショニング済み培地1.7リットルに加え、最終濃度を 2.5mM のエチレンジアミン四酢酸（EDTA, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO）、 0.003mM のロイペプチン（Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN）、 0.001mM のペプスタチン（Boehringer-Mannheim）および 0.4mM のPefabloc（Boehringer-Mannheim）とした。試料を分析のために除き、大部分を、精製を始めるまで -80°C で凍結した。細胞工場コンディショニング済み培地の全標的タンパク質濃度は、SDS-PAGEおよび抗-FLAG（Kodak）HRP複合抗体を用いたウェスタンブロット分析により決定した。 125ml カラムの抗-FLAG M2-Agaroseアフィニティーゲル（Sigma-Aldrich Co.）を、Waters AP-5、 $5\text{cm}\times 10\text{cm}$ ガラスカラムに注いだ。カラムをフローバックし、BioCad Sprint（PerSeptive Bio Systems, Framingham, MA）でpH7.4のリン酸緩衝食塩水（PBS）と平衡化した。濃縮された細胞工場コンディショニング済み培地を解凍し、 0.2ミクロン 滅菌済みフィルターに通し、pHを7.4にコンディショニングし、次いで 1ml/分 の流量で終夜カラムに充填した。カラムを、10カラム体積（CVs）のリン酸緩衝食塩水（PBS, pH7.4）で洗浄し、 5ml/分 で 0.5mg/ml のFLAG（Sigma-Aldrich Co.）ペプチドを含むPBS（pH6.0）の 250ml

30

40

50

でプラグ溶出させた。使用したFLAGペプチドは、配列DYKDDDDK (SEQ ID NO: 49) を有している。カラムを10カラム体積のPBSで洗浄し、5カラム体積の0.2MグリシンpH3.0で溶出した。グリシン溶出カラムのpHを2カラム体積の5X PBSで7.0にコンディショニングし、PBS (pH7.4) 中で平衡化した。溶出クロマトグラフィー全体にわたり5mlのフラクションを集め、280および215nmでの吸光度をモニターした。通過液および洗浄用液体も取っておき分析した。FLAGポリペプチド溶出ピークフラクションを、SDS-PAGE銀染色およびanti-FLAG HRP複合抗体を用いたウェスタンブロットにより、目標タンパク質について分析した。目的とするポリペプチド溶出フラクションを溜め、10,000ダルトン分子量カットオフ膜スピン濃縮器 (Millipore, Bedford, MA) を用いメーカーの指示に従い80mlから12mlに濃縮した。

10

【0231】

zalpha11CFLGとともに精製された他のタンパク質から分離するため、ポリペプチド溶出を溜めたフラクションを、pH8.0でPOROS HQ-50 (PerSeptive Biosystems, Framingham, MAの強アニオン交換樹脂) にかけた。1.0×6.0cmカラムを注ぎ、BioCad Sprintでフローバックした。カラムに対イオンを充填し、20mM Tris pH8.0 (トリス (ヒドロキシメチルアミノメタン)) で平衡化した。試料を1:13に希釈し (PBSのイオン強度を下げるため)、次いでPoros HQカラムに5ml/分で充填した。カラムを10カラム体積の20mM Tris pH8.0で洗浄し、10ml/分で20mM Tris/1M 塩化ナトリウム (NaCl) の40カラム体積勾配で溶出した。溶出クロマトグラフィー全体にわたり1.5mlのフラクションを集め、280および215nmでの吸光度をモニターした。溶出ピークフラクションを、SDS-PAGE銀染色で分析した。目的とするフラクションを溜め、10,000ダルトン分子量カットオフ膜スピン濃縮器 (Millipore, Bedford, MA) を用いメーカーの指示に従い1.5~2.0mlに濃縮した。

20

【0232】

zalpha11CFLGポリペプチドを遊離FLAGペプチドおよび同時に精製される汚染性のタンパク質から分離するため、溜めておいた濃縮フラクションを、BioCad Sprintを用い、PBSで平衡化しそれを充填してある1.5×90cm Sephacryl S200 (Pharmacia, Piscataway, NJ) カラムのカラムクロマトグラフィーに1.0ml/分でかけた。溶出クロマトグラフィー全体にわたり1.5mlのフラクションを集め、280および215nmでの吸光度をモニターした。ピークフラクションを、SDS-PAGE銀染色でキャラクタリゼーションし、最も純粋なフラクションのみを集めた。この物質は、zalpha11CFLGポリペプチドを表している。

30

【0233】

最後に、残存するエンドトキシンを除くため、この精製された物質を4ml ActiClean EtOX (Sterogene) カラムにかけた。試料を、PBSで平衡化したグラビティーカラムに4回通し、次いでカラムを3mlのPBSで洗浄しそれを「浄化された」試料とともに溜めた。前記物質を、0.2ミクロン滅菌済みフィルターに通し、小分けするまで-80℃で保存した。

40

【0234】

ウェスタンブロットを行ったクマジーブルーおよび銀染色SDS-PAGEゲル上で、zalpha11CFLGポリペプチドは、見かけの分子量50,000ダルトンの単一の主要なバンドであった。このバンドの移動性は、還元性および非還元性ゲルで同じであった。

【0235】

精製された物質のタンパク質濃度は、BCA分析 (Pierce, Rockford, IL) により決定し、タンパク質を小分けし、発明者らの標準手順により-80℃で保存し

50

た。このタンパク質は、IEF（等電収束）ゲル上で4.5未満のPIで移動する。zalphal1CFLGポリペプチドの濃度は1.2mg/mlであった。

【0236】

C. トランスフェクションされたBHK 570細胞から得たzalphal1-Fc4ポリペプチドの精製

特に断りのない限り、全ての操作は4℃でおこなった。以下の操作により、ヒトIgG/Fc（zalphal1-Fc4；実施例8および9）へのC末端融合を含むzalphal1ポリペプチドを精製した。zalphal1-Fc4（実施例10）でトランスフェクションしたBHK 570細胞から得た12,000mlのコンディショニング済み培地を、0.2mm滅菌フィルターに通して濾過し、プロテアーゼインヒビターの溶液を補い、最終濃度を0.001mMのロイペプチン（Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN）、0.001mMのペプスタチン（Boehringer-Mannheim）および0.4mMのPefabloc（Boehringer-Mannheim）とした。プロテインGセファロース（6ml床容積、Pharmacia Biotech）を詰め、500ml PBS（Gibco/BRL）で洗浄した。補われたコンディショニング済み培地を10ml/分の流量でカラムに通し、その後1000ml PBS（BRL/Gibco）で洗浄した。zalphal1-Fc4を0.1MのグリシンpH3.5でカラムから溶出させ、2mlのフラクションを直接0.2mlの2M Tris pH8.0中に集め、フラクション中の最終pHを7.0に調整した。

【0237】

溶出したフラクションを、SDS-PAGEおよび抗ヒトFc（Amersham）抗体を用いたウェスタンブロットでキャラクタリゼーションした。還元性SDS-PAGEゲルのウェスタンブロット分析は、フラクション2～10中の80,000kDaの免疫反応性プロテインを示した。銀染色SDS-PAGEゲルも、フラクション2～10中の80,000kDa zalphal1:Fcポリペプチドを示した。フラクション2～10を集めた。

【0238】

集めたフラクションのタンパク質濃度は、BCA分析（Pierce, Rockford, IL）により決定し、前記物質を小分けし、発明者らの標準手順により-80℃で保存した。集めたフラクションの濃度は0.26mg/mlであった。

【0239】

実施例12

拮抗的阻害アッセイにおけるzalphal1可溶性レセプターzalphal1CEE, zalphal1CFLGおよびzalphal1-Fc4（突然変異体）を用いるアッセイ

BaF3/Zalphal1細胞をスピンドウンし、mIL-3無含有培地中で洗浄した。細胞をスピンし3回洗浄して確実にmIL-3を除去した。次いで細胞をヘマサイトメーターで計測した。mIL-3無含有培地を用い、穴あたり100μlの容積に穴あたり5000細胞で、細胞を96穴フォーマットに培養した。

【0240】

サル脾臓細胞活性化および上記の実施例8で記載したCD3+選択細胞からの両培地を、10μg/mlのzalphal1可溶性レセプター（CEE, C-フラッグおよびFc4構築体；実施例10および11参照）のある条件とない条件で、50%、25%、12.5%、6.25%、3.125%、1.5%、0.75%および0.375%の濃度で別々の実験に添加した。全アッセイ容積は200μlであった。

【0241】

アッセイプレート（37℃、5%CO₂で3日間培養し、Alamar Blue（Accumed）を20μl/穴で加えた。プレートを再び、37℃、5%CO₂で24時間培養した。上述のとおり（実施例5）、プレートをFmax（商標）プレートリーダー（

10

20

30

40

50

Molecular Devices) で読んだ。その結果は、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ での異なる $\alpha 11$ 可溶性レセプター構築体のそれぞれからの細胞成長の完全な阻害を示し、各試料中の因子が $\alpha 11$ レセプターに特異的であることを確認した。

【0242】

可溶性レセプターを希釈した滴定曲線も上述のアッセイを用いて行った。 $\alpha 11$ CEEおよび $\alpha 11$ CFLG可溶性 $\alpha 11$ レセプターは、 $20 \text{ ng}/\text{ml}$ の低濃度で成長を完全に阻害できた。突然変異体 $\alpha 11$ -Fc4可溶性 $\alpha 11$ レセプターは $1.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ でやと同様の効果を示した。

【0243】

実施例 13

大腸菌中でのヒト $\alpha 11$ の発現

A. $\alpha 11$ /MBP-6H融合ポリペプチドを発現する発現ベクター pCZR225の構築

マルトース結合タンパク質 (MBP) にC末端で融合しているヒト $\alpha 11$ 可溶性レセプターをコードするポリヌクレオチドを含む発現プラスミドを相同的組換えにより構築した。MBP- $\alpha 11$ 可溶性レセプター融合ポリペプチドのポリヌクレオチド配列は、配列番号50に示されており、対応するタンパク質配列は配列番号51に示されている。実施例14において $\alpha 11$ /MBP-6Hと呼ばれる融合ポリペプチドは、ヒト $\alpha 11$ 可溶性レセプター (配列番号51のアミノ酸389 (Cys) からアミノ酸606 (His)) に融合したMBP部分 (配列番号51のアミノ酸1 (Met) からアミノ酸388 (Ser)) を含む。ヒト $\alpha 11$ cDNA (配列番号52) のフラグメントを、PCRを用いて単離した。PCR反応においてヒト $\alpha 11$ フラグメントの製造に2つのプライマーを用いた。(1) 40bpのベクターフランキンク配列およびヒト $\alpha 11$ のアミノ末端に対応する25bpを含むプライマー ZC20, 187 (配列番号53) ならびに (2) フランキンクベクター配列に対応する3'末端の40bpおよびヒト $\alpha 11$ のカルボキシ末端に対応する25bpを含むプライマー ZC20, 185 (配列番号54) である。PCR反応条件は以下のとおりである。94℃で30秒間、50℃で30秒間、72℃で1分間25サイクル; その後4℃で浸漬、複製運転である。100 μl のPCR反応物の2 μl を、1×TBS緩衝液を含む1.0%アガロースゲルに流して分析し、予想された660bpのフラグメントが見られた。残りの90 μl のPCR反応物を、400 μl 無水エタノールで沈殿した第2のPCRチューブと合わせた。沈殿したDNAは、Sma切断したレシピエントベクター pTAP98への組み換えに使用し、以下のとおりMBP- $\alpha 11$ 融合をコードする構築体を作った。

【0244】

プラスミド pTAP98を、プラスミド pRS316および pMAL-c2から誘導した。プラスミド pRS316は、Saccharomyces cerevisiae シャトルベクター (Hieter P. and Sikorski, R., Genetics 122:19-27, 1989) である。p-MAL-C2は (NEB)、E. Coli 発現プラスミドである。これは、MalE (MBPをコードする遺伝子) を駆動するタックプロモーターを担持し、その後にHisタグ、トロンピン開裂部位、クローニング部位およびrrnBターミネーターがある。ベクター pTAP98は、酵母相同的組み換えを用いて構築した。100 ngのEcoRI切断 pMAL-c2を、1 μg のPvuI切断 pRS316、1 μg のリンカーおよび1 μg のScal/EcoRI切断 pRS316で組み換えた。前記リンカーは、PCR反応で結合させたオリゴ ZC19, 372 (配列番号55) (100 pmol); ZC19, 351 (配列番号56) (1 pmol); ZC19, 352 (配列番号57) (1 pmol) および ZC19, 371 (配列番号58) (100 pmol) からなっていた。PCR反応条件は以下のとおりである。94℃で30秒間、50℃で30秒間、72℃で30秒間10サイクル; その後4℃で浸漬である。PCR生成物を100%エタノール沈殿により濃縮した。

10

20

30

40

50

【0245】

コンピテント酵母細胞 (*S. cerevisiae*) 100マイクロリットルを、上記のヒト α 11レセプターPCR生成物約1 μ gおよびSma I消化pTAP98ベクター100ngを含む混合物10 μ lと混合し、0.2cmエレクトロポレーションキュベットに移した。酵母/DNA混合物を、0.75kV (5kV/cm)、無限オーム、25 μ Fで電気パルスを加えた。各キュベットに、1.2Mソルビトール600 μ lを加え、次いで酵母を2つのURA⁻Dプレート上の2つの300 μ lずつに分け、30℃でインキュベーションした。

【0246】

約48時間後に、1つのプレートからのUra⁺酵母形質転換体を1ml H₂Oに再懸濁させ、短時間スピンして酵母細胞をペレットにした。細胞ペレットを1mlの溶解緩衝液 (2% Triton X-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris, pH8.0, 1mM EDTA) に再懸濁した。溶解混合物500マイクロリットルを、300 μ lの酸洗浄済みガラスビーズおよび200 μ lのフェノールクロロホルムを含むエッペンドルフチューブに加え、1分間隔で2, 3回渦を作って攪拌し、エッペンドルフ遠心分離器内で最大スピードで5分間スピンした。水層300 μ lを新しいチューブに移しDNAを600 μ lエタノール (EtOH) で沈殿させ、4℃で10分間遠心分離した。DNAペレットを100 μ lのH₂Oに再懸濁した。

【0247】

エレクトロコンピテント *E. coli* 細胞 (MC1061, Casadaban et al., J. Mol. Biol. 138, 179-207) の形質転換を、1 μ lの酵母DNAプレップおよび40 μ lのMC1061細胞で行った。細胞に、2.0kV、25 μ Fおよび400オームで電気パルスを加えた。電気穿孔の後、0.6mlのSOC (2% Bacto (商標) Tryptone (Difco, Detroit, MZ), 0.5%の酵母エキス (Difco)、10mMのNaCl, 2.5mMのKCl, 10mMのMgCl₂, 10mMのMgSO₄, 20mMのグルコース) を、MM/CA+AMP 100mg/Lプレートに1つとして加えた (Pryor and Leiting, Protein Expression and Purification, 10:309-319, 1997)。

【0248】

ヒト α 11レセプターの正しい発現構築体を宿す細胞を発現により確認した。細胞を、100 μ g/mlアンピシリンを含むMM/CA中で震盪しながら37℃で2時間培養した。1mlの培養物を1mMのIPTGで誘導し、2~4時間後に、各培養物250 μ lを250 μ lの酸洗浄済みガラスビーズならびに5%の β MEおよび染料を含む250 μ l Thorneer緩衝液 (8M尿素, 100mM Tris pH7.0, 10%グリセロール, 2mM EDTA, 5% SDS) と混合した。試料に渦をつくって1分間攪拌し、10分間65℃に加熱した。20 μ lを、4%~12%PAGEゲル (NOVEX) 上の各レーンに置いた。ゲルは1XME S緩衝液中で移動した。陽性のクローンをpCZR225と呼び、配列分析を行った。MBP- α 11融合のポリヌクレオチド配列を配列番号50に示す。

【0249】

B. ヒト α 11/MBP-6H融合ポリペプチドの細菌発現
1mlの配列DNAを、BL21株を形質転換するために用いた。細胞に、2.0kV、25 μ Fおよび400オームで電気パルスを加えた。電気穿孔の後、100mg/Lのアンピシリンを含む0.6ml MM/CA。

【0250】

100 μ g/mlのアンピシリンを含むMM/CA中で、震盪しながら37℃で2時間細胞を培養した。培養物の1mlを1mMのIPTGで誘導し、2~4時間後に、各培養物250 μ lを250 μ lの酸洗浄済みガラスビーズならびに5% β MEおよび染料を含む250 μ l Thorneer緩衝液 (8M尿素, 100mM Tris pH7.0, 1

10

20

30

40

50

0%グリセロール, 2mM EDTA, 5% SDS)と混合した。試料に渦をつくって1分間攪拌し、10分間65℃に加熱した。20μlを、4%~12%PAGEゲル(NOVEX)上の各レーンに置いた。ゲルは1XME S緩衝液中に移動した。陽性のクローンを、huzal phal 11/MBP-6H融合タンパク質のタンパク質精製のために培養した(以下の実施例14)。

【0251】

実施例14

E. coli 発酵からのhuzal phal 11/MBP-6H可溶性レセプターの精製特に断りのない限り、全ての操作を4℃でおこなった。以下の手順により、huzal phal 11/MBP-6H可溶性レセプターポリペプチドを精製した。pCZR225構築体を含みhuzal phal 11/MBP-6H可溶性レセプター(実施例13)を発現しているE. coli 細胞をSuper Broth II (12g/L Casien、24g/Lの酵母エキス、11.4g/Lのリン酸二カリウム、1.7g/Lのリン酸カリウム; Becton Dickinson, Cockeysville, MD)中で培養し、0.5%グリセロール中で凍結した。Super Broth II+グリセロール中の20グラムの凍結細胞を用いてタンパク質を精製した。凍結した細胞を解凍し、プロテアーゼインヒビター溶液(Extraction buffer)に1:10で希釈した後、細胞を溶解しhuzal phal 11/MBP-6H可溶性レセプタータンパク質を放出した。希釈された細胞は、20mMのTris(JT Baker, Philipsburg, NJ)、100mMの塩化ナトリウム(NaCl, Mallinkrodt, Paris, KY)、0.5mMのフェニルメチルスルホニルフルオライド(PMSF, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)、2μg/mlのロイペプチン(Fluka, Switzerland)および2μg/mlのアプロチニン(Sigma)の最終濃度であった。-7~-10℃の温度および30K PSIのFrench Press細胞破壊システム(Constant Systems Ltd, Warwick, UK)を用いて細胞を溶解した。希釈された細胞を、French Pressの前後でA₆₀₀の読みにより破壊について確認した。溶解した細胞を18,000Gで45分間遠心分離して破壊された細胞のかげらを除き、上清をタンパク質精製に用いた。上清の全目標タンパク質濃度を、BCA Protein Assay(Pierce, Rockford, IL)によりメーカーの指示に従って決定した。

【0252】

25mlカラムのTalon Metal Affinity resin(Clontech, Palo Alto, CA)(以下で述べるように調製)を、Bio-Rad 2.5cm D×10cm Hガラスカラムに注いだ。カラムに、10カラム体積(CVs)のTalon Equilibration緩衝液(20mM Tris, 100mM NaCl, pH8.0)を詰め重力により平衡化した。上清をTalonメタルアフィニティーレジンにパッチ充填し、終夜震盪した。樹脂を再びカラムに注ぎ、10カラム体積のTalon Equilibration bufferで重力により洗浄し、140mlの溶出緩衝液(Talon Equilibration buffer+200mM Imidazole-Fluka Chemical)により重力で溶出した。talonカラムを5カラム体積の20mMの2-(N-モルフォリノ)エタンスルホン酸 pH5.0(MES, Sigma)、5カラム体積の蒸留水により洗浄し、20%エタノール/0.1%アジ化ナトリウム中に保存した。溶出クロマトグラフィー全体にわたり14mlのフラクションを集め、280および320nmの吸光度およびBCAタンパク質分析によりフラクションを読んだ。通過液および洗浄用液体も取っておき分析した。目的とするタンパク質溶出フラクションを溜め、直接Amylose resin(New England, Biolabs, Beverly, MA)に詰めた。

【0253】

より純粋なhuzal phal 11/MBP-6H ポリペプチドを得るため、talonアフィニティー溶出の溜めて置いたフラクションを、pH7.4でAmylose re

sin (22 ml) にかけた。2.5 cm D×10 cm H Bio-Rad カラムを注ぎ、詰め、10カラム体積のAmylose平衡緩衝液-20mMのTris (JTBaker)、100mMのNaCl (Mallinkrodt)、1mMのPMSF (Sigma)、10mMのβメルカプトエタノール (BME, ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH) pH7.4中で平衡化した。試料を0.5 ml/分の流量で重力により詰めた。カラムを、10カラム体積のアミロース平衡緩衝液で洗浄し、約2カラム体積のアミロース平衡緩衝液+10mMマルトース (Fluka Biochemical, Switzerland) で重力により溶出した。溶出クロマトグラフィー全体にわたり5 mlのフラクションを集め、280および320 nmの吸光度を読んだ。アミロースカラムを、1カラム体積の蒸留水、5カラム体積の0.1% (w/v) SDS (Sigma)、5カラム体積の蒸留水、次いで5カラム体積のアミロース平衡緩衝液で再生した。

10

【0254】

目的とするフラクションを溜めておき、4×4 LのPBS pH7.4 (Sigma) を用いSlide-A-Lyzer (Pierce) で透析し、低分子量の汚染物質を除き、緩衝液交換および脱塩した。PBSの変更の後、得られた物質は、精製されたhuzal alpha 11/MBP-6Hポリペプチドを表していた。精製されたhuzal alpha 11/MBP-6Hポリペプチドを、SDS-PAGEクマジー染色および抗ウサギHRP複合抗体 (Rockland, Gilbertsville, PA) を用いたウェスタンブロット分析で分析した。huzal alpha 11/MBP-6Hポリペプチドの濃度は、BCA分析で測定すると1.92 mg/mlであった。

20

【0255】

精製されたhuzal alpha 11/MBP-6Hポリペプチドをウサギへの注射用に調製し、抗体製造のためR&R Research and Development (Stanwood, WA) に送った。ウサギに注射し、抗-huzal alpha 11/MBP-6H血清 (以下の実施例15) を製造した。

【0256】

実施例15

zalpha 11ポリクローナル抗体

2匹のメスニュージーランドホワイトラビットを、精製されたhuzal alpha 11/MBP-6Hポリペプチド (実施例14) または精製された組換えzalpha 11 CEE可溶性レセプター (実施例11A) で免疫処置することにより、ポリクローナル抗体を調製した。対応するポリクローナル抗体を、それぞれウサギ抗-huzal alpha 11/MBP-6Hおよびウサギ抗-huzal alpha 11-CEE-BHKと呼ぶ。ウサギにはそれぞれ、フロイントの完全アジュバント (Pierce, Rockford, IL) 中の精製タンパク質200 mgの初期の腹腔内 (IP) 注射をし、その後フロイントの不完全アジュバント中の精製タンパク質100 mgのブースターIP注射を3週間毎に行った。3回目のブースター注射の投与7~10日後に、ウサギから血を採取し血清を集めた。次いでウサギにブーストを施し、3週間毎に採血した。

30

【0257】

zalpha 11特異性ポリクローナル抗体は、CNBr-SEPHAROSEのグラムあたり10 mgの精製huzal alpha 11/MBP-6Hポリペプチド (実施例14) を用いて調製されたCNBr-SEPHAROSE 4B プロテインカラム (Pharmacia LKB) を用い、次いでPBS中での20X透析により、ウサギ血清からアフィニティー精製した。zalpha 11特異性抗体を、1 mg/mlの適当なタンパク質抗原を抗体標的として用いELISA力価検定によりキャラクタリゼーションした。ウサギ抗-huzal alpha 11/MBP-6Hアフィニティー精製された抗体の検出下限 (LLD) は、500 pg/mlの希釈度であった。ウサギ抗-huzal alpha 11-CEE-BHKアフィニティー精製された抗体の検出下限は、50 pg/mlの希釈度であった。

40

50

【0258】

実施例16

RT-PCRを用いた $\alpha 11$ レセプターを発現する細胞の同定
 特定種類のヒトの細胞を単離し、RT-PCRにより $\alpha 11$ 発現についてスクリーニングした。100 μ mナイロンセルストレーナー（Falcon（商標）；Bectin Dickenson, Franklin Lakes, NJ）を通した機械的分裂により、B細胞を新鮮なヒトの扁桃から単離した。B細胞懸濁液を、VariomACS VS+磁気カラムおよびCD19マイクロビーズ（Miltenyi Biotec, Auburn, CA）でメーカーの指示どおりポジティブ選択することにより、CD19+B細胞に対してエンリッチした。ヒトアフエレーシス血液試料からT細胞および単核細胞を単離した。CD3+T細胞はCD3マイクロビーズVariomACSポジティブ選択により精製し、単核細胞はメーカーの指示どおりVariomACSネガティブ選択カラム（Miltenyi）を用いて精製した。各母集団からの試料を染色し、蛍光抗体細胞分類（FACS）（Bectin Dickinson, San Jose, CA）分析により分析してエンリッチパーセントおよび得られた収率を求めた。CD19+B細胞は約96%の純度であり、CD3+T細胞は約95%の純度であり、単核細胞は約96%の純度であった。

10

【0259】

休息中および活動中のこれら3種の細胞から、当業界で標準的な方法を用いてRNAを調製した。上述のカラム調製法から直接休息中細胞からRNAを単離した。CD19+およびCD3+細胞は、PMA 5ng/ml（Calbiochem, La Jolla, CA）およびイオノマイシン0.5 μ g/ml（Calbiochem）を含むRPMIおよび10%FBS中で、500,000細胞/mlで、4時間および24時間培養することにより活性化した。単核細胞は、LPS 10ng/ml（Sigma, St. Louis MO）およびrhIFN- γ 10ng/ml（R&D, Minneapolis, MN）を含むRPMIおよび10%FBS中で24時間培養することにより活性化した。細胞を取り入れPBS中で洗浄した。メーカーの指示どおりRNeasy Midiprep（商標）Kit（Qiagen, Valencia, CA）を用いて細胞ペレットからRNAを調製し、第一鎖cDNA合成を、メーカーの指示どおりSuperscript II（商標）Kit（GIBCO BRL, Grand Island, NY）を用いて行った。

20

30

【0260】

オリゴZC19907（配列番号20）およびZC19908（配列番号21）をPCR反応に用いて、上述の試料を $\alpha 11$ メッセージに対応する1.2kbフラグメントについてスクリーニングした。Taq Polymerase（BRL Grand Island NY）でPCR増幅を行い、条件は以下のとおりである。95℃で1分、60℃で1分、72℃で30秒で35サイクル；72℃で10分間1サイクル；および4℃で浸漬である。それぞれ50 μ lの反応容積の10 μ lを2%アガロース1XTAEゲル上で流し、得られた生成物を同定した。PCR生成物は、（-）生成物なし、（+）バンドが見える、（++）バンドがよりはっきり存在するおよび（+++）最もはっきりしたバンドで評価し、結果を表5に示す。

40

【0261】

第5表

cDNA供給源	活性化	PCR生成物
CD19+細胞	0時間休止	+
	4時間活性化	++
	24時間活性化	+++
CD3+細胞	0時間休止	—
	4時間活性化	++
	24時間活性化	—
単球	0時間休止	—
	24時間活性化	—

10

【0262】

これらの結果は、zalpall1のメッセージが休止ヒトCD19+ B細胞に存在し、マイトジェン活性と共に増大することを示した。さらにそれは、わずか4時間の活性化の後にヒトCD3+ T細胞によって発現されるようである。休止または活性化ヒト単球のいずれにも、明らかなメッセージはなかった。

【0263】

実施例17

Zalpall1免疫組織化学

A. 細胞および組織の調製

正の対照組織は、zalpall1（実施例7）によりトランスフェクトされたBaF3細胞、ならびに、HSD（Harlan Sprague Dawley、インディアナポリス、IN）より受領したマウスリンパ節、脾臓および胸腺、Regional Primate Research Center（ワシントン大学、シアトル、WA）より受領したサルリンパ節および脾臓、CHTN（クリーブランド、OH）より受領したヒトリンパ節および脾臓、を包含するzalpall1を発現することが知られているリンパ球様組織で構成されていた。各組織試料について実施された負の対照は、（1）トランスフェクトされていないBaF3細胞、（2）zalpall1を発現しないことが知られているマウスおよびヒト由来の肝および脳、（3）一次抗体の不在下での抗体希釈緩衝液（Ventann Biotech Systems、タクソン、AZ）での染色、および（4）競合実験におけるzalpall1可溶性蛋白の使用、を包含していた。

20

【0264】

他の細胞試料を調査した。刺激していないおよび刺激したHL60細胞の両方を検定した。HL60細胞は前骨髄球性セルラインであり、異なる試薬によって骨髄性または顆粒球系統へと分化することができる。刺激されたHL60試料は以下のように調製した：（1）HL60細胞を10ng/mLのホルボール-ミリステート-アセテート（PMA）（Sigma、セントルイス、MO）で48時間処理して、単球系列の細胞へと分化させ；そして、（2）HL60細胞を1.25% DMSO（Sigma）で4日間処理して好中球様細胞へと分化させた。さらに、新鮮なヒト血液由来の、ヒト多形核（PMN）細胞、ヒト顆粒球、ヒト末梢血リンパ球（PBL）およびヒト単球を調査した（当分野での常法を用いて社内で調製した）。上記の細胞および組織を10%のNBF（Surgipath、リッチモンド、IL）中で一夜固定し、パラフィンX-tra（Oxford Scientific、セントルイス、MO）に包埋し、Reichert-Jung 2050 microme（Leica Instruments GmbH、ヌスロッホ、ドイツ）で5μmの切片を作成した。

30

40

【0265】

B. 免疫組織化学

組織スライドを脱パラフィン化し、緩衝液（水）に水和させ、Antigen Retrieval Citra緩衝液（BioGenex、サンローマン、CA）中20分間の蒸気HIER処理に付した。非特異結合をブロックするため、5%正常ヤギ血清（Vector、バーリングラム、CA）を10分間使用した。zalpall1可溶性レセプター蛋白に対するポリクローナル抗体（ウサギ抗huzalpall1-MBP-6Hおよびウサギ抗huzalpall1-CEE-BHK；実施例15を参照されたい）を一次抗体として使用し、それぞれ1:200および1:400の希釈で免疫組

50

組織化学的スクリーニング分析を実施した。二次抗体として、ビオチンコンジュゲートしたヤギ抗ウサギ IgG (Vector; Cat.No.BA-1000、1.5 mg/mL) を 1 : 200 の希釈で使用した。別の試料において、一次抗体の免疫反応をプレブロックするため、一次抗体に対する zalpha11 CEE 可溶性レセプター蛋白 (10 倍過剰) (実施例 11 A) をさらに使用することにより、蛋白の競合を実施した。この競合は、zalpha11 に対するウサギポリクローナル抗体の特異性についての対照として使用した。検出は、製造者の指示に従い ChemMate DAB キット (ストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートを適用した標識化ストレプトアビジン-ビオチンキット、および DAB 基質)、そして製造者のヘマトキシリン対比染色を 30 秒間使用して (Ventana Biotek Systems、タクソン、AZ)、Ventana ChemMate 500 装置で実施した。

10

【0266】

PMA 活性化 HL-60 細胞に、zalpha11 の高い発現が観察された。刺激無しの HL-60 細胞および PBL では低いレベルの発現が観察された。マウスの脾臓、胸腺およびリンパ節の細胞のサブセットは正の染色を示した。ヒトおよびサルリンパ節および脾臓の両細胞、ならびに DMSO 刺激した HL-60 細胞は、ごく僅かな染色を示し、または全く染色を示さなかった。細胞および組織に認められたシグナルは、過剰の zalpha11 可溶性受容体蛋白を使用することにより、ほぼ競合した。脳および肝の負の対照組織は染色を示さなかった。

【0267】

実施例 18

20

zalpha11 可溶性受容体に対するポリクローナルウサギ抗血清を使用した、zalpha11 受容体を発現する末梢血単核細胞 (PBMC) の同定

健常なドナーから新鮮なヘパリン処理した血液 200 mL を得た。血液を PBS で 1 : 1 に希釈し、Ficoll-Paque PLUS 勾配 (Pharmacia Biotech、ウプサラ、スウェーデン) を用いて分離し、リンパ球界面を採集した。細胞を PBS で 2 回洗浄し、PRMI + 5% FBS 培地に 2×10^6 細胞/mL の濃度で再懸濁した。

【0268】

zalpha11 レセプターの発現がリンパ球細胞の活性化状態、即ち休止および活性化細胞の違いにより影響を受けるかどうかを判定するため、幾つかの刺激条件を使用した：1) 非刺激、即ち培地のみ (PRMI + 5% FBS 培地)；2) PMA 10 ng/mL + イオノマイシン 0.5 μ g/mL (共に Calbiochem より)；および、3) PHA 活性化 (フィトヘマグルチニン-P、Difco/VWR)。細胞を 37°C で 17 時間インキュベートし、次いで染色のために採集して zalpha11 レセプターの発現を検出した。

30

【0269】

間接染色プロトコルを使用した。簡潔に述べると、ヒトリンパ球細胞を染色緩衝液 (PBS + 0.02% NaN₃ + BSA 1% 正常ヒト血清 2%) に懸濁し、96 ウェル平板に 2×10^5 細胞を 50 μ L/ウェル蒔いた。zalpha11 CEE 可溶性レセプターに対する抗体 (実施例 15) を使用して、それらが、単離されたヒトリンパ球上の B 細胞 (CD-19)、T 細胞 (CD-3) または単球マーカーを含むかどうかを決定した。10 μ g/mL の zalpha11 可溶性レセプターに対するウサギポリクローナル血清 (Rb 抗 huzalpha11-CEE-BHK) (実施例 15) を、リンパ球上の zalpha11 を同定するための抗体として使用した。二次抗体、ヤギ抗ウサギ Ig-FITC (Biosource、カマリロ、CA) を使用して、zalpha11 レセプターに対する Rb 抗 huzalpha11-CEE-BHK 抗体の結合を視覚化した。T 細胞、B 細胞および単球といった細胞型における抗 zalpha11 レセプター抗体の同時染色を同定するために、他の抗体を同時使用して T 細胞 (CD3-PE; PharMingen、サンディエゴ、CA)、B 細胞 (CD19-PE) (PharMingen)、および単球 (CD-14-PE) (PharMingen) を染色した。種々の対照を使用して、非特異結合および染色のバックグラウンド結合を決定した：(1) 無関係なウサギポリクローナル血清を非特異対照として使用し；そして、(2) その試薬のバックグラウンドレベルを決定するため、二次抗体のみを使用した。精製した zalpha11 CEE 可溶性レセプター (実施例 11) を競合的インヒビタ

40

50

ーとして約10倍過剰で使用し、zalpha11可溶性レセプターに対するウサギ抗huzalpha11-C E E-B H K抗体の特異性を確認した。

【0270】

細胞を平板培養し、一次および同時染色抗体を添加した後、細胞を氷上で30分間インキュベートし、染色緩衝液で2回洗浄し、二次抗体、ヤギ抗ウサギIg-F I T C (Biosource)により氷上で30分間染色した。細胞を染色緩衝液で2回洗浄し、約1 µg/mLの最終濃度で生存染色剤7 A A Dを含有する染色緩衝液中に、ウェル当たり200 µLで再懸濁した(Sigma、セントルイス、MO)。F A C S-Caliber (Becton-Dickinson、サンノゼ、CA)で試料を読み取り、生存細胞を分析した。

【0271】

zalpha11レセプターに対するウサギポリクローナルは休止B細胞を染色した。休止B細胞上のシグナルは、無関係のウサギ血清を用いて達成されたシグナルより明確であり、そしてこのシグナルは、過剰のzalpha11-C E E可溶性レセプターの添加により、T細胞よりもB細胞上で、より大きく低減した。分離されたBおよびT細胞を用いてこの実験を反復したが、結果は極めて似かよっていた。さらに、zalpha11レセプターに対するポリクローナルウサギ抗huzalpha11-C E E-B H K抗体による染色は、休止B細胞で最も高かった。

【0272】

実施例19

リアルタイム定量的R T / P C Rを用いた種々の組織でのzalpha11レセプター発現

A. 定量的R T - P C Rのためのプライマーおよびプローブ

ABI PRISM 7700配列検出システム(PE Applied Biosystems, Inc.、フォスターシティ、CA)を用いるリアルタイム定量的R T - P C Rは過去に記載されている(Heid, C.A.等、Genome Research 6:986-994、1996; Gibson, U.E.M.等、Genome Research 6:995-1001、1996; Sundaresan, S.等、Endocrinology 139:4756-4764、1998)。この方法は、リポーターおよび消去剤蛍光色素の両者を含有する遺伝子特異的プローブの使用を取り入れている。プローブが無傷である時、リポーター色素の放射は、消去剤色素が接近しているため、打ち消される。さらなる遺伝子特異的フォワードおよびリバースプライマーを使用するP C R伸長の最中に、このプローブがTaqポリメラーゼの5'ヌクレアーゼ活性により開裂し、それによりリポーター色素がプローブから開放され、その結果、蛍光放出の増大が起こる。

【0273】

zalpha11発現のリアルタイム定量的R T - P C R分析に使用するプライマーおよびプローブは、プライマー設計ソフトウェアPrimer Express(商標)(PE Applied Biosystems、フォスターシティ、CA)を用いて設計した。ヒトzalpha11のためのプライマーは、ゲノムDNAの増幅を排除するためイントロン-エクソン接合部をつないで設計した。フォワードプライマーZ C 2 2 2 7 7 (配列番号59)およびリバースプライマーZ C 2 2 2 7 6 (配列番号60)を約300 nM濃度でP C R反応に使用して(下記)143 bpの生成物を合成した。Z G 3 1 (配列番号61)と呼称される、対応するzalpha11 TaqMan(商標)プローブを合成し、PE Applied Biosystemsによって標識した。このZG31プローブは、リポーター蛍光色素(6-カルボキシフルオレセイン)(F A M)(PE Applied Biosystems)によって5'末端を、そして消去剤蛍光色素(6-カルボキシテトラメチルローダミン)(T A M R A)(PE Applied Biosystems)によって3'末端を標識した。

【0274】

試験されたRNA試料の完全性および品質を試験する対照として、全てのRNA試料(下記)を、PE Applied Biosystemsに注文した(cat No.4304483)プライマーおよびプローブの組を用いてrRNAについてスクリーニングした。このキットは、rRNAフォワードプライマー(配列番号66)およびrRNAリバースプライマー(配列番号67)、rRNA TaqMan(商標)プローブ(配列番号68)を含んでいる。このrRNAプローブは、リポーター蛍光色素V I C (PE Applied Biosystems)によって5'末端を、そして消去剤

蛍光色素 T A M R A (PE Applied Biosystems)によって 3' 末端を標識した。r R N A の結果はさらに、内因性対照としての役割を有し、被験試料において見られた zalpha11m R N A 発現結果の正規化を可能にする。

【0275】

ヒト C D 3、C D 19 および単球細胞型由来の R N A 試料を調製し、これは上記実施例 16 に記載した。対照 RNA は、製造者の指示に従い、RNeasy Miniprep(商標)キット (Qiagen、ヴァレンシア、C A) を用いて、ヒト zalpha11 レセプターを発現するおよそ 1000 万の B a F 3 細胞から調製した (実施例 7)。

【0276】

B. リアルタイム定量的 R T - P C R -

zalpha11m R N A の相対レベルを、一段階 R T - P C R 法を用いて総 R N A 試料を分析することにより決定した (PE Applied Biosystems)。ヒト zalpha11 レセプターを発現する B a F 3 細胞由来の総 R N A を標準法により単離し、定量用の標準曲線の作成に使用した。この曲線は、r R N A スクリーニングについては $2.5 - 2.5 \times 10^{-4} \text{ ng}/\mu\text{L}$ の範囲、そして zalpha11 スクリーニングについては $250 - 0.025 \text{ ng}/\mu\text{L}$ の範囲の 10 倍連続希釈で構成され、各標準曲線の点は 3 ずつ分析した。さらにヒト C D 3、C D 19 および単球細胞由来の総 R N A 試料を、ヒト zalpha11 転写物レベルについて、そして内因性対照としての r R N A のレベルについて、3 ずつ分析した。総体積 $25 \mu\text{L}$ で、各 R N A 試料を、緩衝液 A (50 mM KCL 、 10 mM トリス H C l) 中の総 R N A およそ 25 ng ；内部標準色素カルボキシ-x-ローダミン (R O X)；適当なプライマー (r R N A 試料のための r R N A プライマー (配列番号 66 および配列番号 67) およそ 50 nM ；ならびに zalpha11 試料のための Z C 22, 277 (配列番号 59) および Z C 22, 276 (配列番号 60) プライマー およそ 300 nM)；適当なプローブ (r R N A 試料のための r R N A TaqMan(商標)プローブ (配列番号 68) およそ 50 nM 、zalpha11 試料のための Z G 31 (配列番号 61) プローブ およそ 100 nM)； MgCl_2 5.5 mM ；d-C T P、d-A T P、および d-G T P 各 $300 \mu\text{M}$ 、ならびに d-U T P $600 \mu\text{M}$ ；Mu l V 逆転写酵素 ($0.25 \text{ U}/\mu\text{L}$)；AmpliTaq(商標) Gold D N A ポリメラーゼ ($0.025 \text{ U}/\mu\text{L}$) (PE Applied Biosystems)；および R N アーゼインヒビター ($0.4 \text{ U}/\mu\text{L}$) (PE Applied Biosystems)、を含有する一段階 R T - P C R 反応に付した。P C R の熱循環条件は以下の通りであった：最初の逆転写 (R T) 工程が 48°C 30 分間を 1 サイクル；続いて AmpliTaq Gold(商標) (PE Applied Biosystems) 活性化工程が 95°C 10 分間を 1 サイクル；その後、 95°C 15 秒間および 60°C 1 分間の増幅を 40 サイクル。

【0277】

相対的 zalpha11 R N A レベルを、製造者 PE Biosystems による記載のように標準曲線法を用いて決定した (ユーザー広報 No. 2：A B I プリズム 7700 配列検出システム、遺伝子発現の相対的定量、1997 年 12 月 11 日)。r R N A 測定を用いて zalpha11 レベルを正規化し、休止 C D 3 + R N A 試料を標準物質として使用した。休止 C D 3 は標準物質として任意に選択し、1.00 の数値を与えた。残りの試料を標準物質に対して比較した。データを下の第 6 表に示す。

【0278】

第 6 表

試料	休止	4 時間の刺激	24 時間の刺激
C D 3	1.00	15.27	16.70
C D 19	20.14	65.08	25.42
単球	0.05	データ無し	0.26

【0279】

4 および 24 時間では、C D 3 + における zalpha11 レセプター発現に 15 倍の増大があった。休止 C D 19 は、休止 C D 3 + に比較してレセプター発現で 20 倍の増大があった。4 時間の刺激では 3 倍の増大があり、これは 24 時間によって休止のレベルに戻った。単球は、この検定では検出可能な zalpha11 レセプター発現を示さなかった。

【0280】

実施例20

in situハイブリダイゼーションを用いたzalphallレセプターを発現する細胞の同定
特異的なヒト組織を単離し、in situハイブリダイゼーションによりzalphallの発現につ
いてスクリーニングした。調製し、切片作成し、in situハイブリダイゼーションに付し
た種々のヒト組織は、胸腺、脾臓、扁桃、リンパ節および肺を包含していた。組織を10
%緩衝化ホルマリンで固定し、標準技術によりパラフィンでブロック化した（実施例17
）。組織を4ないし8ミクロンの切片とした。組織は標準プロトコルを用いて調製した（
「非同位体のin situハイブリダイゼーションの開発」、<http://dir.niehs.nih.gov/dirl>
[ep/ish.html](http://dir.niehs.nih.gov/dirl/ep/ish.html)）。簡潔に述べると、組織切片をHistoClear（National Diagnostics、アト
ランタ、GA）で脱パラフィン化し、次いでエタノールで脱水した。次にこれらをプロテ
イナーゼK（50 μg/mL）（Boehringer Diagnostics、インディアナポリス、IN）を用い
て37℃で2ないし20分間消化した。この工程の後、組織のアセチル化および再水和を
行った。

10

【0281】

PCRにより作成した2個のin situプローブをヒトzalphall配列に対して設計した。zal
phall cDNAの個別の領域のためのプローブを作成するため、2組のオリゴを設計した
：（1）オリゴZC23, 684（配列番号62）およびZC23, 656（配列番号6
3）を使用してzalphallのための413bpプローブを作成し、そして、（2）オリゴZ
C23, 685（配列番号64）およびZC23, 657（配列番号65）を使用してza
lphallのための430bpプローブを作成した。第二のプローブは第一のzalphallプローブ
の1500bp 3'である。各組由来のアンチセンスオリゴはまた、これらのPCR生
成物からアンチセンスRNAプローブの容易な転写を可能にするための、T7 RNAポ
リメラーゼプロモーター用の有効配列を含んでいた。PCR反応の条件は以下の通りであ
った：94℃30秒間を30サイクル、60℃1分間、72℃1.5分間。PCR生成物
をQiagen遠沈カラムにより精製した後、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール
沈澱した。引き続きプローブを、製造者の指示に従い、インビトロ転写系（Promega、マ
ディソン、WI）を用いてジゴキシゲニン（Boehringer）またはビオチン（Boehringer）
で標識した。

20

【0282】

ジゴキシゲニンまたはビオチンで標識したzalphallプローブ（上記）を用いてin situ
ハイブリダイゼーションを実施した。プローブを、55-60℃で12ないし16時間、
1ないし5pmol/mLの濃度でスライドに添加した。引き続きスライドを2XSSCおよび
0.1XSSCで50℃で洗浄した。チラミッドシグナル増幅（TSA）を用いてシグナル
を増幅し（TSA、in situ間接キット；NEN）、製造者の指示に従いVector Red基質
キット（Vector Lab）を用いて視覚化した。次いでこのスライドをヘマトキシリン（Vect
or Laboratories、バーリングガム、CA）を用いて対比染色した。

30

【0283】

胸腺、扁桃、肺、およびリンパ節にシグナルが認められた。陽性染色細胞はリンパ球およ
び関連細胞であるように見受けられた。

40

【0284】

実施例21

マウスzalphallレセプターの単離

A. マウスゲノムライブラリースクリーニング

全cDNAを含むヒトzalphall受容体ポリヌクレオチドプローブでマウスゲノムライブラ
リーをプロービングすることにより、最初の部分的マウスzalphall配列を取得した。ZC
19, 905（配列番号36）およびZC19, 906（配列番号37）プライマーを用
いるPCRによりヒトzalphall cDNAを作成し、全長ヒトzalphallを含むプラスミド（
例えば実施例1）を鋳型として使用した。PCR反応条件は以下の通りであった：98℃
1分間を35サイクル、68℃1分間；および72℃2分間；その後72℃10分間を1

50

サイクル。このPCR生成物を1%低融点アガロース (Boehringer Mannheim) につけ、製造者の指示に従いQiaquick(商標)ゲル抽出キット (Qiagen) を用いておよそ1.5 kbのヒトzalpha11c DNAを単離した。このヒトzalpha11c DNAを使用してマウスゲノムDNAライブラリー (下記) をスクリーニングした。

【0285】

使用したマウスゲノムDNAライブラリーは、emb13 SP6/T7ラムダBamHIクローン化ライブラリー (Clontech、パロアルト、CA) であった。7.2 x 10⁵ pfuを表すこのライブラリーを、24 NZY平板のE. coli K802宿主ローン上に蒔いた。製造者の指示に従いHybond-Nフィルター (Amersham Pharmacia、バッキンガムシア、イングランド、英国) を用いてブランクの釣り上げを行った。このフィルターを1.5 MのNaClおよび0.5 MのNaOH中で10分間変性し、次いで1.5 MのNaClおよび0.5 Mのトリス-HCl (pH 7.2) で10分間中和した。DNAをSTRATALINKER UVクロスリンカー (Stratagene) を用いて1200ジュールでフィルターに付着させた。フィルターは、プレ洗浄緩衝液 (0.25 x SSC、0.25% SDSおよび1 mM EDTA) 中、溶液を3回交換して合計45分間65℃でプレ洗浄して細胞残屑を除去した。このフィルターを、0.1 mg/mL変性鮭精子DNAを含有するExpresshyb(商標)溶液 (Clontech) 中、50℃で一夜プレハイブリダイズした。およそ50 ngの精製したヒトzalpha11c DNA (上記) を、製造者の指示に従いRediprime II Random Prime Labeling System (Amersham Pharmacia) を用いて³²Pで標識した。取り込まれなかった放射性をNucTrap(商標) プッシュカラム (Stratagene、ラホーヤ、CA) を用いてzalpha11c DNAプローブから除去した。約0.5ないし約1 x 10⁶ cpm/mLのzalpha11c DNAプローブ、約0.1 mg/mLの変性鮭精子DNAおよび変性させた0.5 μg/mLのcot-1 DNAを含有するExpresshyb(商標)溶液 (Clontech) 中でフィルターをハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションは50℃で一夜実施した。フィルターを2 x SSC、0.1% SDS中、室温で2時間洗浄し (洗浄液を数回交換)、次に温度を1時間60℃に上げた (緩衝液を1回交換)。-80℃で一夜暴露すると一次単離物を表す6個のブランクが示された。

【0286】

二次ブランク単離物を取得するため、一次単離物であるこの6個のブランクをパスツールピペットで釣り上げ、クロロホルム数滴を含有するSM (0.1 M NaCl、50 mM トリス pH 7.5、10 mM MgSO₄、0.02%ゼラチン) 中4℃で一夜溶離した。ファージの力価を決定した後、6個の一次単離物の最初のplug (12.5倍のカバレッジ) にあるファージの推定量の約12.5倍を、NZYマキシ平板上の10 mM MgSO₄/NZYトッパアガロースに植えたE. coli K802細胞のローン上に蒔いた。ブランクの釣り上げは、製造者の指示に従いHybond-Nフィルター (Amersham Pharmacia) を用いて行った。フィルターを上記のように固定した。二巡目のフィルターは細胞残屑を除くためプレ洗浄緩衝液 (2 x SSC、0.1% SDSおよび1 mM EDTA) 中、計45分間の間に3回溶液を交換しながら、65℃でプレ洗浄した。次いで二巡目のフィルター釣り上げ物をプレハイブリダイズし、zalpha11c DNAプローブを上記のように調製した。二巡目のフィルターを、約0.1 mg/mLの変性鮭精子DNAを含有する約10⁶ cpm/mLのzalpha11c DNAプローブを含むExpresshyb(商標)溶液 (Clontech) 中で上記のようにハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションは50℃で一夜実施した。一次スクリーニングについて上に述べた洗浄条件をこの二次スクリーニングについて反復した。-80℃で一夜暴露させた後、最初の6個の一次ブランク単離物のうち2個を、二次スクリーニングにおいて陽性であると確認した。二次スクリーニングにおいてヒトzalpha11c DNAとハイブリダイズする陽性ブランクをパスツールピペットで釣り上げ、7b1および20b1と命名した。

【0287】

単離したブランク7b1および20b1番をSM 200 μLで、4℃で一夜溶離した。各単離物の10⁻²ないし10⁻⁶までの範囲の10倍連続希釈物を宿主E. coli K802細胞上に蒔いて力価を決定した。単離物20b1は4 x 10³ pfu/μLの力価を持ち、これをさらに追跡した。ファージDNA調製物を作成するため、10⁵ pfu/平板を密集状態の

宿主E. Coli K802細胞上に蒔くことにより、4枚の平板を調製した。平板を、ファージの溶菌が融合状態となり始めるまで37℃で約6.5時間増殖させた。次いでこのファージを平板当たりSM12mLで4℃で一夜溶離した。次に平板を室温で1時間振盪し、上清を除去し、1%クロロホルムを加え、上清を再度15分間振盪した。20b1ファージDNAはWizard Lambda Preps DNA精製系(Promega、マディソン、WI;セクションIVおよびVI)を用いて調製した。

【0288】

20b1ファージDNAの試料を幾つかの制限酵素で切断し、サザンブロッティング用のDNAフラグメントを作成した。この消化物を1%TBEアガロースゲルにかけた。このゲルを0.25MのHClに30分間浸漬し、蒸留したH₂Oですすぎ、溶液を1回交換しながら0.5MのNaOHおよび1.5MのNaClに40分間浸漬し、溶液を1回交換しながら1.5NaClおよび0.5トリス-HCl(pH7.2)で40分間中和した。TURBO BLOTTER(商標)迅速下方移動系(Schleicher & Schuell、キーン、NH)を準備してNytran/BA-Sメンブレン(Schleicher & Schuell)上にDNAを移した。このDNAをSTRATALINKER UVクロスリンカー(Stratagene、ラホーヤ、CA)を用いて1200ジュールでNytranに付着させた。プロットを上記のようにプレハイブリダイズした。ヒト α 11c DNA 約50ngを上記のように標識しプローブについて精製した。 α 11c DNA プローブ約10⁶cpm/mLおよび変性鮭精子DNA約0.1mg/mLを含有するExpresshyb(商標)溶液(Clontech)中で上記のようにフィルターをハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションは50℃で一夜実施した。プロットを上記のように洗浄し、-80℃で一夜フィ

【0289】

サザンは、BamHI/StuI消化物から生成したDNAフラグメントを示し、これは予想されたサイズ範囲1.3ないし1.6kbでヒト α 11c DNAプローブとハイブリダイズした。このフラグメントを追跡した。20b1ラムダDNAおよそ3μgをBamHI(Boehringer Mannheim、インディアナポリス、IN)20単位およびStuI(NEB、ビヴァリー、MA)20単位を用いて37℃で2時間切断した。消化物を1%TBEゲルにかけ、1.3kbダブレットおよび1.6kbダブレットバンドをゲルから切り取り、このDNAをQiaquickゲル抽出キット(Qiagen、ヴァレンシア、CA)を用いてアガロースから抽出した。この調製物からのDNA収率が低かったため、ヒト α 11c DNA プローブにハイブリダイズしたフラグメントがBamHI/StuIであったのか、それともStuI/StuIフラグメントであったのかをさらなる制限消化分析によって判定することはできなかった。したがって、Zero Blunt PCRクローニングキット(Invitrogen、カールスバッド、CA)を用いて、1.3kbダブレットフラグメント5μLおよび1.6kbダブレットフラグメント5μLを使用する平滑ライゲーションを行った。この平滑ライゲーションは、1.6kbフラグメントの両方および1.3kbフラグメントの一方を伴う陽性クローンを生成した。これらのクローンをEcoRI(Life Technologies)で消化したが、これはT-突出部位に隣接し、ここに1.6および1.3kbフラグメントが挿入された。どちらがヒト α 11c DNAプローブにハイブリダイズする元のフラグメントであるかを判定するため、もう一つのサザンプロットを実施した。1%TBEゲルを処理し、DNAを上記のようにNytranプロットに移した。

【0290】

プロットを上記のようにハイブリダイゼーション溶液10mL中でプレハイブリダイゼーションさせた。別のヒト α 11cポリヌクレオチドのプローブを調製した。さらに全長 α 11c DNAのヒトの α 11c断片をオリゴZC19, 905(配列番号36)およびZC20, 097(配列番号27)とのPCRによるプローブとして用いるため生成させた。PCRの反応条件は下記のとおりである。95℃で1分間; 95℃で1分間、55℃で1分間、および72℃で2分間を35サイクル; 続いて72℃で10分間を1サイクル。PCR生産物を低融点の1%アガロース(Boehringer Mannheim)上に流し、約1.5kbのヒトの α 11c DNAをQiaq

u i c k (商標) ゲル抽出キット (Q i a g e n) を用いて製造業者の手引き書に従って単離した。この単離したヒトの z a l p h a l c D N A 断片約 5 0 n g を ^{32} P で標識し、上記に従って精製した。フィルターを、z a l p h a l c D N A プローブ約 10^6 c p m / m l 、変性したサケの精液約 0 . 1 m g / m l 、および変性した c o t - 1 D N A 0 . 5 μ g / m l を含有する E x p r e s s h y b (商標) 溶液 (C l o n t e c h) 中で上記のようにハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーションおよび洗浄は上記の記載のとおりである。プロットを -80°C で 1 . 5 時間フィルムに暴露したところ、1 . 3 k b 挿入物はヒトの z a l p h a l プローブと強くハイブリダイゼーションしていた。

【0291】

このクローンを配列決定し、終止コドンおよび上流のイントロン配列を有するマウスの z a l p h a l の 3 ' をコードエクソンを含むことが分かった。用いた配列決定用プライマーは、Z C 3 , 4 2 4 (配列番号 8 6) 、Z C 6 9 4 (配列番号 8 7) 、Z C 2 4 , 3 9 9 (配列番号 8 8) 、および Z C 2 4 , 4 0 0 (配列番号 8 9) であった。3 ' エクソンを含むマウスの z a l p h a l のゲノム配列は、配列番号 6 9 に示される。3 ' エクソンコード配列は、2 4 0 個のアミノ酸のエクソン (配列番号 7 0) をコードする配列番号 6 9 中の 5 4 3 番ヌクレオチドで始まり、1 2 6 2 番ヌクレオチドで終わる。

【0292】

B. マウス c D N A パネルの P C R スクリーニング

入手可能なインハウスの市販マウス c D N A (C l o n t e c h ; L i f e t e c h n o l o g i e s , G a i t h e r s b u r g , M D) のパネルを、プライマーとして Z C 2 4 , 4 3 2 (配列番号 7 1) および Z C 2 4 , 4 3 3 (配列番号 7 2) (それぞれ 2 0 p モル) を用いて P C R によりスクリーニングした。P C R の反応条件は下記のとおりである。9 4 $^{\circ}\text{C}$ で 2 分間 ; 9 4 $^{\circ}\text{C}$ で 2 0 秒間、6 4 $^{\circ}\text{C}$ で 3 0 秒間、および 7 2 $^{\circ}\text{C}$ で 3 0 秒間を 3 2 サイクル ; 続いて 7 2 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間を 1 サイクル。マウスの脾臓、樹枝状細胞、新生皮膚、骨髄、野生型 B a F 3 細胞、E L 4 細胞、および肺は、予想された 4 5 0 b p サイズの強い P C R 生産物を示した。

【0293】

C. 5 ' 入れ子 R A C E

5 ' R A C E 反応を、プライマー Z C 9 , 7 3 9 (配列番号 7 3) および Z C 2 4 , 4 3 4 (配列番号 7 4) それぞれ 2 0 p モルと、鋳型として C D + で選択されたマウスの脾臓のマラソン c D N A を用いて行なった。マラソン c D N A は、M a r a t h o n c D N A A m p l i f i c a t i o n K i t (C l o n t e c h) を用いて製造業者の手引き書に従って調製した。P C R の反応条件は下記のとおりである。9 4 $^{\circ}\text{C}$ で 1 分間 ; 9 4 $^{\circ}\text{C}$ で 2 0 秒間および 7 0 $^{\circ}\text{C}$ で 1 . 5 分間を 5 サイクル ; 続いて 9 4 $^{\circ}\text{C}$ で 2 0 秒間、6 4 $^{\circ}\text{C}$ で 2 0 秒間、および 7 0 $^{\circ}\text{C}$ で 1 . 5 分間を 2 5 サイクル ; 続いて 7 2 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間を 1 サイクル。

【0294】

マウスの z a l p h a l の 5 ' R A C E 生産物を富化するために、入れ子 5 ' R A C E 反応を、入れ子プライマー Z C 2 4 , 4 3 1 (配列番号 7 5) および Z C 9 , 7 1 9 (配列番号 7 6) と、鋳型として始めの 5 ' R A C E 反応物 (上記) の 1 / 2 0 希釈物 1 μ l とを用いたことを除いて、始めの 5 ' R A C E について上記に記載した P C R 反応条件を用いて行なった。生成物をゲル電気泳動により精製し、D N A を Q i a e x I I A g a r o s e G e l E x t r a c t i o n K i t (Q i a g e n) を用いて希釈し、T O P O T A C l o n i n g K i t (I n v i t r o g e n) を用いてサブクローン化した。ポジティブクローンを、Z C 2 4 , 4 3 1 (配列番号 7 5) および Z C 2 4 , 5 1 1 (配列番号 7 7) それぞれ 1 0 p モルを用いてコロニー P C R により同定した。P C R の反応条件は下記のとおりである。9 4 $^{\circ}\text{C}$ で 2 分間 ; 9 4 $^{\circ}\text{C}$ で 2 0 秒間、6 4 $^{\circ}\text{C}$ で 2 0 秒間、および 7 2 $^{\circ}\text{C}$ で 3 0 秒間を 3 5 サイクル ; 続いて 7 2 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間を 1 サイクル。入れ子 5 ' R A C E 反応物各々からとった 2 つのサブクローンを配列決定した。全てのクローンが若干の z a l p h a l 配列を含有したが、完全なものはなかった。編集された配列

10

20

30

40

50

を、不完全な 5' RACE クローンと、マウスの *zalpha1* ポリヌクレオチドおよび対応するポリペプチドの先行部分の配列を表す 3' エキソン配列（配列番号 70）とから生成させた。部分的なマウスの *zalpha1* cDNA の先行配列は配列番号 78（5' 末端）および配列番号 80（3' 末端）に示され、配列番号 78（5' 末端）と配列番号 80（3' 末端）の間には完全なマウスの *zalpha1* cDNA を含む約 330 個の未知の配列がある（下記を参照）。配列番号 78 および配列番号 80 に対応するアミノ酸配列を、それぞれ配列番号 79（N 末端）および配列番号 81（C 末端）に示す。

【0295】

D. 全長 PCR

プライマーを、全長の PCR に対してマウスの開始 Met の上流 UTR および終止コドンの下流から設計した。プライマー ZC24, 616（配列番号 82）および ZC24, 615（配列番号 83）各 20 p モルを、マウスの樹枝状細胞のマラソン cDNA または新生児マウスの皮膚のインハウス cDNA ライブラリーを鋳型として使用する PCR 反応に用いた。PCR の反応条件は下記のとおりである。94℃で 1 分間；94℃で 20 秒間および 66℃で 2 分間を 30 サイクル；続いて 72℃で 5 分間を 1 サイクル。PCR 生成物をゲル電気泳動により精製し、cDNA を Qiaquick Gel Extraction Kit を用いて希釈し、TA Cloning Kit（Invitrogen）を用いてサブクローン化した。各 PCR 反応物からとった 2 つのサブクローンを配列決定した。用いた配列決定用プライマーは、ZC694（配列番号 87）、ZC3, 424（配列番号 86）、ZC24, 431（配列番号 75）、ZC24, 511（配列番号 77）、ZC24, 806（配列番号 90）、および ZC24, 807（配列番号 91）であった。全長マウスの *zalpha1* cDNA の配列は配列番号 84 に示される。対応するアミノ酸配列は配列番号 85 に示される。

例示のために本明細書に本発明の特殊な実施形態を記述したが、本発明の精神および範囲から逸脱せずにさまざまな改変を行なうことができることは上記の記載から理解されるであろう。したがって本発明は添付の特許請求の範囲によることを除いては限定されない。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 ヒト *zalpha1* の Hopp/Woods 親水性プロットである。

【図 2】 ヒト *zalpha1* (*zalpha*) (配列番号 2) 及びマウス *zalpha1* (*muzalp*) (配列番号 85) のアラインメントである。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> ZymoGenetics, Inc.

<120> CYTOKINE RECEPTOR ZALPHA11

<130> 98-55PC

<150> 09/159,254

<151> 1998-09-23

<150> 09/265,117

<151> 1999-03-09

10

<150> 09/347,930

<151> 1999-07-06

<160> 91

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 2887

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20

<220>

<221> CDS

<222> (69)...(1682)

<400> 1

gaagcagcag gtacccctc cacatcccta gggctctgtg atgtaggcag aggcccgtagg 60

gagtcagc atg ccg cgt ggc tgg gcc gcc ccc ttg ctc ctg ctg ctg ctc 110

Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu

1 5 10

cag gga ggc tgg ggc tgc ccc gac ctc gtc tgc tac acc gat tac ctc 158

Gln Gly Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu

15 20 25 30

cag acg gtc atc tgc atc ctg gaa atg tgg aac ctc cac ccc agc acg 206

Gln Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr

35 40 45

ctc acc ctt acc tgg caa gac cag tat gaa gag ctg aag gac gag gcc 254

Leu Thr Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala		
50 55 60		
acc tcc tgc agc ctc cac agg tcg gcc cac aat gcc acg cat gcc acc	302	
Thr Ser Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr		
65 70 75		
tac acc tgc cac atg gat gta ttc cac ttc atg gcc gac gac att ttc	350	
Tyr Thr Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe		
80 85 90		
agt gtc aac atc aca gac cag tct ggc aac tac tcc cag gag tgt ggc	398	10
Ser Val Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly		
95 100 105 110		
agc ttt ctc ctg gct gag agc atc aag ccg gct ccc cct ttc aac gtg	446	
Ser Phe Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val		
115 120 125		
act gtg acc ttc tca gga cag tat aat atc tcc tgg cgc tca gat tac	494	
Thr Val Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr		
130 135 140		
gaa gac cct gcc ttc tac atg ctg aag ggc aag ctt cag tat gag ctg	542	20
Glu Asp Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu		
145 150 155		
cag tac agg aac cgg gga gac ccc tgg gct gtg agt ccg agg aga aag	590	
Gln Tyr Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys		
160 165 170		
ctg atc tca gtg gac tca aga agt gtc tcc ctc ctc ccc ctg gag ttc	638	
Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe		
175 180 185 190		
cgc aaa gac tcg agc tat gag ctg cag gtg cgg gca ggg ccc atg cct	686	30
Arg Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro		
195 200 205		
ggc tcc tcc tac cag ggg acc tgg agt gaa tgg agt gac ccg gtc atc	734	
Gly Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile		
210 215 220		
ttt cag acc cag tca gag gag tta aag gaa ggc tgg aac cct cac ctg	782	

Phe Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Pro His Leu		
225	230	235
ctg ctt ctc ctc ctg ctt gtc ata gtc ttc att cct gcc ttc tgg agc	830	
Leu Leu Leu Leu Leu Leu Val Ile Val Phe Ile Pro Ala Phe Trp Ser		
240	245	250
ctg aag acc cat cca ttg tgg agg cta tgg aag aag ata tgg gcc gtc	878	
Leu Lys Thr His Pro Leu Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile Trp Ala Val		
255	260	265 270
ccc agc cct gag cgg ttc ttc atg ccc ctg tac aag ggc tgc agc gga	926	10
Pro Ser Pro Glu Arg Phe Phe Met Pro Leu Tyr Lys Gly Cys Ser Gly		
275	280	285
gac ttc aag aaa tgg gtg ggt gca ccc ttc act ggc tcc agc ctg gag	974	
Asp Phe Lys Lys Trp Val Gly Ala Pro Phe Thr Gly Ser Ser Leu Glu		
290	295	300
ctg gga ccc tgg agc cca gag gtg ccc tcc acc ctg gag gtg tac agc	1022	
Leu Gly Pro Trp Ser Pro Glu Val Pro Ser Thr Leu Glu Val Tyr Ser		
305	310	315
tgc cac cca cca cgg agc ccg gcc aag agg ctg cag ctc acg gag cta	1070	20
Cys His Pro Pro Arg Ser Pro Ala Lys Arg Leu Gln Leu Thr Glu Leu		
320	325	330
caa gaa cca gca gag ctg gtg gag tct gac ggt gtg ccc aag ccc agc	1118	
Gln Glu Pro Ala Glu Leu Val Glu Ser Asp Gly Val Pro Lys Pro Ser		
335	340	345 350
ttc tgg ccg aca gcc cag aac tcg ggg ggc tca gct tac agt gag gag	1166	
Phe Trp Pro Thr Ala Gln Asn Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Glu Glu		
355	360	365
agg gat cgg cca tac ggc ctg gtg tcc att gac aca gtg act gtg cta	1214	30
Arg Asp Arg Pro Tyr Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr Val Thr Val Leu		
370	375	380
gat gca gag ggg cca tgc acc tgg ccc tgc agc tgt gag gat gac ggc	1262	
Asp Ala Glu Gly Pro Cys Thr Trp Pro Cys Ser Cys Glu Asp Asp Gly		
385	390	395
tac cca gcc ctg gac ctg gat gct ggc ctg gag ccc agc cca ggc cta	1310	

Tyr Pro Ala Leu Asp Leu Asp Ala Gly Leu Glu Pro Ser Pro Gly Leu		
400	405	410
gag gac cca ctc ttg gat gca ggg acc aca gtc ctg tcc tgt ggc tgt	1358	
Glu Asp Pro Leu Leu Asp Ala Gly Thr Thr Val Leu Ser Cys Gly Cys		
415	420	425 430
gtc tca gct ggc agc cct ggg cta gga ggg ccc ctg gga agc ctc ctg	1406	
Val Ser Ala Gly Ser Pro Gly Leu Gly Gly Pro Leu Gly Ser Leu Leu		
435	440	445
gac aga cta aag cca ccc ctt gca gat ggg gag gac tgg gct ggg gga	1454	10
Asp Arg Leu Lys Pro Pro Leu Ala Asp Gly Glu Asp Trp Ala Gly Gly		
450	455	460
ctg ccc tgg ggt ggc cgg tca cct gga ggg gtc tca gag agt gag gcg	1502	
Leu Pro Trp Gly Gly Arg Ser Pro Gly Gly Val Ser Glu Ser Glu Ala		
465	470	475
ggc tca ccc ctg gcc ggc ctg gat atg gac acg ttt gac agt ggc ttt	1550	
Gly Ser Pro Leu Ala Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly Phe		
480	485	490
gtg ggc tct gac tgc agc agc cct gtg gag tgt gac ttc acc agc ccc	1598	20
Val Gly Ser Asp Cys Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe Thr Ser Pro		
495	500	505 510
ggg gac gaa gga ccc ccc cgg agc tac ctc cgc cag tgg gtg gtc att	1646	
Gly Asp Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val Ile		
515	520	525
cct ccg cca ctt tcg agc cct gga ccc cag gcc agc taatgaggct	1692	
Pro Pro Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser		
530	535	
gactggatgt ccagagctgg ccaggccact gggccctgag ccagagacaa ggtcacctgg	1752	30
gctgtgatgt gaagacacct gcagcctttg gtctcctgga tgggcctttg agcctgatgt	1812	
ttacagtgtc tgtgtgtgtg tgtgcatatg tgtgtgtgtg catatgcatg tgtgtgtgtg	1872	
tgtgtgtctt aggtgcgcag tggcatgtcc acgtgtgtgt gtgattgcac gtgcctgtgg	1932	
gcctgggata aigcccatgg tactccatgc attcacctgc cctgtgcatg tctggactca	1992	
cggagctcac ccatgtgcac aagtgtgcac agtaaacgtg tttgtggtca acagatgaca	2052	
acagccgtcc tccctcctag ggtcttgtgt tgcaagttgg tccacagcat ctccggggct	2112	
ttgtgggac agggcattgc ctgtgactga ggcggagccc agccctccag cgtctgcctc	2172	
caggagctgc aagaagtcca tattgttcct tatcacctgc caacaggaag cgaaagggga	2232	
tggagtgagc ccatggtgac ctcggaatg gcaatTTTTT ggccggcccc tggacgaagg	2292	

```

tctgaatccc gactctgata ccttctggct gtgctacctg agccaagtcg cctcccctct 2352
ctgggctaga gtttccttat ccagacagtg ggggaaggcat gacacacctg ggggaaattg 2412
gcgatgtcac ccgtgtacgg tacgcagccc agagcagacc ctcaataaac gtcagcttcc 2472
ttccttctgc ggccagagcc gaggcgggcg ggggtgagaa catcaatcgt cagcgacagc 2532
ctgggcaccc gcggggccgt cccgcctgca gagggccact cggggggggtt tccaggctta 2592
aaatcagtcg gtttcgtctc ttgaaacag ctccccacca accaagatit ctttttctaa 2652
cttctgctac taagttttta aaaattccct ttatgcaccc aagagatatt tattaaacac 2712
caattacgta gcaggccatg gctcatggga cccacccccc gtggcactca tggagggggc 2772
tgcaggttgg aactatgcag tgtgctccgg ccacacatcc tgctgggccc cctaccctgc 2832
cccaattcaa tcctgccaat aaatcctgtc ttatttggtc atcctggaga attga 2887

```

<210> 2

<211> 538

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 2

```

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

```

20

30

Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Pro His Leu Leu Leu
 225 230 235 240
 Leu Leu Leu Leu Val Ile Val Phe Ile Pro Ala Phe Trp Ser Leu Lys
 245 250 255
 Thr His Pro Leu Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile Trp Ala Val Pro Ser
 260 265 270
 Pro Glu Arg Phe Phe Met Pro Leu Tyr Lys Gly Cys Ser Gly Asp Phe
 275 280 285
 Lys Lys Trp Val Gly Ala Pro Phe Thr Gly Ser Ser Leu Glu Leu Gly
 290 295 300
 Pro Trp Ser Pro Glu Val Pro Ser Thr Leu Glu Val Tyr Ser Cys His
 305 310 315 320
 Pro Pro Arg Ser Pro Ala Lys Arg Leu Gln Leu Thr Glu Leu Gln Glu
 325 330 335
 Pro Ala Glu Leu Val Glu Ser Asp Gly Val Pro Lys Pro Ser Phe Trp
 340 345 350
 Pro Thr Ala Gln Asn Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Glu Glu Arg Asp
 355 360 365
 Arg Pro Tyr Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr Val Thr Val Leu Asp Ala
 370 375 380
 Glu Gly Pro Cys Thr Trp Pro Cys Ser Cys Glu Asp Asp Gly Tyr Pro
 385 390 395 400
 Ala Leu Asp Leu Asp Ala Gly Leu Glu Pro Ser Pro Gly Leu Glu Asp
 405 410 415
 Pro Leu Leu Asp Ala Gly Thr Thr Val Leu Ser Cys Gly Cys Val Ser
 420 425 430
 Ala Gly Ser Pro Gly Leu Gly Gly Pro Leu Gly Ser Leu Leu Asp Arg
 435 440 445
 Leu Lys Pro Pro Leu Ala Asp Gly Glu Asp Trp Ala Gly Gly Leu Pro
 450 455 460
 Trp Gly Gly Arg Ser Pro Gly Gly Val Ser Glu Ser Glu Ala Gly Ser
 465 470 475 480
 Pro Leu Ala Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly Phe Val Gly
 485 490 495
 Ser Asp Cys Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe Thr Ser Pro Gly Asp
 500 505 510
 Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val Ile Pro Pro
 515 520 525
 Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser
 530 535

10

20

30

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>		
<223> consensus amino acid motif		
<221> VARIANT		
<222> (1)...(5)		
<223> Xaa = Any Amino Acid		
<221> VARIANT		
<222> (1)...(5)		
<223> Xaa = Any Amino Acid		
<400> 3		10
Trp Ser Xaa Trp Ser		
1 5		
<210> 4		
<211> 1614		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> degenerate nucleotide sequence of zalpha11		
<221> misc_feature		20
<222> (1)...(1614)		
<223> n = A.T.C or G		
<221> misc_feature		
<222> (1)...(1614)		
<223> n = A.T.C or G		
<400> 4		
atgccnmngn gntgggcngc nccnytnytn ytnytnytny tncarggngg ntggggntgy	60	
ccngayytng tntgytayac ngaytayytn caracngtna thtgyathyt ngaratgtgg	120	
aayytncayc cnwsnacnyt nacnytnacn tggcargayc artaygarga rytnaargay	180	
gargcnacnw sntgywsnyt ncaymgnwsn gcncayaayg cnacncaygc nactayacn	240	
tgycayatgg aygtnttyca yttyatggcn gaygayatht tywsngtnaa yathacngay	300	
carwsnggna aytaywsnca rgartgyggn wsnttyytny tngcngarws nathaarccn	360	
gcncncncnt tyaaaygtnac ngtnacntty wsnggncart ayaayathws ntggmgnwsn	420	
gaytaygarg ayccngcntt ytayatgytn aarggnaary tncartayga rytncartay	480	
mgnaaymgng gngayccntg ggcngtnwsn ccnmgmngna arytnathws ngtngaywsn	540	
mgnwsngtnw snytnytncc nytngartty mgnaargayw snwsntayga rytncargtn	600	
mgngcnggnc cnatgccngg nwsnwsntay carggnacnt ggwsngartg gwsngayccn	660	
gtnathttyc aracncarws ngargarytn aargarggnt ggaayccnca yytnytnytn	720	

30

```

ytnytnytny tngtnathgt nttyathccn gcnttytggw snytnaarac ncayccnytn 780
tggmgnytnnt ggaaraarat htgggcngtn ccnwsnccng armgnttytt yatgccnytn 840
tayaarggnt gywsngnga yttyaaraar tgggtngng cncnttyac nggnwsnwsn 900
ytngarytng gncntggws nccngargtn ccnwsnacny tngargtnta ywsntgy cay 960
ccnccnmgnw snccngcnaa rmgnytncar ytnacngary tncargarcc ngcngarytn 1020
gtngarwsng ayggngtncc naarcnwsn ttytgccna cngcncaraa ywsngngngn 1080
wsngcntayw sngargarmg ngaymgncn tayggnytn twnsnathga yacngtnacn 1140
gtnytngayg cngarggncc ntgyacntgg ccntgywsnt gygargayga yggntayccn 1200
gcnytngayy tngaygcngg nytngarccn wsncnggny tngargaycc nytnytngay 1260
gcnggnacna cngtnytnws ntgygntgy gtnwsngcng gnwsnccngg nytnngnggn 1320
ccnytnngnw snytnytna ymgnytnaar ccncnytn cngayggnga rgaytgggc 1380
ggngnytn cntggngng nmgnwsnccn ggngngtnw sngarwsnga rgcnggnwsn 1440
ccnytnccng gnytngayat ggayacntty gaywsngnt tygtnggnws ngaytgywsn 1500
wsnccngtn artgygaytt yacnwsnccn ggngaygarg gncnccnmg nwsntayytn 1560
mgncartggg tngtnathcc nccncnytn wsnwsnccng gncncargc nwsn 1614

```

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC447

<400> 5

taacaatttc acacagg

17

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC976

<400> 6

cgttgtaaaa cgacggcc

18

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC19345

10

20

30

<400> 7		
gaccagtctg gcaactactc c	21	
<210> 8		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Oligonucleotide primer ZC19346		
<400> 8		10
gctctcagcc aggagaaagc	20	
<210> 9		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Oligonucleotide primer ZC19349		
<400> 9		20
ggttggtggg gagctgtttc	20	20
<210> 10		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Oligonucleotide primer ZC19350		
<400> 10		
gggtgagaac atcaatcgtc	20	
<210> 11		30
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Oligonucleotide primer ZC19458		

<400> 11		
catatcttct tccatagcct c	21	
<210> 12		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Oligonucleotide primer ZC19459		
<400> 12		10
ctcctcctgc ttgtcatagt c	21	
<210> 13		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Oligonucleotide primer ZC19460		
<400> 13		20
gtaaactgtt ttgtggtcaa c	21	
<210> 14		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Oligonucleotide primer ZC19461		
<400> 14		30
tgccctgatc ccacaaagcc	20	
<210> 15		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Oligonucleotide primer ZC19572		
<400> 15		

gtcctgtggc tgtgtctcag	20	
<210> 16		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Oligonucleotide primer ZC19573		
<400> 16		
cagtcagagc ccacaaagcc	20	10
<210> 17		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Oligonucleotide primer ZC19657		
<400> 17		
ctgagacaca gccacaggac	20	20
<210> 18		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Oligonucleotide primer ZC19181		
<400> 18		
tccacatccc tagggctctg tgat	24	
<210> 19		30
<211> 25		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Oligonucleotide primer ZC19182		
<400> 19		
gaggttcac atttcagga tgcag	25	

<210> 20		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Oligonucleotide primer ZC19907		
<400> 20		
atggatgtat tccattcat ggcc	24	
<210> 21		10
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Oligonucleotide primer ZC19908		
<400> 21		
actgtcaaac gtgtccatat ccag	24	
<210> 22		
<211> 18		20
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Oligonucleotide primer ZC19954		
<400> 22		
actgggctgg gggactgc	18	
<210> 23		
<211> 18		
<212> DNA		30
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Oligonucleotide primer ZC19955		
<400> 23		
ccccggggct ggtgaagt	18	

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

 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC17212

 <400> 24
 ggggaattcg aagccatgcc ctcttgggcc ctc 33

 <210> 25 10
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC19914

 <400> 25
 caatggatgg gtcttttagca gcagtaggcc 30

 <210> 26
 <211> 30 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC19913

 <400> 26
 ggcctactgc tgctaaagac ccatccattg 30

 <210> 27
 <211> 33
 <212> DNA 30
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC20097

 <400> 27
 acatctagat tagctggcct ggggtccagg cgt 33

 <210> 28

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC12700

 <400> 28
 ggaggtctat ataagcagag c 21

 <210> 29
 <211> 21 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC5020

 <400> 29
 cactggagtg gcaacttcca g 21

 <210> 30
 <211> 20
 <212> DNA 20
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC6675

 <400> 30
 gtggatgccg aaccagttcc 20

 <210> 31
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 30

 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC7727

 <400> 31
 tgttcacagc tacctgggct c 21

 <210> 32
 <211> 26

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC8290

 <400> 32
 ccaccgagac tgcttgatc accttg 26

 <210> 33
 <211> 21
 <212> DNA 10
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC6622

 <400> 33
 ctgggctgga aactggcaca c 21

 <210> 34
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 20

 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC7736

 <400> 34
 cactgtcaga aatggagc 18

 <210> 35
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220> 30
 <223> Oligonucleotide primer ZC9273

 <400> 35
 ggtccctccc cgggcaccga gaga 24

 <210> 36
 <211> 36
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC19905
 <400> 36
 acaggatccg tcagcatgcc gcgtggctgg gccgcc 36
 <210> 37
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 10
 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC19906
 <400> 37
 acagaattct tagctggcct ggggtccagg cgt 33
 <210> 38
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 20
 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC20114
 <400> 38
 cctgccttct acatgctgaa gg 22
 <210> 39
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC19954 30
 <400> 39
 actgggctgg gggactgc 18
 <210> 40
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC20116

<400> 40
 agcacagtca ctgtgtcaat gg 22

<210> 41
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220> 10
 <223> Glu-Glu (CEE) tag amino acid sequence

<400> 41
 Glu Tyr Met Pro Met Glu
 1 5

<210> 42
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220> 20
 <223> Oligonucleotide primer ZC19931

<400> 42
 ggttggtacc gcaagatgcc gcgtggctgg gccgcc 36

<210> 43
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220> 30
 <223> Oligonucleotide primer ZC19932

<400> 43
 cggaggatcc gtgagggttc cagccttcc 29

<210> 44
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer spanning vector flanking region and the 5' end of the zalphall

<400> 44

tccactttgc ctttctctcc acaggtgtcc agggaattca tcgataatgc cgcgtggctg	60
ggccgc	66

<210> 45

<211> 699

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10

<400> 45

gagcccagat cttcagacaa aactcacaca tgcccaccgt gccagcacc tgaagccgag	60
ggggcaccgt cagtcttcc cttccccca aaaccaagg acacctcat gatctcccgg	120
acccttgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagacctga ggtcaagttc	180
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag	240
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggtctgaat	300
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc catcctccat cgagaaaacc	360
atctccaaag ccaaagggca gcccagagaa ccacaggtgt acacctgcc cccatcccgg	420
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc	480
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct	540
cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc	600
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac	660
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaataa	699

20

<210> 46

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> First Oligonucleotide primer spanning 3' end of the zalphall extracellular domain and the 5' end of Fc4

30

<400> 46

gcacggtggg catgtgtgag ttttgtctga agatctgggc tcgtgagggt tccagccttc	60
ct	62

<210> 47

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Second Oligonucleotide primer spanning 3' end of the zalphal1 extracellular domain and the 5' end of Fc4

<400> 47

agacccagtc agaggagtta aaggaaggct ggaaccctca cgagcccaga tcttcagaca 60
a 61

<210> 48

10

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer spanning the 3' end of Fc4 and the vector flanking region

<400> 48

gtgggcctct ggggtgggta caaccccaga gctgttttaa tctagattat ttacccggag 60
acagggga 67

20

<210> 49

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FLAG tag amino acid sequence

<400> 49

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys
1 5

30

<210> 50

<211> 1821

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polynucleotide encoding MBP-zalphal1 soluble receptor fusion

<221> CDS

<222> (1)...(1821)

<400> 50

atg	aaa	atc	gaa	gaa	ggt	aaa	ctg	gta	atc	tgg	att	aac	ggc	gat	aaa	48
Met	Lys	Ile	Glu	Glu	Gly	Lys	Leu	Val	Ile	Trp	Ile	Asn	Gly	Asp	Lys	
1			5					10					15			

ggc	tat	aac	ggt	ctc	gct	gaa	gtc	ggt	aag	aaa	ttc	gag	aaa	gat	acc	96
Gly	Tyr	Asn	Gly	Leu	Ala	Glu	Val	Gly	Lys	Lys	Phe	Glu	Lys	Asp	Thr	
			20					25				30				

gga	att	aaa	gtc	acc	gtt	gag	cat	ccg	gat	aaa	ctg	gaa	gag	aaa	ttc	144
Gly	Ile	Lys	Val	Thr	Val	Glu	His	Pro	Asp	Lys	Leu	Glu	Glu	Lys	Phe	
		35					40				45					

cca	cag	gtt	gcg	gca	act	ggc	gat	ggc	cct	gac	att	atc	ttc	tgg	gca	192
Pro	Gln	Val	Ala	Ala	Thr	Gly	Asp	Gly	Pro	Asp	Ile	Ile	Phe	Trp	Ala	
	50					55					60					

cac	gac	cg	ttt	ggt	ggc	tac	gct	caa	tct	ggc	ctg	ttg	gct	gaa	atc	240
His	Asp	Arg	Phe	Gly	Gly	Tyr	Ala	Gln	Ser	Gly	Leu	Leu	Ala	Glu	Ile	
65				70				75			80					

acc	ccg	gac	aaa	gcg	ttc	cag	gac	aag	ctg	tat	ccg	ttt	acc	tgg	gat	288
Thr	Pro	Asp	Lys	Ala	Phe	Gln	Asp	Lys	Leu	Tyr	Pro	Phe	Thr	Trp	Asp	
			85					90				95				

gcc	gta	cgt	tac	aac	ggc	aag	ctg	att	gct	tac	ccg	atc	gct	gtt	gaa	336
Ala	Val	Arg	Tyr	Asn	Gly	Lys	Leu	Ile	Ala	Tyr	Pro	Ile	Ala	Val	Glu	
		100					105				110					

gcg	tta	tcg	ctg	att	tat	aac	aaa	gat	ctg	ctg	ccg	aac	ccg	cca	aaa	384
Ala	Leu	Ser	Leu	Ile	Tyr	Asn	Lys	Asp	Leu	Leu	Pro	Asn	Pro	Pro	Lys	
	115					120					125					

acc	tgg	gaa	gag	atc	ccg	gcg	ctg	gat	aaa	gaa	ctg	aaa	gcg	aaa	ggt	432
Thr	Trp	Glu	Glu	Ile	Pro	Ala	Leu	Asp	Lys	Glu	Leu	Lys	Ala	Lys	Gly	
	130					135				140						

aag	agc	gcg	ctg	atg	ttc	aac	ctg	caa	gaa	ccg	tac	ttc	acc	tgg	ccg	480
Lys	Ser	Ala	Leu	Met	Phe	Asn	Leu	Gln	Glu	Pro	Tyr	Phe	Thr	Trp	Pro	
145				150				155						160		

ctg	att	gct	gct	gac	ggg	ggt	tat	gcg	ttc	aag	tat	gaa	aac	ggc	aag	528
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

10

20

30

Leu Ile Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Ala Phe Lys Tyr Glu Asn Gly Lys		
165	170	175
tac gac att aaa gac gtg ggc gtg gat aac gct ggc gcg aaa gcg ggt	576	
Tyr Asp Ile Lys Asp Val Gly Val Asp Asn Ala Gly Ala Lys Ala Gly		
180	185	190
ctg acc ttc ctg gtt gac ctg att aaa aac aaa cac atg aat gca gac	624	
Leu Thr Phe Leu Val Asp Leu Ile Lys Asn Lys His Met Asn Ala Asp		
195	200	205
acc gat tac tcc atc gca gaa gct gcc ttt aat aaa ggc gaa aca gcg	672	10
Thr Asp Tyr Ser Ile Ala Glu Ala Ala Phe Asn Lys Gly Glu Thr Ala		
210	215	220
atg acc atc aac ggc ccg tgg gca tgg tcc aac atc gac acc agc aaa	720	
Met Thr Ile Asn Gly Pro Trp Ala Trp Ser Asn Ile Asp Thr Ser Lys		
225	230	235
gtg aat tat ggt gta acg gta ctg ccg acc ttc aag ggt caa cca tcc	768	
Val Asn Tyr Gly Val Thr Val Leu Pro Thr Phe Lys Gly Gln Pro Ser		
245	250	255
aaa ccg ttc gtt ggc gtg ctg agc gca ggt att aac gcc gcc agt ccg	816	20
Lys Pro Phe Val Gly Val Leu Ser Ala Gly Ile Asn Ala Ala Ser Pro		
260	265	270
aac aaa gag ctg gca aaa gag ttc ctc gaa aac tat ctg ctg act gat	864	
Asn Lys Glu Leu Ala Lys Glu Phe Leu Glu Asn Tyr Leu Leu Thr Asp		
275	280	285
gaa ggt ctg gaa gcg gtt aat aaa gac aaa ccg ctg ggt gcc gta gcg	912	
Glu Gly Leu Glu Ala Val Asn Lys Asp Lys Pro Leu Gly Ala Val Ala		
290	295	300
ctg aag tct tac gag gaa gag ttg gcg aaa gat cca cgt att gcc gcc	960	30
Leu Lys Ser Tyr Glu Glu Glu Leu Ala Lys Asp Pro Arg Ile Ala Ala		
305	310	315
acc atg gaa aac gcc cag aaa ggt gaa atc atg ccg aac atc ccg cag	1008	
Thr Met Glu Asn Ala Gln Lys Gly Glu Ile Met Pro Asn Ile Pro Gln		
325	330	335
atg tcc gct ttc tgg tat gcc gtg cgt act gcg gtg atc aac gcc gcc	1056	

Met Ser Ala Phe Trp Tyr Ala Val Arg Thr Ala Val Ile Asn Ala Ala		
340 345 350		
agc ggt cgt cag act gtc gat gaa gcc ctg aaa gac gcg cag act aat	1104	
Ser Gly Arg Gln Thr Val Asp Glu Ala Leu Lys Asp Ala Gln Thr Asn		
355 360 365		
tcg agc tcc cac cat cac cat cac cac gcg aat tcg gta ccg ctg gtt	1152	
Ser Ser Ser His His His His His His Ala Asn Ser Val Pro Leu Val		
370 375 380		
ccg cgt gga tcc tgc ccc gac ctc gtc tgc tac acc gat tac ctc cag	1200	10
Pro Arg Gly Ser Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln		
385 390 395 400		
acg gtc atc tgc atc ctg gaa atg tgg aac ctc cac ccc agc acg ctc	1248	
Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu		
405 410 415		
acc ctt acc tgg caa gac cag tat gaa gag ctg aag gac gag gcc acc	1296	
Thr Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr		
420 425 430		
tcc tgc agc ctc cac agg tcg gcc cac aat gcc acg cat gcc acc tac	1344	20
Ser Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr		
435 440 445		
acc tgc cac atg gat gta ttc cac ttc atg gcc gac gac att ttc agt	1392	
Thr Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser		
450 455 460		
gtc aac atc aca gac cag tct ggc aac tac tcc cag gag tgt ggc agc	1440	
Val Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser		
465 470 475 480		
ttt ctc ctg gct gag agc atc aag ccg gct ccc cct ttc aac gtg act	1488	30
Phe Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr		
485 490 495		
gtg acc ttc tca gga cag tat aat atc tcc tgg cgc tca gat tac gaa	1536	
Val Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu		
500 505 510		
gac cct gcc ttc tac atg ctg aag ggc aag ctt cag tat gag ctg cag	1584	

Asp Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln
 515 520 525

tac agg aac cgg gga gac ccc tgg gct gtg agt ccg agg aga aag ctg 1632
 Tyr Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu
 530 535 540

atc tca gtg gac tca aga agt gtc tcc ctc ctc ccc ctg gag ttc cgc 1680
 Ile Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg
 545 550 555 560

aaa gac tcg agc tat gag ctg cag gtg cgg gca ggg ccc atg cct ggc 1728 10
 Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly
 565 570 575

tcc tcc tac cag ggg acc tgg agt gaa tgg agt gac ccg gtc atc ttt 1776
 Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe
 580 585 590

cag acc cag tca gag gag tta aag gaa ggc tgg aac cct cac tag 1821
 Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Pro His *
 595 600 605

<210> 51 20
 <211> 606
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<400> 51
 Met Lys Ile Glu Glu Gly Lys Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly Asp Lys
 1 5 10 15
 Gly Tyr Asn Gly Leu Ala Glu Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys Asp Thr
 20 25 30
 Gly Ile Lys Val Thr Val Glu His Pro Asp Lys Leu Glu Glu Lys Phe
 35 40 45
 Pro Gln Val Ala Ala Thr Gly Asp Gly Pro Asp Ile Ile Phe Trp Ala
 50 55 60 30
 His Asp Arg Phe Gly Gly Tyr Ala Gln Ser Gly Leu Leu Ala Glu Ile
 65 70 75 80
 Thr Pro Asp Lys Ala Phe Gln Asp Lys Leu Tyr Pro Phe Thr Trp Asp
 85 90 95
 Ala Val Arg Tyr Asn Gly Lys Leu Ile Ala Tyr Pro Ile Ala Val Glu
 100 105 110
 Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Asn Lys Asp Leu Leu Pro Asn Pro Pro Lys
 115 120 125

Thr Trp Glu Glu Ile Pro Ala Leu Asp Lys Glu Leu Lys Ala Lys Gly
 130 135 140
 Lys Ser Ala Leu Met Phe Asn Leu Gln Glu Pro Tyr Phe Thr Trp Pro
 145 150 155 160
 Leu Ile Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Ala Phe Lys Tyr Glu Asn Gly Lys
 165 170 175
 Tyr Asp Ile Lys Asp Val Gly Val Asp Asn Ala Gly Ala Lys Ala Gly
 180 185 190
 Leu Thr Phe Leu Val Asp Leu Ile Lys Asn Lys His Met Asn Ala Asp
 195 200 205
 Thr Asp Tyr Ser Ile Ala Glu Ala Ala Phe Asn Lys Gly Glu Thr Ala
 210 215 220
 Met Thr Ile Asn Gly Pro Trp Ala Trp Ser Asn Ile Asp Thr Ser Lys
 225 230 235 240
 Val Asn Tyr Gly Val Thr Val Leu Pro Thr Phe Lys Gly Gln Pro Ser
 245 250 255
 Lys Pro Phe Val Gly Val Leu Ser Ala Gly Ile Asn Ala Ala Ser Pro
 260 265 270
 Asn Lys Glu Leu Ala Lys Glu Phe Leu Glu Asn Tyr Leu Leu Thr Asp
 275 280 285
 Glu Gly Leu Glu Ala Val Asn Lys Asp Lys Pro Leu Gly Ala Val Ala
 290 295 300
 Leu Lys Ser Tyr Glu Glu Glu Leu Ala Lys Asp Pro Arg Ile Ala Ala
 305 310 315 320
 Thr Met Glu Asn Ala Gln Lys Gly Glu Ile Met Pro Asn Ile Pro Gln
 325 330 335
 Met Ser Ala Phe Trp Tyr Ala Val Arg Thr Ala Val Ile Asn Ala Ala
 340 345 350
 Ser Gly Arg Gln Thr Val Asp Glu Ala Leu Lys Asp Ala Gln Thr Asn
 355 360 365
 Ser Ser Ser His His His His His His Ala Asn Ser Val Pro Leu Val
 370 375 380
 Pro Arg Gly Ser Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln
 385 390 395 400
 Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu
 405 410 415
 Thr Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr
 420 425 430
 Ser Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr
 435 440 445

 Thr Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser
 450 455 460
 Val Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser
 465 470 475 480

10

20

30

Phe Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr
 485 490 495
 Val Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu
 500 505 510
 Asp Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln
 515 520 525
 Tyr Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu
 530 535 540
 Ile Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg
 545 550 555 560
 Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly
 565 570 575
 Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe
 580 585 590
 Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Pro His
 595 600 605

<210> 52

<211> 657

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10

<400> 52

tgccccgacc tcgtctgcta caccgattac ctccagacgg tcatctgcat cctggaaatg	60
tggaacctcc accccagcac gctcaccctt acctggcaag accagtatga agagctgaag	120
gacgaggcca cctcctgcag cctccacagg tcggcccaca atgccacgca tgccacctac	180
acctgccaca tggatgtatt ccacttcatg gccgacgaca ttttcagtgt caacatcaca	240
gaccagtctg gcaactactc ccaggagtgt ggcagcttct tcctggctga gagcatcaag	300
ccggctcccc ctttcaacgt gactgtgacc ttctcaggac agtataatat ctctggcgc	360
tcagattacg aagaccctgc cttctacatg ctgaaggcca agcttcagta tgagctgcag	420
tacaggaacc ggggagaccc ctgggctgtg agtccgagga gaaagctgat ctcagtggac	480
tcaagaagtg tctccctcct cccctggag ttccgcaaag actcgagcta tgagctgcag	540
gtgcgggcag ggcccatgcc tggctcctcc taccagggga cctggagtga atggagtgc	600
ccggtcatct ttcagacca gtcagaggag ttaaagggaag gctggaacct tcactag	657

20

<210> 53

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC20187

<400> 53

tcaccacgcg aattcggtac cgctgggtcc gcgtggaacc tgccccgacc tcgtctgcta	60
---	----

caccg

65

<210> 54
 <211> 68
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC20185

<400> 54
 tctgtatcag gctgaaaatc ttatctcatc cgccaaaaca ctagtgaggg ttccagcctt 60 10
 cctttaac 68

<210> 55
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC19372

<400> 55
 tgtcgatgaa gccctgaaag acgcgcagac taattcgagc 40 20

<210> 56
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC19351

<400> 56
 acgcgcagac taattcgagc tcccaccatc accatcacca cgccaattcg gtaccgctgg 60 30

<210> 57
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC19352

<400> 57

actcactata gggcgaattg cccgggggat ccacgcggaa ccagcggtag cgaattcgcg 60

<210> 58
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC19371

<400> 58
 acggccagtg aattgtaata cgactcacta tagggcgaat tg 42 10

<210> 59
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC22277

<400> 59
 ccaggagtgt ggcagctttc 20 20

<210> 60
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC22276

<400> 60
 gcttgccctt cagcatgtag a 21

<210> 61 30
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> zalpha11 TaqMan probe. ZG31

<400> 61
 cggctcccc tttaacgtg act 23

<210> 62		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Oligonucleotide primer ZC23684		
<400> 62		
tcacccttac ctggcaagac	20	
<210> 63		10
<211> 41		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Oligonucleotide primer ZC23656		
<400> 63		
taatacgact cactataggg agggggagac acttcttgag t	41	
<210> 64		20
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Oligonucleotide primer ZC23685		
<400> 64		
aggtctgaat cccgactctg	20	
<210> 65		30
<211> 41		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Oligonucleotide primer ZC23657		
<400> 65		
taatacgact cactataggg aggacgtaat tgggtgttaa t	41	

<210> 66
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleotide primer, rRNA forward primer

 <400> 66
 cggctaccac atccaaggaa 20

 <210> 67 10
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleotide primer, rRNA reverse primer

 <400> 67
 gctggaatta ccgcggct 18

 <210> 68
 <211> 22 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> rRNA TaqMan probe

 <400> 68
 tgctggcacc agacttgccc tc 22

 <210> 69
 <211> 1298
 <212> DNA 30
 <213> Mus musculus

 <220>
 <221> CDS
 <222> (543)...(1262)

 <400> 69
 aggcctttca acacggcttt ttagtaattc attccatcta taaacattta tggtagacct 60
 actgtgtgcc aggtactgag gacacagttg tgatcagggc tagtgtagac acacaagcaa 120

aactagagac atccggaagt gtcaggagac ggagtagagg ctgggccact tagacctcag	180	
gctctccctg cacacgtcct caagacctta ggacttagga acctgggtccc agcaccacgc	240	
tgttccttgg ctggggcact ggtaactagc gtggatatga gacagaggac agtcagtcct	300	
tactaaaggt gggaacacgg gctctgagaa cggacagtat tgggaaccca ctgggcaggg	360	
ggttcacaga cagacatcat ggcgcgtct ctctctctct ctctctctctg tttcttgtt	420	
cttctgcttt ccccgctctt ggcttgtccc tgtactcccc ccccccacccc catctttggc	480	
tctctctgtt cacacccgac cttgttgtcc ccagctcatg actgtgtgtt tctttctcat	540	
ag aaa tgg gtt aat acc cct ttc acg gcc tcc agc ata gag ttg gtg	587	
Lys Trp Val Asn Thr Pro Phe Thr Ala Ser Ser Ile Glu Leu Val		
1 5 10 15		
cca cag agt tcc aca aca aca tca gcc tta cat ctg tca ttg tat cca	635	10
Pro Gln Ser Ser Thr Thr Thr Ser Ala Leu His Leu Ser Leu Tyr Pro		
20 25 30		
gcc aag gag aag aag ttc ccg ggg ctg ccg ggt ctg gaa gag caa ctg	683	
Ala Lys Glu Lys Lys Phe Pro Gly Leu Pro Gly Leu Glu Glu Gln Leu		
35 40 45		
gag tgt gat gga atg tct gag cct ggt cac tgg tgc ata atc ccc ttg	731	
Glu Cys Asp Gly Met Ser Glu Pro Gly His Trp Cys Ile Ile Pro Leu		
50 55 60		
gca gct ggc caa gcg gtc tca gcc tac agt gag gag aga gac cgg cca	779	20
Ala Ala Gly Gln Ala Val Ser Ala Tyr Ser Glu Glu Arg Asp Arg Pro		
65 70 75		
tat ggt ctg gtg tcc att gac aca gtg act gtg gga gat gca gag ggc	827	
Tyr Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr Val Thr Val Gly Asp Ala Glu Gly		
80 85 90 95		
ctg tgt gtc tgg ccc tgt agc tgt gag gat gat ggc tat cca gcc atg	875	
Leu Cys Val Trp Pro Cys Ser Cys Glu Asp Asp Gly Tyr Pro Ala Met		
100 105 110		
aac ctg gat gct ggc cga gag tct ggc cct aat tca gag gat ctg ctc	923	30
Asn Leu Asp Ala Gly Arg Glu Ser Gly Pro Asn Ser Glu Asp Leu Leu		
115 120 125		
ttg gtc aca gac cct gct ttt ctg tct tgc ggc tgt gtc tca ggt agt	971	
Leu Val Thr Asp Pro Ala Phe Leu Ser Cys Gly Cys Val Ser Gly Ser		
130 135 140		
ggc ctc agg ctt gga ggc tcc cca ggc agc cta ctg gac agg ttg agg	1019	

Gly Leu Arg Leu Gly Gly Ser Pro Gly Ser Leu Leu Asp Arg Leu Arg
 145 150 155

ctg tca ttt gca aag gaa ggg gac tgg aca gca gac cca acc tgg aga 1067
 Leu Ser Phe Ala Lys Glu Gly Asp Trp Thr Ala Asp Pro Thr Trp Arg
 160 165 170 175

act ggg tcc cca gga ggg ggc tct gag agt gaa gca ggt tcc ccc cct 1115
 Thr Gly Ser Pro Gly Gly Gly Ser Glu Ser Glu Ala Gly Ser Pro Pro
 180 185 190

ggt ctg gac atg gac aca ttt gac agt ggc ttt gca ggt tca gac tgt 1163 10
 Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly Phe Ala Gly Ser Asp Cys
 195 200 205

ggc agc ccc gtg gag act gat gaa gga ccc cct cga agc tat ctc cgc 1211
 Gly Ser Pro Val Glu Thr Asp Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg
 210 215 220

cag tgg gtg gtc agg acc cct cca cct gtg gac agt gga gcc cag agc 1259
 Gln Trp Val Val Arg Thr Pro Pro Pro Val Asp Ser Gly Ala Gln Ser
 225 230 235

agc tagcatataa taaccagcta tagtgagaag aggcct 1298 20
 Ser
 240

<210> 70

<211> 240

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 70

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

30

Cys Val Trp Pro Cys Ser Cys Glu Asp Asp Gly Tyr Pro Ala Met Asn
 100 105 110
 Leu Asp Ala Gly Arg Glu Ser Gly Pro Asn Ser Glu Asp Leu Leu Leu
 115 120 125
 Val Thr Asp Pro Ala Phe Leu Ser Cys Gly Cys Val Ser Gly Ser Gly
 130 135 140
 Leu Arg Leu Gly Gly Ser Pro Gly Ser Leu Leu Asp Arg Leu Arg Leu
 145 150 155 160
 Ser Phe Ala Lys Glu Gly Asp Trp Thr Ala Asp Pro Thr Trp Arg Thr
 165 170 175
 Gly Ser Pro Gly Gly Gly Ser Glu Ser Glu Ala Gly Ser Pro Pro Gly
 180 185 190
 Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly Phe Ala Gly Ser Asp Cys Gly
 195 200 205
 Ser Pro Val Glu Thr Asp Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln
 210 215 220
 Trp Val Val Arg Thr Pro Pro Pro Val Asp Ser Gly Ala Gln Ser Ser
 225 230 235 240

10

<210> 71
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

20

<220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC24432

<400> 71
 atgtctgagc ctggtcactg gtg 23

<210> 72
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC24433

30

<400> 72
 tctgaacctg caagccact gtc 23

<210> 73
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer ZC9739

<400> 73
ccatcctaatacgcactcact atagggc 27

<210> 74
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220> 10
<223> Oligonucleotide primer ZC24434

<400> 74
caccagtgcac caggctcaga ca 22

<210> 75
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer ZC24431 20

<400> 75
ccatcacact ccagttgctc ttc 23

<210> 76
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer ZC9719

<400> 76 30
actcactata gggctcgagc ggc 23

<210> 77
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC24511

<400> 77

tccagcatag agttggtgcc aca

23

<210> 78

<211> 592

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

10

<221> CDS

<222> (436)...(592)

<400> 78

cgcccgggca ggtctccgct ggtggccctg tgtttcagtc gcgcacagct gtctgcccac 60
 ttctcctgtg gtgtgcctca cggtcacttg cttgtctgac cgcaagtctg cccatccctg 120
 gggcagccaa ctggcctcag cccgtgcccc aggcgtgccc tgtctctgtc tggctgcccc 180
 agccctactg tcttctctgt ttaggctctt gccagatgc ccggtggtc ctcagcctca 240
 ggactatctc agcagtgact cccctgattc tggacttgca cctgactgaa ctctgcccc 300
 cctcaaacct tcacctccca ccaccaccac tccgagtccc gctgtgactc ccacgcccag 360
 gagaccaccc aagtgcccga gcctaaagaa tggctttctg aggaagatcc tgaaggagta 420
 ggtctgggac acagc atg ccc cgg ggc cca gtg gct gcc tta ctc ctg ctg 471
 Met Pro Arg Gly Pro Val Ala Ala Leu Leu Leu Leu
 1 5 10

20

att ctc cat gga gct tgg agc tgc ctg grc ctc act tgc tac act gac 519
 Ile Leu His Gly Ala Trp Ser Cys Leu Xaa Leu Thr Cys Tyr Thr Asp
 15 20 25

tac ctc tgg acc atc acc tgt gtc ctg gag aca cgg agc ccc aac ccc 567
 Tyr Leu Trp Thr Ile Thr Cys Val Leu Glu Thr Arg Ser Pro Asn Pro
 30 35 40

agc ata ctc agt ctc acc tgg caa g 592
 Ser Ile Leu Ser Leu Thr Trp Gln
 45 50

30

<210> 79

<211> 52

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> VARIANT
 <222> (1)...(51)
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 79
 Met Pro Arg Gly Pro Val Ala Ala Leu Leu Leu Leu Ile Leu His Gly
 1 5 10 15
 Ala Trp Ser Cys Leu Xaa Leu Thr Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Trp Thr
 20 25 30
 Ile Thr Cys Val Leu Glu Thr Arg Ser Pro Asn Pro Ser Ile Leu Ser
 35 40 45
 Leu Thr Trp Gln
 50

10

<210> 80
 <211> 1229
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (3)...(1196)

<400> 80
 ga cgc tat gat atc tcc tgg gac tca gct tat gac gaa ccc tcc aac 47
 Arg Tyr Asp Ile Ser Trp Asp Ser Ala Tyr Asp Glu Pro Ser Asn
 1 5 10 15
 tac gtg ctg aga ggc aag cta caa tat gag ctg cag tat cgg aac ctc 95
 Tyr Val Leu Arg Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Leu
 20 25 30
 aga gac ccc tat gct gtg agg ccg gtg acc aag ctg atc tca gtg gac 143
 Arg Asp Pro Tyr Ala Val Arg Pro Val Thr Lys Leu Ile Ser Val Asp
 35 40 45
 tca aga aac gtc tct ctt ctc cct gaa gag ttc cac aaa gat tct agc 191
 Ser Arg Asn Val Ser Leu Leu Pro Glu Glu Phe His Lys Asp Ser Ser
 50 55 60
 tac cag ctg cag atg cgg gca gcg cct cag cca ggc act tca ttc agg 239
 Tyr Gln Leu Gln Met Arg Ala Ala Pro Gln Pro Gly Thr Ser Phe Arg
 65 70 75
 ggg acc tgg agt gag tgg agt gac ccc gtc atc ttt cgg acc cag gct 287

20

30

Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Arg Thr Gln Ala		
80	85	90 95
ggg gag ccc gag gca ggc tgg gac cct cac atg ctg ctg ctc ctg gct	335	
Gly Glu Pro Glu Ala Gly Trp Asp Pro His Met Leu Leu Leu Leu Ala		
100	105	110
gtc ttg atc att gtc ctg gtt ttc atg ggt ctg aag atc cac ctg cct	383	
Val Leu Ile Ile Val Leu Val Phe Met Gly Leu Lys Ile His Leu Pro		
115	120	125
tgg agg cta tgg aaa aag ata tgg gca cca gtg ccc acc cct gag agt	431	10
Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile Trp Ala Pro Val Pro Thr Pro Glu Ser		
130	135	140
ttc ttc cag ccc ctg tgc agg gag cac agc ggg aac ttc aag aaa tgg	479	
Phe Phe Gln Pro Leu Cys Arg Glu His Ser Gly Asn Phe Lys Lys Trp		
145	150	155
gtt aat acc cct ttc acg gcc tcc agc ata gag ttg gtg cca cag agt	527	
Val Asn Thr Pro Phe Thr Ala Ser Ser Ile Glu Leu Val Pro Gln Ser		
160	165	170 175
tcc aca aca aca tca gcc tta cat ctg tca ttg tat cca gcc aag gag	575	20
Ser Thr Thr Thr Ser Ala Leu His Leu Ser Leu Tyr Pro Ala Lys Glu		
180	185	190
aag aag ttc ccg ggg ctg ccg ggt ctg gaa gag caa ctg gag tgt gat	623	
Lys Lys Phe Pro Gly Leu Pro Gly Leu Glu Glu Gln Leu Glu Cys Asp		
195	200	205
gga atg tct gag cct ggt cac tgg tgc ata atc ccc ttg gca gct ggc	671	
Gly Met Ser Glu Pro Gly His Trp Cys Ile Ile Pro Leu Ala Ala Gly		
210	215	220
caa gcg gtc tca gcc tac agt gag gag aga gac cgg cca tat ggt ctg	719	30
Gln Ala Val Ser Ala Tyr Ser Glu Glu Arg Asp Arg Pro Tyr Gly Leu		
225	230	235
gtg tcc att gac aca gtg act gtg gga gat gca gag ggc ctg tgt gtc	767	
Val Ser Ile Asp Thr Val Thr Val Gly Asp Ala Glu Gly Leu Cys Val		
240	245	250 255
tgg ccc tgt agc tgt gag gat gat ggc tat cca gcc atg aac ctg gat	815	

[illegible]

Val Leu Arg Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Leu Arg
 20 25 30
 Asp Pro Tyr Ala Val Arg Pro Val Thr Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser
 35 40 45
 Arg Asn Val Ser Leu Leu Pro Glu Glu Phe His Lys Asp Ser Ser Tyr
 50 55 60
 Gln Leu Gln Met Arg Ala Ala Pro Gln Pro Gly Thr Ser Phe Arg Gly
 65 70 75 80
 Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Arg Thr Gln Ala Gly
 85 90 95
 Glu Pro Glu Ala Gly Trp Asp Pro His Met Leu Leu Leu Leu Ala Val
 100 105 110
 Leu Ile Ile Val Leu Val Phe Met Gly Leu Lys Ile His Leu Pro Trp
 115 120 125
 Arg Leu Trp Lys Lys Ile Trp Ala Pro Val Pro Thr Pro Glu Ser Phe
 130 135 140
 Phe Gln Pro Leu Cys Arg Glu His Ser Gly Asn Phe Lys Lys Trp Val
 145 150 155 160
 Asn Thr Pro Phe Thr Ala Ser Ser Ile Glu Leu Val Pro Gln Ser Ser
 165 170 175
 Thr Thr Thr Ser Ala Leu His Leu Ser Leu Tyr Pro Ala Lys Glu Lys
 180 185 190
 Lys Phe Pro Gly Leu Pro Gly Leu Glu Glu Gln Leu Glu Cys Asp Gly
 195 200 205
 Met Ser Glu Pro Gly His Trp Cys Ile Ile Pro Leu Ala Ala Gly Gln
 210 215 220
 Ala Val Ser Ala Tyr Ser Glu Glu Arg Asp Arg Pro Tyr Gly Leu Val
 225 230 235 240
 Ser Ile Asp Thr Val Thr Val Gly Asp Ala Glu Gly Leu Cys Val Trp
 245 250 255
 Pro Cys Ser Cys Glu Asp Asp Gly Tyr Pro Ala Met Asn Leu Asp Ala
 260 265 270
 Gly Arg Glu Ser Gly Pro Asn Ser Glu Asp Leu Leu Leu Val Thr Asp
 275 280 285
 Pro Ala Phe Leu Ser Cys Gly Cys Val Ser Gly Ser Gly Leu Arg Leu
 290 295 300
 Gly Gly Ser Pro Gly Ser Leu Leu Asp Arg Leu Arg Leu Ser Phe Ala
 305 310 315 320
 Lys Glu Gly Asp Trp Thr Ala Asp Pro Thr Trp Arg Thr Gly Ser Pro
 325 330 335

 Gly Gly Gly Ser Glu Ser Glu Ala Gly Ser Pro Pro Gly Leu Asp Met
 340 345 350
 Asp Thr Phe Asp Ser Gly Phe Ala Gly Ser Asp Cys Gly Ser Pro Val
 355 360 365

10

20

30

Glu Thr Asp Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val
 370 375 380
 Arg Thr Pro Pro Pro Val Asp Ser Gly Ala Gln Ser Ser
 385 390 395

<210> 82
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC24616

10

<400> 82
 ctgcccacct caaaccttca cct 23

<210> 83
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC24615

20

<400> 83
 atgctagctg ctctgggctc cact 24

<210> 84
 <211> 1735
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (143)...(1729)

30

<400> 84
 ctgcccacct caaaccttca cctcccacca ccaccactcc gagtcccgt gtgactccca 60
 cgcccaggag accaccaag tgcccagcc taaagaatgg cttctgaga aagaccctga 120
 aggagtaggt ctgggacaca gc atg ccc cgg ggc cca gtg gct gcc tta ctc 172

Met Pro Arg Gly Pro Val Ala Ala Leu Leu
 1 5 10

ctg ctg att ctc_cat gga gct tgg agc tgc ctg gac ctc act tgc tac 220

Leu Leu Ile Leu His Gly Ala Trp Ser Cys Leu Asp Leu Thr Cys Tyr		
15 20 25		
act gac tac ctc tgg acc atc acc tgt gtc ctg gag aca cgg agc ccc	268	
Thr Asp Tyr Leu Trp Thr Ile Thr Cys Val Leu Glu Thr Arg Ser Pro		
30 35 40		
aac ccc agc ata ctc agt ctc acc tgg caa gat gaa tat gag gaa ctt	316	
Asn Pro Ser Ile Leu Ser Leu Thr Trp Gln Asp Glu Tyr Glu Glu Leu		
45 50 55		
cag gac caa gag acc ttc tgc agc cta cac agg tct ggc cac aac acc	364	10
Gln Asp Gln Glu Thr Phe Cys Ser Leu His Arg Ser Gly His Asn Thr		
60 65 70		
aca cat ata tgg tac acg tgc cat atg cgc ttg tct caa ttc ctg tcc	412	
Thr His Ile Trp Tyr Thr Cys His Met Arg Leu Ser Gln Phe Leu Ser		
75 80 85 90		
gat gaa gtt ttc att gtc aat gtg acg gac cag tct ggc aac aac tcc	460	
Asp Glu Val Phe Ile Val Asn Val Thr Asp Gln Ser Gly Asn Asn Ser		
95 100 105		
caa gag tgt ggc agc ttt gtc ctg gct gag agc atc aaa cca gct ccc	508	20
Gln Glu Cys Gly Ser Phe Val Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro		
110 115 120		
ccc ttg aac gtg act gtg gcc ttc tca gga cgc tat gat atc tcc tgg	556	
Pro Leu Asn Val Thr Val Ala Phe Ser Gly Arg Tyr Asp Ile Ser Trp		
125 130 135		
gac tca gct tat gac gaa ccc tcc aac tac gtg ctg agg ggc aag cta	604	
Asp Ser Ala Tyr Asp Glu Pro Ser Asn Tyr Val Leu Arg Gly Lys Leu		
140 145 150		
caa tat gag ctg cag tat cgg aac ctc aga gac ccc tat gct gtg agg	652	30
Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Leu Arg Asp Pro Tyr Ala Val Arg		
155 160 165 170		
ccg gtg acc aag ctg atc tca gtg gac tca aga aac gtc tct ctt ctc	700	
Pro Val Thr Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Asn Val Ser Leu Leu		
175 180 185		
cct gaa gag ttc cac aaa gat tct agc tac cag ctg cag gtg cgg gca	748	

Pro Glu Glu Phe His Lys Asp Ser Ser Tyr Gln Leu Gln Val Arg Ala		
190	195	200
gcg cct cag cca ggc act tca ttc agg ggg acc tgg agt gag tgg agt	796	
Ala Pro Gln Pro Gly Thr Ser Phe Arg Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser		
205	210	215
gac ccc gtc atc ttt cag acc cag gct ggg gag ccc gag gca ggc tgg	844	
Asp Pro Val Ile Phe Gln Thr Gln Ala Gly Glu Pro Glu Ala Gly Trp		
220	225	230
gac cct cac atg ctg ctg ctc ctg gct gtc ttg atc att gtc ctg gtt	892	10
Asp Pro His Met Leu Leu Leu Leu Ala Val Leu Ile Ile Val Leu Val		
235	240	245
ttc atg ggt ctg aag atc cac ctg cct tgg agg cta tgg aaa aag ata	940	
Phe Met Gly Leu Lys Ile His Leu Pro Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile		
255	260	265
tgg gca cca gtg ccc acc cct gag agt ttc ttc cag ccc ctg tac agg	988	
Trp Ala Pro Val Pro Thr Pro Glu Ser Phe Phe Gln Pro Leu Tyr Arg		
270	275	280
gag cac agc ggg aac ttc aag aaa tgg gtt aat acc cct ttc acg gcc	1036	20
Glu His Ser Gly Asn Phe Lys Lys Trp Val Asn Thr Pro Phe Thr Ala		
285	290	295
tcc agc ata gag ttg gtg cca cag agt tcc aca aca aca tca gcc tta	1084	
Ser Ser Ile Glu Leu Val Pro Gln Ser Ser Thr Thr Thr Ser Ala Leu		
300	305	310
cat ctg tca ttg tat cca gcc aag gag aag aag ttc ccg ggg ctg ccg	1132	
His Leu Ser Leu Tyr Pro Ala Lys Glu Lys Lys Phe Pro Gly Leu Pro		
315	320	325
ggt ctg gaa gag caa ctg gag tgt gat gga atg tct gag cct ggt cac	1180	30
Gly Leu Glu Glu Gln Leu Glu Cys Asp Gly Met Ser Glu Pro Gly His		
335	340	345
tgg tgc ata atc ccc ttg gca gct ggc caa gcg gtc tca gcc tac agt	1228	
Trp Cys Ile Ile Pro Leu Ala Ala Gly Gln Ala Val Ser Ala Tyr Ser		
350	355	360
gag gag aga gac _cgg cca tat ggt ctg gtg tcc att gac aca gtg act	1276	

Glu Glu Arg Asp Arg Pro Tyr Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr Val Thr		
365	370	375
gtg gga gat gca gag ggc ctg tgt gtc tgg ccc tgt agc tgt gag gat	1324	
Val Gly Asp Ala Glu Gly Leu Cys Val Trp Pro Cys Ser Cys Glu Asp		
380	385	390
gat ggc tat cca gcc atg aac ctg gat gct ggc cga gag tct ggc cct	1372	
Asp Gly Tyr Pro Ala Met Asn Leu Asp Ala Gly Arg Glu Ser Gly Pro		
395	400	405 410
aat tca gag gat ctg ctc ttg gtc aca gac cct gct ttt ctg tct tgc	1420	10
Asn Ser Glu Asp Leu Leu Leu Val Thr Asp Pro Ala Phe Leu Ser Cys		
415	420	425
ggc tgt gtc tca ggt agt ggt ctc agg ctt gga ggc tcc cca ggc agc	1468	
Gly Cys Val Ser Gly Ser Gly Leu Arg Leu Gly Gly Ser Pro Gly Ser		
430	435	440
cta ctg gac agg ttg agg ctg tca ttt gca aag gaa ggg gac tgg aca	1516	
Leu Leu Asp Arg Leu Arg Leu Ser Phe Ala Lys Glu Gly Asp Trp Thr		
445	450	455
gca gac cca acc tgg aga act ggg tcc cca gga ggg ggc tct gag agt	1564	20
Ala Asp Pro Thr Trp Arg Thr Gly Ser Pro Gly Gly Gly Ser Glu Ser		
460	465	470
gaa gca ggt tcc ccc cct ggt ctg gac atg gac aca ttt gac agt ggc	1612	
Glu Ala Gly Ser Pro Pro Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly		
475	480	485 490
ttt gca ggt tca gac tgt ggc agc ccc gtg gag act gat gaa gga ccc	1660	
Phe Ala Gly Ser Asp Cys Gly Ser Pro Val Glu Thr Asp Glu Gly Pro		
495	500	505
cct cga agc tat ctc cgc cag tgg gtg gtc agg acc cct cca cct gtg	1708	30
Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val Arg Thr Pro Pro Pro Val		
510	515	520
gac agt gga gcc cag agc agc tagcat	1735	
Asp Ser Gly Ala Gln Ser Ser		
525		

<211> 529

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 85

Met Pro Arg Gly Pro Val Ala Ala Leu Leu Leu Leu Ile Leu His Gly
 1 5 10 15
 Ala Trp Ser Cys Leu Asp Leu Thr Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Trp Thr
 20 25 30
 Ile Thr Cys Val Leu Glu Thr Arg Ser Pro Asn Pro Ser Ile Leu Ser
 35 40 45
 Leu Thr Trp Gln Asp Glu Tyr Glu Glu Leu Gln Asp Gln Glu Thr Phe
 50 55 60
 Cys Ser Leu His Arg Ser Gly His Asn Thr Thr His Ile Trp Tyr Thr
 65 70 75 80
 Cys His Met Arg Leu Ser Gln Phe Leu Ser Asp Glu Val Phe Ile Val
 85 90 95
 Asn Val Thr Asp Gln Ser Gly Asn Asn Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe
 100 105 110
 Val Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Leu Asn Val Thr Val
 115 120 125
 Ala Phe Ser Gly Arg Tyr Asp Ile Ser Trp Asp Ser Ala Tyr Asp Glu
 130 135 140
 Pro Ser Asn Tyr Val Leu Arg Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
 145 150 155 160
 Arg Asn Leu Arg Asp Pro Tyr Ala Val Arg Pro Val Thr Lys Leu Ile
 165 170 175
 Ser Val Asp Ser Arg Asn Val Ser Leu Leu Pro Glu Glu Phe His Lys
 180 185 190
 Asp Ser Ser Tyr Gln Leu Gln Val Arg Ala Ala Pro Gln Pro Gly Thr
 195 200 205
 Ser Phe Arg Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln
 210 215 220
 Thr Gln Ala Gly Glu Pro Glu Ala Gly Trp Asp Pro His Met Leu Leu
 225 230 235 240
 Leu Leu Ala Val Leu Ile Ile Val Leu Val Phe Met Gly Leu Lys Ile
 245 250 255
 His Leu Pro Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile Trp Ala Pro Val Pro Thr
 260 265 270
 Pro Glu Ser Phe Phe Gln Pro Leu Tyr Arg Glu His Ser Gly Asn Phe
 275 280 285
 Lys Lys Trp Val Asn Thr Pro Phe Thr Ala Ser Ser Ile Glu Leu Val
 290 295 300
 Pro Gln Ser Ser Thr Thr Thr Ser Ala Leu His Leu Ser Leu Tyr Pro
 305 310 315 320

10

20

30

20

30

 $\langle 220 \rangle$

<223> Oligonucleotide primer ZC694
 <400> 87
 taatacgact cactataggg 20
 <210> 88
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC24399 10
 <400> 88
 agcgggtctca gcctacagt 20
 <210> 89
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC24400 20
 <400> 89
 tgagctgggg acaacaagg 20
 <210> 90
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC24806
 <400> 90 30
 tgacgaaccc tccaactacg 20
 <210> 91
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC24807
 <400> 91
 tgctctcagc caggacaaag 20

【図 1 A】

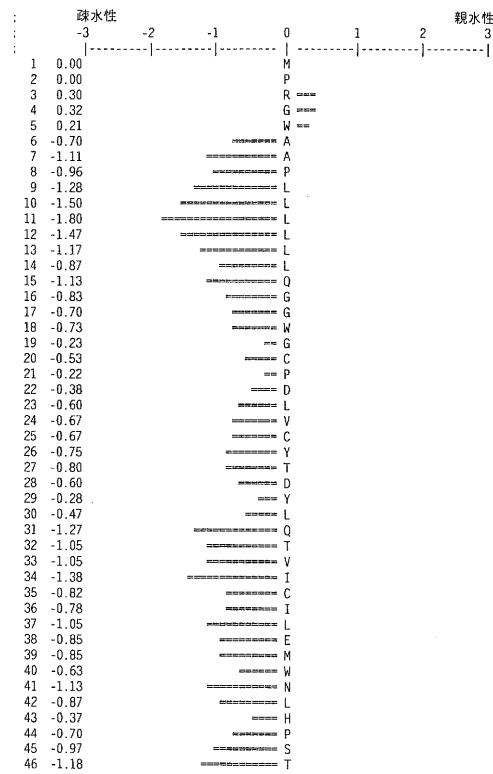


FIG. 1A

【図 1 B】

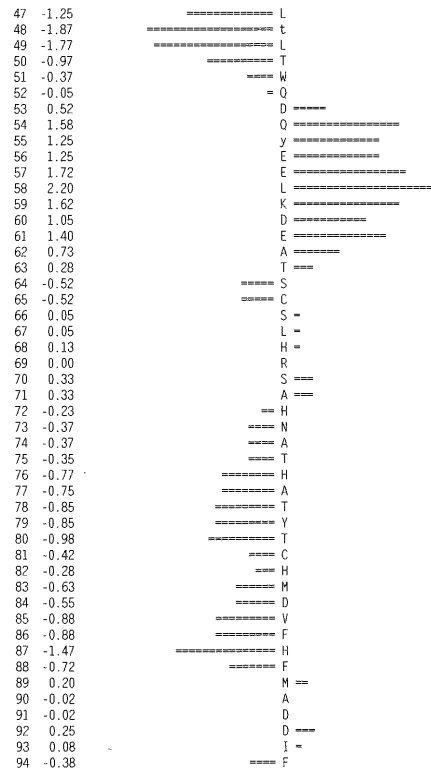


FIG. 1B

【図 1 C】

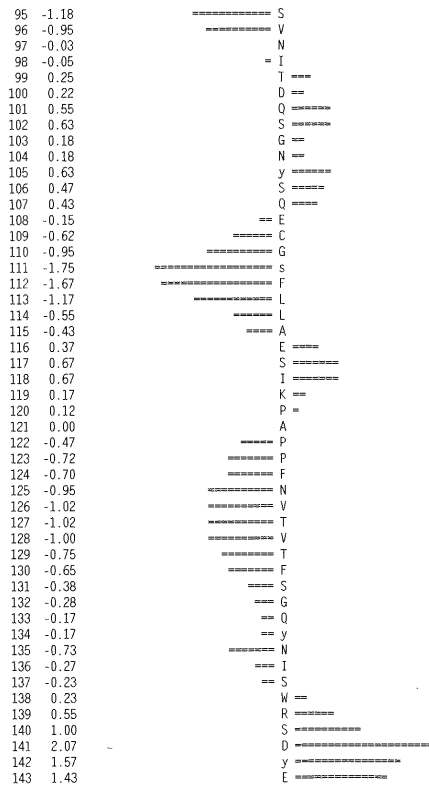


FIG. 1C

【図 1 D】

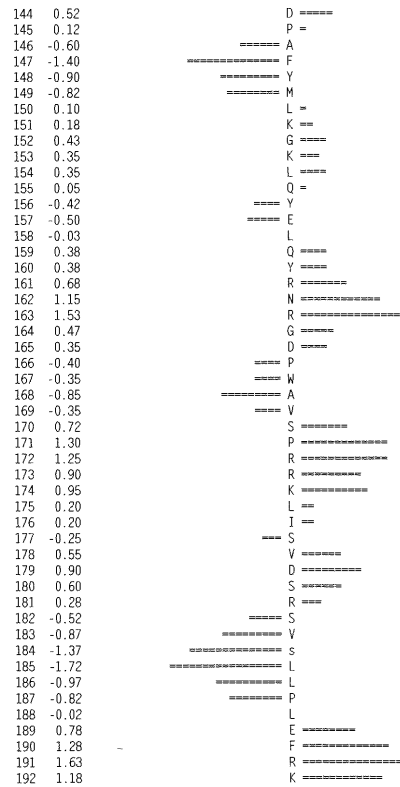


FIG. 1D

【図 1 E】

193	1.62	D	=====
194	1.62	S	=====
195	0.82		
196	0.35	Y	=====
197	0.05	E	=====
198	0.50	L	=====
199	0.40	Q	=====
200	-0.10	= V	
201	0.20	R	=====
202	-0.05	A	=====
203	0.20	G	=====
204	-0.30	== P	
205	-0.17	== M	
206	-0.12	= P	
207	-0.10	= G	
208	0.15	S	=====
209	0.15	S	=====
210	0.08	y	=====
211	-0.13	= Q	
212	-0.13	= G	
213	0.35	T	=====
214	0.15	W	=====
215	0.20	S	=====
216	0.77	E	=====
217	0.93	W	=====
218	0.63	S	=====
219	-0.17	== D	
220	-0.42	== P	
221	-0.43	== V	
222	-1.00	===== I	
223	-0.97	===== F	
224	-0.67	===== Q	
225	0.13	T	=====
226	1.05	Q	=====
227	0.72	S	=====
228	1.28	E	=====
229	1.75	E	=====
230	1.70	L	=====
231	1.03	K	=====
232	0.57	E	=====
233	0.87	G	=====
234	0.28	W	=====
235	-0.52	== N	
236	-0.82	===== P	
237	-0.95	===== H	
238	-1.28	===== L	
239	-1.58	===== L	
240	-1.80	===== L	
241	-1.80	===== L	

FIG. 1E

【図 1 F】

242	-1.75	===== L	
243	-1.75	===== L	
244	-1.70	===== L	
245	-1.82	===== V	
246	-1.82	===== I	
247	-1.52	===== V	
248	-1.35	===== F	
249	-1.47	===== I	
250	-1.78	===== P	
251	-1.32	===== A	
252	-1.32	===== F	
253	-0.82	===== W	
254	-0.80	===== S	
255	-0.07	= L	
256	0.50	K	=====
257	0.15	T	=====
258	-0.12	= h	
259	-0.12	= P	
260	-0.35	===== L	
261	-1.23	===== W	
262	-0.73	===== R	
263	0.07	L	=====
264	0.33	===== W	
265	-0.73	===== K	
266	-0.52	===== K	
267	-0.20	== I	
268	-0.70	===== W	
269	-1.15	===== A	
270	-0.85	===== V	
271	0.22	P	=====
272	0.80	S	=====
273	0.63	P	=====
274	0.22	E	=====
275	-0.05	R	=====
276	-0.05	F	=====
277	-0.85	===== F	
278	-1.73	===== M	
279	-0.82	===== P	
280	-0.40	===== L	
281	-0.35	===== Y	
282	-0.30	===== K	
283	0.00	G	=====
284	0.88	C	=====
285	-0.03	S	=====
286	0.47	G	=====
287	1.13	D	=====
288	0.52	F	=====
289	0.27	K	=====
290	-0.23	== K	

FIG. 1F

【図 1 G】

291	0.10	W	=====
292	-0.40	===== V	
293	-1.32	===== G	
294	-0.82	===== A	
295	-0.57	===== P	
296	-0.52	===== F	
297	-0.38	===== T	
298	-0.68	===== G	
299	0.23	S	=====
300	0.00	S	=====
301	0.00	L	=====
302	-0.05	E	=====
303	-0.27	===== L	
304	0.08	G	=====
305	-0.42	===== P	
306	0.38	===== W	
307	0.13	S	=====
308	0.13	P	=====
309	0.35	E	=====
310	0.23	V	=====
311	-0.07	= P	
312	-0.07	= S	
313	-0.07	= T	
314	-0.45	===== L	
315	-0.45	===== E	
316	-0.55	===== V	
317	-0.33	===== Y	
318	-0.83	===== S	
319	-0.58	===== C	
320	0.30	H	=====
321	0.30	P	=====
322	0.47	P	=====
323	0.47	R	=====
324	0.97	S	=====
325	1.47	P	=====
326	0.67	A	=====
327	0.65	K	=====
328	0.35	R	=====
329	0.37	L	=====
330	0.37	Q	=====
331	-0.43	===== L	
332	-0.10	= T	
333	0.37	E	=====
334	0.67	L	=====
335	0.65	Q	=====
336	0.65	E	=====
337	0.65	P	=====
338	0.37	A	=====
339	0.37	E	=====

FIG. 1G

【図 1 H】

340	0.42	L	=====
341	1.00	V	=====
342	0.50	E	=====
343	0.55	S	=====
344	0.80	D	=====
345	0.80	G	=====
346	0.75	V	=====
347	0.30	P	=====
348	-0.12	= K	
349	-0.43	===== P	
350	-0.43	===== S	
351	-1.00	===== F	
352	-1.08	===== W	
353	-1.10	===== P	
354	-0.65	===== T	
355	-0.03	A	=====
356	-0.03	Q	=====
357	0.03	N	=====
358	0.17	S	=====
359	0.05	G	=====
360	-0.37	===== G	
361	-0.37	===== S	
362	0.13	A	=====
363	0.63	Y	=====
364	1.08	S	=====
365	1.67	E	=====
366	2.55	E	=====
367	2.50	R	=====
368	2.02	D	=====
369	1.52	R	=====
370	0.72	P	=====
371	-0.03	Y	=====
372	-0.48	G	=====
373	-0.78	L	=====
374	-0.30	===== V	
375	-0.37	S	=====
376	-0.32	I	=====
377	-0.63	D	=====
378	-0.93	T	=====
379	-0.93	V	=====
380	-0.93	t	=====
381	-0.95	V	=====
382	-0.20	L	=====
383	0.37	D	=====
384	0.62	A	=====
385	0.75	E	=====
386	0.18	G	=====
387	-0.30	P	=====
388	-0.80	C	=====

FIG. 1H

【図 1 I】

389	-0.97	T
390	-0.92	W
391	-0.92	P
392	-0.35	C
393	0.72	S
394	1.22	C
395	1.38	E
396	1.35	D
397	1.52	D
398	0.93	G
399	0.13	y =
400	0.13	P =
401	-0.17	A
402	0.32	L
403	0.23	D
404	0.32	L
405	0.32	D
406	0.32	A
407	0.62	G
408	0.17	L
409	0.25	E
410	0.25	P
411	0.25	S
412	0.25	P
413	0.75	G
414	0.70	L
415	0.40	E
416	0.10	D
417	0.90	P
418	0.32	L
419	-0.18	L
420	-0.75	D
421	-0.52	A
422	-0.47	G
423	-1.27	t
424	-1.75	T
425	-1.92	V
426	-1.35	L
427	-1.45	s
428	-1.45	C
429	-1.72	G
430	-1.23	C
431	-1.07	V
432	-1.02	s
433	-0.85	A
434	-0.60	G
435	-0.33	S
436	-0.25	P
437	-0.25	G

FIG. 1I

【図 1 J】

438	-0.30	L
439	-0.60	G
440	-0.60	G
441	-0.87	P
442	-1.17	L
443	-1.47	G
444	-0.97	s
445	-0.17	L
446	-0.47	L
447	0.60	D
448	0.90	R
449	1.20	L
450	0.40	K
451	-0.18	P
452	0.62	P
453	0.12	L
454	0.62	A
455	1.12	D
456	0.85	G
457	0.85	E
458	0.35	D
459	0.35	W
460	-0.45	A
461	-0.95	G
462	-0.95	G
463	-0.87	L
464	-0.87	P
465	-0.37	W
466	-0.02	G
467	-0.02	G
468	0.55	R
469	0.55	S
470	0.30	P
471	-0.15	G
472	0.30	G
473	0.35	V
474	0.85	S
475	0.77	E
476	1.02	S
477	1.02	E
478	0.52	A
479	0.17	G
480	-0.42	S
481	-0.33	P
482	-0.63	L
483	-0.18	A
484	-0.40	G
485	0.40	L
486	0.42	D

FIG. 1J

【図 1 K】

487	0.00	M
488	0.80	D
489	0.35	T
490	0.57	F
491	-0.35	D
492	-0.53	S
493	-0.12	G
494	-0.57	F
495	-0.12	V
496	-0.28	G
497	0.18	S
498	0.48	D
499	0.48	C
500	0.18	C
501	0.18	S
502	0.18	P
503	0.63	V
504	0.17	E
505	0.10	C
506	0.40	D
507	-0.10	F
508	0.07	T
509	0.07	S
510	0.98	P
511	1.05	G
512	1.00	D
513	1.00	E
514	1.50	G
515	1.05	P
516	0.17	P
517	-0.13	R
518	0.37	S
519	0.40	Y
520	-0.67	L
521	-0.97	R
522	-0.83	Q
523	-0.83	W
524	-1.33	V
525	-1.37	V
526	-0.80	I
527	-0.85	P
528	-0.55	P
529	-0.20	P
530	-0.09	L
531	0.02	S
532	0.13	S
533	0.58	P
534	0.56	G
535	0.67	P

FIG. 1K

【図 1 L】

536	0.00	Q					
537	0.00	A					
538	0.00	S					
:							
:							
:							
	-3	-2	-1	0	1	2	3
	疎水性				親水性		

FIG. 1L

【図 2 B】

zalpha 480 490 500 510 520 530
 EAGSPGLAGLMDTDFDSGFVGSDCSSPVECDFTSPGDEGPPRSYLQWVVTPPLSSPGPQ
 muzalp EAGSP-PGLMDTDFDSGFAGSDCGSPVE-----TDEGPPRSYLQWVVTPPPVDSGAQ
 480 490 500 510 520
 zalpha AS
 ::
 muzalp ::

FIG. 2B

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)		C 1 2 N 5/00	1 0 1
C 1 2 P 21/02 (2006.01)		C 1 2 P 21/02	C
C 0 7 K 19/00 (2006.01)		C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)		C 0 7 K 16/28	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		C 1 2 P 21/08	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)		C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/566 (2006.01)		G 0 1 N 33/566	

(31)優先権主張番号 09/347,930

(32)優先日 平成11年7月6日(1999.7.6)

(33)優先権主張国 米国(US)

前置審査

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(72)発明者 プレスネル, スコット アール.

アメリカ合衆国, ワシントン 98407, タコマ, ノース パジエット サウンド アベニュー 2902

(72)発明者 コンクリン, ダレル シー.

アメリカ合衆国, ワシントン 98102, シアトル, マイナー アベニュー イースト 2332, アpartment 2

(72)発明者 ノバック, ジュリア イー.

アメリカ合衆国, ワシントン 98110, ベインブリッジ アイランド, バトル ポイント ドライブ ノースイースト 10699

(72)発明者 ハモンド, アンジェラ ケー.

アメリカ合衆国, ワシントン 98027, イサクア, サウスウエスト クラーク ストリート 195 #イー-2

審査官 神谷 昌男

(56)参考文献 国際公開第99/067290 (WO, A1)

国際公開第99/047675 (WO, A1)

国際公開第96/025953 (WO, A1)

特表平10-503932 (JP, A)

特表平09-503645 (JP, A)

PARRISH, J., AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, 米国, THE AMERICAN SOCIETY OF HUMAN GENETICS, 1999年10月19日, V65 N4, PP.A378

"Homo sapiens Chromosome 16 BAC clone CIT987-SKA-670B5 ~complete genomic sequence, complete sequence.", NCBI Nucleotide, [online], 1997年 8月25日, [2009年9月9日検索]、インターネット<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sviewer/viewer.fcgi?2342739:0LD02:477679>>、アクセス番号AC002303

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N15/00-15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

PubMed