

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4795641号
(P4795641)

(45) 発行日 平成23年10月19日 (2011.10.19)

(24) 登録日 平成23年8月5日 (2011.8.5)

(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 14/52 (2006.01)	C O 7 K 14/52
C O 7 K 16/24 (2006.01)	C O 7 K 16/24
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 H
請求項の数 34 (全 154 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2003-560177 (P2003-560177)	(73) 特許権者	505222646
(86) (22) 出願日	平成15年1月21日 (2003.1.21)		ザイモジェネティクス, インコーポレイ
(65) 公表番号	特表2005-526494 (P2005-526494A)		テッド
(43) 公表日	平成17年9月8日 (2005.9.8)		アメリカ合衆国 ワシントン州 シアトル
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/001984		イーストレイク アベニュー イースト
(87) 国際公開番号	W02003/060090		1 2 0 1
(87) 国際公開日	平成15年7月24日 (2003.7.24)	(74) 代理人	100099759
審査請求日	平成18年1月12日 (2006.1.12)		弁理士 青木 篤
(31) 優先権主張番号	60/350,325	(74) 代理人	100077517
(32) 優先日	平成14年1月18日 (2002.1.18)		弁理士 石田 敬
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100087871
(31) 優先権主張番号	60/375,323		弁理士 福本 積
(32) 優先日	平成14年4月25日 (2002.4.25)	(74) 代理人	100087413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 古賀 哲次
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 新規サイトカイン zcytor17 リガンド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 配列番号 2 における残基 27 (Leu) ~ 164 (Thr) により示されるポリペプチド ;

(b) 配列番号 2 における残基 24 (Thr) ~ 164 (Thr) により示されるポリペプチド ;
及び(c) 配列番号 2 における残基 1 (Met) ~ 164 (Thr) により示されるポリペプチド ;
から成る群からのアミノ酸残基の配列に対して少なくとも 95% 同一であるアミノ酸残基
の配列を含んで成る、ヒト zcytor17 受容体を活性化することができるポリペプチド。

【請求項 2】

アミノ酸残基 72、133 及び 147 がシステインである請求項 1 記載のポリペプチド。

10

【請求項 3】

前記ポリペプチドが、配列番号 5 又は 71 に示される zcytor17 受容体を結合する請求項 1
記載のポリペプチド。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチドの配列を
含んで成るポリヌクレオチド。

【請求項 5】

前記ポリヌクレオチドが、

(a) 配列番号 1 におけるヌクレオチド 106 ~ ヌクレオチド 519 の配列で示されるポリヌ
クレオチド ;

20

(b) 配列番号 1 におけるヌクレオチド 97～ヌクレオチド 519 の配列で示されるポリヌクレオチド；及び

(c) 配列番号 1 におけるヌクレオチド 28～ヌクレオチド 519 の配列で示されるポリヌクレオチド；

の群から選択される請求項 4 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 6】

配列番号 2 又は 11 の少なくとも 14 個の連続するアミノ酸残基を含んでなるポリペプチドをコードするヌクレオチドを含んでなるポリヌクレオチド分子。

【請求項 7】

作用可能に連結された下記の要素：

10

(a) 転写プロモーター；

(b) 請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする DNA セグメント；及び

(c) 転写ターミネーター；

を含んで成る発現ベクター。

【請求項 8】

作用可能に連結された下記の要素：

(a) 転写プロモーター；

(b) 配列番号 2 のアミノ酸残基 27～164 を含んで成るポリペプチドをコードする DNA セグメント；及び

20

(c) 転写ターミネーター；

を含んで成る発現ベクター。

【請求項 9】

請求項 7 又は 8 に記載の発現ベクター；

を含んで成る培養された細胞。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の細胞を、前記 DNA セグメントによりコードされるポリペプチドが発現される条件下で培養し；そして

前記 DNA セグメントによりコードされるタンパク質を回収する；

ことを含んで成るタンパク質の生成方法。

30

【請求項 11】

zcytor17lig ポリペプチドに対する抗体の生成方法であって、

(a) 9～141 個のアミノ酸から成るポリペプチド、ここで当該ポリペプチドは配列番号 2 のアミノ酸番号 24 (Ala)～アミノ酸番号 164 (Thr) におけるアミノ酸の連続配列と同一である；

(b) 請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド；

(c) 配列番号 2 のアミノ酸番号 38～52 のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド；

(d) 配列番号 2 のアミノ酸番号 83～98 のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド；

(e) 配列番号 2 のアミノ酸番号 104～117 のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド；

(f) 配列番号 2 のアミノ酸番号 137～152 のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド；

40

(g) 配列番号 2 のアミノ酸番号 38～152 のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド；

(h) 配列番号 2 のアミノ酸番号 24～164 のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド；

(i) 配列番号 11 のアミノ酸番号 38～52 のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド；

(j) 配列番号 11 のアミノ酸番号 85～98 のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド；

(k) 配列番号 11 のアミノ酸番号 104～118 のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド；

(l) 配列番号 11 のアミノ酸番号 141～157 のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド；

(m) 配列番号 11 のアミノ酸番号 38～157 のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド；

及び

(n) 配列番号 11 のアミノ酸番号 24～163 のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド；

の群から選択されるポリペプチドをヒト以外の動物に接種し、ここで前記ポリペプチド

50

が、抗体を生成するために動物において免疫応答を誘発し；そして
前記動物から抗体を単離する；
ことを含んで成る方法。

【請求項 1 2】

配列番号 2 又は 11 のポリペプチドに結合する、請求項 11 に記載の方法により生成される抗体。

【請求項 1 3】

配列番号 2 又は 11 に示されるポリペプチドに対して特異的に結合する、抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項 1 4】

生成物学的サンプルにおける zcytor17lig RNA の存在を検出するための方法であって、

(a) zcytor17lig 核酸プローブと、(i) 生物学的サンプルから単離された試験 RNA 分子、又は (ii) 単離された RNA 分子から合成された核酸分子のいずれかとを、ハイブリダイゼーション条件下で接触せしめ、ここで前記プローブが請求項 5 に記載の核酸分子のヌクレオチド配列の一部であって少なくとも 14 個の連続するヌクレオチドを含んでなるもの又はその相補体のいずれかを含んで成るヌクレオチド配列を有し；そして

(b) 前記核酸プローブ、及び前記試験 RNA 分子又は前記合成された核酸分子のいずれかのハイブリッドの形成を検出する；

段階を含んで成り、

ここで前記ハイブリッドの存在が生成物学的サンプルにおける zcytor17lig RNA の存在を示す、

ことを特徴とする方法。

【請求項 1 5】

生物学的サンプルにおける zcytor17lig の存在を検出するための方法であって、

(a) 前記生物学的サンプルと、請求項 12 又は 13 に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメントとを接触せしめ、ここで前記接触は、生物学的サンプルへの抗体又はその抗原結合性フラグメントの結合を可能にする条件下で行われ；そして

(b) いずれかの結合された抗体又は結合された抗原結合性フラグメントを検出する；

段階を含んで成る方法。

【請求項 1 6】

前記抗体 又はその抗原結合性フラグメント が、(a) ポリクローナル抗体、(b) ネズミモノクローナル抗体、(c) 前記 (b) に由来する ヒト型化抗体、(d) ヒトモノクローナル抗体、及び (e) それらの抗原結合性フラグメントの群から選択される請求項 13 に記載の抗体 又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項 1 7】

(a) 配列番号 2 における残基 38 (Val) ~ 152 (Leu) により示されるポリペプチド；

(b) 配列番号 2 における残基 27 (Leu) ~ 164 (Thr) により示されるポリペプチド；

(c) 配列番号 2 における残基 24 (Thr) ~ 164 (Thr) により示されるポリペプチド；

及び

(d) 配列番号 2 における残基 1 (Met) ~ 164 (Thr) により示されるポリペプチド；

の群から選択されるアミノ酸残基の配列を含んで成るポリペプチドに対して特異的に結合する、抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項 1 8】

放射性核種、酵素、基質、補因子、蛍光マーカー、化学ルミネセンスマーカー、ペプチド標識、磁気粒子、薬物又はトキシンを更に有する請求項 13 に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項 1 9】

放射性核種、酵素、基質、補因子、蛍光マーカー、化学ルミネセンスマーカー、ペプチド標識、磁気粒子、薬物又はトキシンを更に有する請求項 17 に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。

10

20

30

40

50

【請求項 20】

ヒト以外の哺乳類における炎症を検出するための方法であって、

ヒト以外の哺乳類から組織又は生物学的サンプルを獲得し；

前記組織又は生物学的サンプルと、請求項13、16、17、18又は19に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメントとを、前記抗体又はその抗原結合性フラグメントが組織又は生物学的サンプルにおけるその相補的ポリペプチドに結合する条件下でインキュベートし；

前記組織又は生物学的サンプルにおいて結合した抗体又はその抗原結合性フラグメントを可視化し；そして

前記ヒト以外の哺乳類からの組織又は生物学的サンプルにおける結合した抗体又はその抗原結合性フラグメントの量を、正常な対照の組織又は生物学的サンプルにおけるその量と比較する；

10

ことを含んで成り、

ここで、正常な対照組織又は生物学的サンプルに比較して、ヒト以外の哺乳類の組織又は生物学的サンプルに結合した抗体又はその抗原結合性フラグメントの量の上昇がヒト以外の哺乳類における炎症を示す、

ことを特徴とする方法。

【請求項 21】

ヒト以外の哺乳類における炎症を検出するための方法であって、

ヒト以外の哺乳類から組織又は生物学的サンプルを獲得し；

配列番号1又は配列番号1の相補体の少なくとも14個の連続したヌクレオチドを含んで成るポリヌクレオチドをラベリングし；

20

前記組織又は生物学的サンプルを、前記ポリヌクレオチドが相補的ポリヌクレオチドにハイブリダイズする条件下でインキュベートし；

前記組織又は生物学的サンプルにおけるラベリングされたポリヌクレオチドを可視化し；そして

前記ヒト以外の哺乳類からの組織又は生物学的サンプルにおけるラベリングされたポリヌクレオチドハイブリダイゼーションの量を、正常な対照の組織又は生物学的サンプルにおけるそのレベルと比較する；

ことを含んで成り、

ここで、正常な対照組織又は生物学的サンプルに比較してヒト以外の哺乳類の組織又は生物学的サンプルにおけるラベリングされたポリヌクレオチドハイブリダイゼーションの上昇が患者における炎症を示す、

30

ことを特徴とする方法。

【請求項 22】

配列番号2に示されるアミノ酸残基27～164のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド

。

【請求項 23】

配列番号2に示されるアミノ酸残基1～164のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド

。

【請求項 24】

配列番号2に示されるアミノ酸残基27～164のアミノ酸配列から成るポリペプチド。

40

【請求項 25】

配列番号2に示されるアミノ酸残基1～164のアミノ酸配列から成るポリペプチド。

【請求項 26】

請求項22に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 27】

請求項23に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 28】

請求項24に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 29】

50

請求項25に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項30】

細胞における炎症をインービトロで検出するための方法であって、

前記細胞と、請求項13、16、17、18又は19に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメントとを、当該抗体又はその抗原結合性フラグメントが当該細胞におけるその相補的ポリペプチドに結合する条件下でインキュベートし；

前記細胞において結合した抗体又はその抗原結合性フラグメントを可視化し；そして

前記細胞における結合した抗体又はその抗原結合性フラグメントの量を、正常な対照と比較する；

ことを含んで成り、

ここで、正常な対照に比較して、前記に結合した抗体又はその抗原結合性フラグメントの量の上昇が前記細胞における炎症を示す、

ことを特徴とする方法。

【請求項31】

細胞における炎症をインービトロで検出するための方法であって、

配列番号1又は配列番号1の相補体の少なくとも14個の連続したヌクレオチドを含んで成るポリヌクレオチドをラベリングし；

前記細胞を、前記ポリヌクレオチドが相補的ポリヌクレオチドにハイブリダイズする条件下でインキュベートし；

前記細胞におけるラベリングされたポリヌクレオチドを可視化し；そして

前記細胞におけるラベリングされたポリヌクレオチドハイブリダイゼーションの量を、正常な対照と比較する；

ことを含んで成り、

ここで、正常な対照に比較して前記細胞におけるラベリングされたポリヌクレオチドハイブリダイゼーションの上昇が患者における炎症を示す、

ことを特徴とする方法。

【請求項32】

請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドを含んで成る、zcytor17受容体を活性化するための組成物。

【請求項33】

請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドを含んで成る、IL-13RA2遺伝子の発現を増強するための組成物。

【請求項34】

前記IL-13RA2遺伝子の発現の増強が肺上皮細胞において生ずる、請求項33に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【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調節される。それらの拡散性分子は、細胞のお互いの連絡を可能し、そして細胞、組織及び器官の形成、そして損傷された組織の修復に関して作用する。ホルモン及び成長因子の例は、ステロイドホルモン（例えば、テストステロン）、副甲状腺ホルモン、卵胞刺激ホルモン、インターロイキン、血小板由来の成長因子（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）、エリトロポエチン（EPO）及びカルシトニンを包含する。

【0002】

ホルモン及び成長因子は、受容体に結合することによって細胞代謝に影響を及ぼす。受容体は、細胞内のシグナル化経路、例えば第2メッセンジャーシステムに結合される内在性膜タンパク質であり得る。他の種類の受容体は、可溶性分子、例えば転写因子である。

10

20

30

40

50

サイトカインは一般的に、造血系の細胞の増殖又は分化を刺激し、又は身体の免疫及び炎症応答に関係している。造血に影響を及ぼすサイトカインの例は、赤血球細胞の成長を刺激するエリトロポエチン（EPO）；巨核球系の細胞の成長を刺激する тромбоポエチン（TPO）；及び好中球の成長を刺激する顆粒球－刺激因子（G-CSF）である。それらのサイトカインは、貧血、血小板減少症及び好中球減少症を有する患者における正常な血液細胞レベルの回復、又は癌のための化学療法の受容において有用である。

【0003】

インターロイキンは、免疫学的応答、例えば炎症を仲介するサイトカインのファミリーである。インターロイキンは、広範囲の種類の炎症病理学を仲介する。免疫応答の中樞は、多くのサイトカイン及び抗原に対する適合できる免疫性を生成するT細胞である。T細胞により生成されるサイトカインは、タイプ1及びタイプ2として分類されて来た（Kelso, A. Immun. Cell Biol. 76: 300-317, 1998）。タイプ1サイトカインは、IL-2、IFN- γ 、LT- α を包含し、そして炎症応答、ウィルス免疫性、細胞内寄生体免疫性及び同種移植拒絶に包含される。タイプ2サイトカインは、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10及びIL-13を包含し、そして体液性応答、寄生虫免疫性及びアレルギー応答に関与する。タイプ1とタイプ2との間の共有されるサイトカインは、IL-3、GM-CSF及びTNF- α を包含する。T細胞集団を生成するタイプ1及びタイプ2が異なった型の炎症組織中に選択的に移動することを示すある証拠が存在する。

【0004】

成熟T細胞は、例えばサイトカイン、生化学的シグナル分子、又はT細胞集団の運命にさらに影響を及ぼす受容体を生成するために、抗原又は他の刺激物により活性化され得る。

B細胞は、補助細胞機能、例えばサイトカインの生成を行うために、それらの細胞表面上の受容体、例えばB細胞受容体及び他の補助分子を通して活性化され得る。

単球/マクロファージ及びT細胞は、それらの細胞表面上の受容体により活性化され、そしてリンパ球に対して抗原を提供することによって免疫応答において中心的役割を演じ、そしてまた、多数のサイトカインを分泌することによってリンパ球に対するアクセサリ細胞としても作用することができる。

【0005】

天然のキラー（NK）細胞は、T細胞及びB細胞と共に、共通する前駆体細胞を有し、そして免疫監視において役割を演じる。15%までの血液リンパ球を含んで成るNK細胞は、抗原受容体を発現せず、そして従って、標的細胞への結合のために、必要なら、MHC認識を使用しない。インビボで、NK細胞は、活性化を必要とすると思われるが、しかしながら、インビトロで、NK細胞は、活性化を伴わないで、いくつかのタイプの腫瘍細胞を殺害することが示されている。

【0006】

前記サイトカインファミリーの例示されたインビボ活性は、他のサイトカイン、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莫大な臨床学的可能性及びそれらの必要性を説明する。本発明は、造血細胞系の細胞を刺激する新規サイトカイン、並びに関連する組成物及び方法を提供することにより、それらの必要性と取り組む。

本発明は、当業者に明らかであるそれらの及び他の使用のために、そのようなポリペプチドを提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

本発明を詳細に記載する前、次の用語を定義することで本発明の理解を助けることができる：

“親和性標識”とは、第2ポリペプチドの精製又は検出を提供し、又は基質への第2ポリペプチドの結合のための部位を供給するために、第2ポリペプチドに結合され得るポリペプチドセグメントを示すために本明細書において使用される。主に、抗体又は、他の特異的結合剤が利用できるいずれかのペプチド又はタンパク質が親和性標識として使用され得る。

【0008】

親和性標識は、ポリーヒスチジン系、すなわちプロテインA (Nilsson など., EMBO J. 4: 1075, 1985; Nilsson など., Methods Enzymol. 198: 3, 1991), グルタチオンSトランスフェラーゼ (Smits and Johnson, Gene 67: 31, 1988), Glu-Glu親和性標識 (Grussenmeyerなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7952-4, 1985), 物質P、すなわちFlagTM ペプチド (Hoppなど., Biotechnology 6: 1204-1210, 1988)、ストレプトタビジン結合ペプチド、又は他の抗原性エピトープ又は結合ドメインを包含する。一般的に、Ford など., Protein Expression and Purification 2:95-107, 1991を参照のこと。親和性標識をコードするDNAは、商品供給者 (例えばPharmacia Biotech, Piscataway, NJ; Eastman Kodak, New Haven, CT; New England Biolabs, Beverly, MA) から入手できる。

10

【0009】

用語“対立遺伝子変異体”とは、同じ染色体遺伝子座を占める遺伝子の複数の遺伝子の二者択一形のいずれかを示すために、本明細書において使用される。対立遺伝子変異は、突然変異を通して天然では生じ、そして集団内の表現型多型現象をもたらすことができる。遺伝子突然変異は、サイレントであり(コードされたポリペプチドにおいて変化がない)、又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ことができる。用語、対立遺伝子変異体はまた、遺伝子の対立遺伝子変異体によりコードされるタンパク質を示すために本明細書において使用される。

【0010】

20

用語“アミノ末端”及び“カルボキシル末端”とは、ポリペプチド内の位置を示すために本明細書において使用される。その状況が可能である場合、それらの用語は、接近性又は相対的位置を示すためにポリペプチドの特定の配列又は一部に関して使用される。例えば、ポリペプチド内の対象配列のカルボキシル末端側に位置する一定の配列は、その対象配列のカルボキシル末端に隣接して位置するが、しかし完全なポリペプチドのカルボキシル末端では必ずしも必要ではない。

【0011】

用語“相補体／抗－相補体対”とは、適切な条件下で、非共有的に会合される安定した対を形成する非同源性成分を示す。例えば、ビオチン及びアビジン(又はストレプトタビジン)は、相補体／抗－相補体対の基本型メンバーである。他の典型的な相補体／抗－相補体対は、受容体／リガンド対、抗体／抗原(又はハプテン又はエピトープ)対、センス／アンチセンス ポリヌクレオチド対、及び同様のものを包含する。相補体／抗－相補体対の続く解離が所望される場合、その相補体／抗－相補体対は好ましくは、 $< 10^9 \text{ M}^{-1}$ の結合親和性を有する。

30

【0012】

用語“ポリヌクレオチド分子の相補体”とは、相補的塩基配列、及び対照配列に比較して逆の配向を有するポリペプチド分子である。例えば、配列5' ATGCACGGG 3' は、5' CCCGTGCAT 3' に対して相補的である。

【0013】

用語“contig”とは、他のポリヌクレオチドに対する一連の連続した同一の又は相補的な配列を有するポリヌクレオチドを示す。連続した配列とは、ポリヌクレオチドの全体において、又はその一部に沿って、一定の長さのポリヌクレオチド配列を“オーバーラップ”すると言われる。例えば、ポリヌクレオチド配列5' -ATGGCTTAGCTT-3' に対する代表的なcontig とは、5' -TAGCTTgagtct-3' 及び3' -gtcgacTACCGA-5' である。

40

用語“縮重ヌクレオチド配列”とは、1又は複数の縮重コドンを含むヌクレオチドの配列(ポリペプチドをコードする対照ポリヌクレオチドに比較して)を示す。縮重コドンは、ヌクレオチドの異なったトリプレットを含むが、しかし同じアミノ酸残基をコードする(すなわち、GAU及びGACトリプレットはそれぞれAspをコードする)。

【0014】

用語“発現ベクター”とは、その転写を提供する追加のセグメントに操作可能的に連結

50

される興味あるポリペプチドをコードするセグメントを含んで成る線状又は環状DNA分子を示すために使用される。そのような追加のセグメントは、プロモーター及びターミネーター配列及び複製の1又は複数の起点、1又は複数の選択マーカー、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、及び同様のものを包含する。発現ベクターは一般的に、プラスミド又はウィルスDNAから誘導され、又は両者の要素を含むことができる。

【0015】

用語“単離された”とは、ポリヌクレオチドに適用される場合、ポリヌクレオチドがその天然の遺伝的環境から除去され、そして従って、他の無関係な又は所望しないコード配列を有さず、そして遺伝子的に構築されたタンパク質生成システム内での使用のために適切な形で存在することを示す。そのような単離された分子は、それらの天然の環境から分離され、そしてcDNA及びゲノム クローンを含む分子である。本発明の単離されたDNA分子は、通常関係しない他の遺伝子を含まないが、しかし天然において存在する5'及び3'末翻訳領域、例えばプロモーター及びターミネーターを含むことができる。関連する領域の同定は、当業者に明らかであろう(例えば、Dynan and Tijan, Nature 316: 774-78, 1985を参照のこと)。

【0016】

“単離された”ポリペプチド又はタンパク質は、その生来の環境以外の条件、例えば血液及び動物組織とは別の条件下で見出されるポリペプチド又はタンパク質である。好ましい形においては、単離されたポリペプチドは、他のポリペプチド、特に動物起源の他のポリペプチドを実質的に含まない。高く精製された形、すなわち95%以上の純度、より好ましくは99%以上の純度でポリペプチドを供給することが好ましい。この状況下で使用される場合、用語“単離された”とは、他の物理的形、例えばダイマー形又は他のグリコシル化された又は誘導体化された形での同じポリペプチドの存在を排除しない。

【0017】

用語“腫瘍性”とは、細胞を言及する場合、新規で且つ異常な増殖を受ける細胞、特に増殖において、制御できなく、且つ前進性であり、特に新形成をもたらす組織を示す。腫瘍性細胞は、悪性、すなわち侵襲性で且つ転移性であるか、又は良性であり得る。

“作用可能に連結された”とは、DNAセグメントに適用される場合、前記セグメントが、それらの意図された目的のために協力して機能し、例えば転写がプロモーターにおいて開始し、そしてコードセグメントを通してターミネーターに進行するよう配列されることを示す。

【0018】

用語“オルト体(orthology)”とは、異なった種からのポリペプチド又はタンパク質の機能的相対物である、1つの種から得られるポリペプチド又はタンパク質を示す。オルト体間の配列の差異は、特定化の結果である。

“パラ体(paralogs)”とは、生物によって製造される、異なっているが、しかし構造的に関連するタンパク質である。パラ体は、遺伝子重複を通して生じると思われる。例えば、 α -グロビン、 β -グロビン及びミオグロビンは、お互いパラ体である。

【0019】

“ポリヌクレオチド”は、5'末端から3'末端に読み取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一本鎖又は二本鎖ポリマーである。ポリヌクレオチドは、RNA及びDNAを包含し、そして天然源から単離され、インビトロで合成され、又は天然及び合成分子の組み合わせから調製され得る。ポリヌクレオチドのサイズは、塩基対(略語“bp”)、ヌクレオチド(“nt”)、又はキロ塩基(“kb”)として表される。ここで、後者の2つの用語は、一本鎖又は二本鎖であるポリヌクレオチドを記載する。この用語が二本鎖分子に適用される場合、それは全体の長さを示すために使用され、そして用語、“塩基対”に等しいことが理解されるであろう。二本鎖ポリヌクレオチドの二本の鎖は長さにおいてわずかに異なり、そしてその末端が酵素分解の結果として異なることは、当業者により理解されており；従って、二本鎖ポリヌクレオチド分子内のすべてのヌクレオチドは一対に成り得ない。

10

20

30

40

50

【0020】

“ポリペプチド”は、天然において生成されても又は合成的に生成されてもいずれにせよ、ペプチド結合により連結されるアミノ酸残基のポリマーである。約 10個以下のアミノ酸残基のポリペプチドが、通常“ポリペプチド”として言及される。

用語“プロモーター”とは、RNA ポリメラーゼの結合及び転写の開始を提供するDNA配列を含む遺伝子の部分を示すために本明細書において使用される。プロモーター配列は通常、遺伝子の5' 非コード領域に見出されるが、しかし必ずしもそうではない。

【0021】

用語“タンパク質”は、1又は複数のポリペプチド鎖を含んで成る高分子である。タンパク質はまた、非ペプチド成分、例えば炭水化物基を含むことができる。炭水化物及び他の非ペプチド置換基は、タンパク質が生成される細胞により付加され、そして細胞型により変化するであろう。タンパク質は、それらのアミノ酸主鎖により本明細書において定義され；置換基、例えば炭水化物基は一般的に、特定されないが、しかしそれにもかかわらず、存在することができる。

【0022】

用語“受容体”は、生物活性分子(すなわち“リガンド”)に結合し、そして細胞上のリガンドの効果を仲介する細胞関連タンパク質を示す。膜結合受容体は、細胞外リガンド結合ドメイン、及び典型的には、シグナルトランスダクションに参与する細胞内エフェクタードメインを含んで成る多ペプチド構造により特徴づけられる。受容体へのリガンドの結合は、細胞におけるエフェクタードメインと他の分子との間の相互作用を引き起こす受容体におけるコンホメーション変化をもたらす。

【0023】

この相互作用は、細胞の代謝の変更を誘導する。受容体ーリガンド相互作用に連結される代謝現象は、遺伝子転写、リン酸化、脱リン酸化、AMP生成の上昇、細胞カルシウム代謝、膜脂質の代謝、細胞付着、イノシトール脂質の加水分解、及びリン脂質の加水分解を包含する。一般的に、受容体は、膜結合され、シトソール性又は核性であり；モノマー(例えば甲状腺刺激ホルモン受容体、 β -アドレナリン性受容体)、又はマルチマー(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、エリトロポイエチン受容体及びIL-6受容体)であり得る。

【0024】

用語“分泌シグナル配列”とは、それが合成される細胞の分泌路を通してより大きなポリペプチドを、より大きなポリペプチドの成分として方向づけるポリペプチド(“分泌ペプチド”)をコードするDNA配列を示す。前記のより大きなポリペプチドは、分泌路を通しての移動の間、分泌ペプチドを除去するために通常分解される。

【0025】

用語“スプライス変異体”とは、遺伝子から転写されるRNAの二者択一の形を示すために、本明細書において使用される。スプライス変異は、転写されたRNA分子内の、又は通常低い、別々に転写されたRNA分子間の二者択一のスプライシング部位の使用を通して天然において生じ、そして同じ遺伝子から転写されるいくつかのmRNAをもたらすことができる。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ことができる。用語スプライス変異体はまた、遺伝子から転写されるmRNAのスプライス変異体によりコードされるタンパク質を示すために本明細書において使用される。

【0026】

不正確な分析方法(例えば、ゲル電気泳動)により決定されるポリマーの分子量及び長さは、おおよその値であることが理解されるであろう。そのような値が“約”X又は“おおよそ”Xとして表される場合、その言及されたXの値は、正確には $\pm 10\%$ であることが理解されるであろう。

【0027】

本明細書に引用されるすべての文献はそれらのすべてを引用により組み込まれる。

本発明は、4-ヘリカル束サイトカインの構造を有するタンパク質をコードする新規

10

20

30

40

50

DNA配列の発現に一部、基づかれています。本明細書に詳細に記載されているクローニング及び増殖アッセイの方法を通して、受容体zcytor17（配列番号5）に対して高い特異性、及びオンコスタチンM受容体 β （OSMR β ）（配列番号7）及びWSX-1（配列番号9）を含んで成る少なくとも1つの追加のサブユニットを有するリガンドである新規リガンドポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列が同定された。zcytor17ligと称するポリペプチドリガンドは、CD3のために選択された、活性化されたヒト末端血液細胞（hPBC）から生成されるcDNAライブラリーから単離された。CD3は、リンパ起源の細胞、特にT細胞に対してユニークな細胞表面マーカーである。

【0028】

次の例においては、OSMR β 及びzcytor17受容体結合された経路に依存するか、又は他の成長因子の不在下で生存及び成長のためのOSMR β 及びWSX-1、及びzcytor17受容体-結合された経路に依存する細胞系が、zcytor17ligをコードするcDNAの源についてスクリーンするために使用された。zcytor17受容体のトランスフェクション及び発現のために使用された好ましい成長因子-依存性細胞系は、BaF3であった（Palacios and Steinmetz, Cell 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot など., Mol. Cell. Biol. 6: 4133-4135, 1986）。しかしながら、他の成長因子-依存性細胞系、例えばFDC-P1（Hapel など., Blood 64: 786-790, 1984）、及びM07e（Kiss など., Leukemia 7: 235-240, 1993）が、この目的のために適切である。

【0029】

OSMR, WSX-1及びzcytor17受容体についてのアミノ酸列は、コードされる受容体が、IL-2, IL-4, IL-7, Lif, IL-12, IL-15, EPO, TPO, GM-CSF及びG-CSFのための受容体を包含するクラスIサイトカイン受容体サブファミリーに属したことを示した（再考のためには、Cosman, “The Hematopoietin Receptor Super family” in Cytokine 512: 95-106, 1993を参照のこと）。zcytor17受容体は、共通所有のPCT特許出願US01/20484号（WIPO公開番号W002/00721号）に記載されており、そしてWSX-1は、アメリカ特許番号5,925,735号に十分に記載されている。zcytor17受容体のmRNAの組織分布の分析は、活性化されたCD4+及びCD8+ T細胞サブセット、CD14+単球における発現を示し、そしてCD19+ B細胞における弱い発現を示した。さらに、mRNAは、休止の又は活性化された単球細胞系THP-1（ATCC No. TIB-202）、U937（ATCC No. CRL-1593.2）及びHL60（ATCC No. CCL-240）の両者に存在した。

【0030】

WSX-1の発現は胸腺、脾臓、PBL及びリンパ節において強く、そして高められた発現が活性化されたT-細胞に関して観察された。OSMR β についての組織分布は、非常に広いものとして記載されている。それらの3種の受容体の組織分布は、予測されるzcytor17ligについての標的が造血系細胞、特にT-細胞、単球/マクロファージ及びリンパ球前駆体細胞及びリンパ球細胞であることを示す。リンパ球細胞に対して作用する他の既知の4-ヘリカル束のサイトカインは、IL-2, IL-4, IL-7及びIL-15を包含する。4-ヘリカル束のサイトカインの再考については、Nicola など., Advances in Protein Chemistry 52: 1-65, 1999及びKeiso, A., Immunol. Cell Biol. 76:300-317, 1998を参照のこと。

【0031】

CD3+選択された、PMA/イノマイシン-刺激されたヒト末梢血液細胞からのならし培地（CM）は、zcytor17受容体、OSMR β 及びWSX-1受容体を発現し、そして他方では、IL-3に依存するBaF3細胞の増殖を支持した。1）PMA/イノマイシン-刺激されなかったか、又は2）CD選択されなかった（PMA/イノマイシン刺激を伴って、又は伴わないで）細胞からのならし培地は、zcytor17、OSMR β 及びWSX-1を発現するBaF3細胞（BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR β 受容体-発現細胞）の増殖を支持しなかった。対照実験は、この増殖活性が他の既知の増殖因子に帰因せず、そしてzcytor17/WSX-1/OSMR β 受容体-発現細胞の増殖を刺激するようなならし培地の能力が受容体の可溶性により中和され得ることを示した。

【0032】

PMA/イノマイシンにより活性化された、CD3+選択された細胞からのならし培地はまた、zcytor17受容体及びOSMR β 受容体(zcytor17/OSMR β)を発現するBaF3細胞の増殖を支持するBaF3細胞の増殖を支持し、そしてzcytor17受容体及びWSX-1受容体(zcytor17/WSX-1)のみを発現するか、又はOSMR β 受容体のみをふくむBaF3細胞は、このならし培地により刺激されなかった。

【0033】

CD3+選択された、PMA/イノマイシンー刺激されたヒト末梢血液細胞からのCMに暴露されたzcytor17/WSX-1/OSMR β 受容体ー発現BaF3細胞の増殖が、培養物の眼での観察及び/又は増殖アッセイにより同定された。多くの適切な増殖アッセイが当業界において知られており、そして色素、例えばalamarBlueTM (AccuMed International, Inc. Westlake, Ohio); 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 (Mosman, J. Immunol. Meth. 65: 55-63, 1983); 3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5,3-カルボキシメトキシフェニル-2H-テトラゾリウム; 2,3-ビス(2-メトキシ-4-ニトロ-5-スルホフェニル)-5-[(フェニルアミノ)カルボニル]-2H-テトラゾリウムヒドロキシド; 及びシアノジトリイル-テトラゾリウムブロマイド (Polysciences, Inc., Warrington, PA から市販されている)の還元についてのアッセイ; 有糸分裂誘発アッセイ、例えば³H-チミジンの組み込みの測定; 例えばナフトレンブラック又はトリパンブルーを用いての色素排除アッセイ; ジアセチルフルオレセインを用いての色素摂取; 及びクロム開放を包含する。

【0034】

一般には、Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 3rd ed., Wiley-Liss, 1994 (引用により本明細書に組み込まれる)を参照のこと。

【0035】

cDNAライブラリーが、CD3+選択された、PMAー及びイノマイシンー刺激された一次ヒト末梢血液細胞から調製された。そのCD3+選択された、PMAー及びイノマイシンー刺激されたヒト末梢血液細胞cDNAライブラリーが、複数のcDNA分子を含むプールに分けられ、そして宿主細胞系、例えばBHK570細胞(ATCC受託番号10314号)中にトランスフェクトされた。トランスフェクトされた宿主細胞が、外因性増殖因子(例えば、5%FBS)を含まない培地において培養され、そしてならし培地が集められた。

【0036】

そのならし培地が、zcytor17、WSX-1及びOSMR β 受容体によりトランスフェクトされたBaF3細胞の増殖を刺激する能力についてアッセイされた。BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR β 受容体細胞を刺激したならし培地を生成するcDNAプールが同定された。このプールされたプラスミドcDNAが、E.コリ中にエレクトロポレートされた。cDNAが単一のコロニーから単離され、そしてBHK570細胞中にそれぞれトランスフェクトされた。陽性クローンが、BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR β 受容体増殖アッセイにおける陽性結果により同定され、そして特異性が可溶性zcytor17受容体を用いての増殖の中和により試験された。

【0037】

陽性クローンが単離され、そして配列分析は、プラスミドDNA内に含まれるポリヌクレオチド配列が新規であることを示した。分泌シグナル配列は、アミノ酸残基1(Met)~23(Ala)から成り、そして成熟ポリペプチドは、アミノ酸残基24(Ser)~164(Thr)(配列番号2で示されるような)から成る。さらに、293T細胞からの精製されたzcytor17ligのN-末端配列決定分析は、配列番号2で示されるような残基27(Leu)でのN-末端を示し、ここで成熟ポリペプチドはアミノ酸残基27(Leu)~164(Thr)(配列番号2で示されるような)から成る。

【0038】

一般的に、4- α ヘリックス構造を有することが予測され、ここでヘリックスA、C及びDがリガンドー受容体相互作用において最も重要であり、そしてそのファミリーのメンバー間でより高く保存される。配列番号2に示されるヒトzcytor17ligアミノ酸配列、すなわちヒトzcytor17lig、ヒトIL-3、及びヒトサイトカインアミノ酸配列の一例整列に関し

ては、好ましくは、配列番号2に示されるように、zcytor17ligヘリックスAはアミノ酸残基38-52により定義され；ヘリックスBはアミノ酸残基83-98により定義され；ヘリックスCはアミノ酸残基104-117により定義され；そしてヘリックスDはアミノ酸残基137-152により定義される。

【0039】

構造分析は、A/Bループが長く、B/Cループが短く、そしてC/Dループが平行して長いことを示す。このループ構造は、アップ-アップ-ダウン-ダウンヘリカル構成をもたらす。4-ヘリックス束構造に基づいて、保存される、zcytor17lig内のシステイン基は、本明細書に記載される配列番号2のアミノ酸残基72、133及び147；及び配列番号11のアミノ酸残基74、137及び151に対応する。矛盾しないシステイン置換は、その4-ヘリカル束構造のさらなる認識である。残基43での配列2に示されるようなGlu残基かまた、zcytor17lig高く保存される。

10

【0040】

さらに、ネズミzcytor17ligの推定されるアミノ酸配列は、配列（配列番号2及び11）の全体の長さにわたって、推定されるヒトタンパク質に対して31%の同一性を示す。ヒト及びネズミzcytor17ligの配列間の比較に基づいて、保存された残基は、 α ヘリックスC及びDをコードすることが予測される領域に見出された。本明細書に記載されるヒトzcytor17lig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その対応するポリヌクレオチドは、配列番号1で示される。

【0041】

20

ヘリックスDは、ヒト及びネズミzcytor17lig間に比較的保存され、そしてヘリックスCはもっとも保存される。両種はこの領域において有力な酸性アミノ酸を有し、そしてその差異は、zcytor17ligと、モノマー、ヘテロダイマー（例えば、zcytor17/OSMR β 、WSX-1/OSMR β 、zcytor17/WSX-1）又はマルチマー（例えば、zcytor17/OSMR β /WSX-1）受容体を含んで成るその受容体zcytor17との間の相互作用における種特異性を説明することができる。

【0042】

zcytor17ligのループA/B及びヘリックスBは、わずかに保存され、そしてループC/Dを通してのヘリックスC〜ヘリックスDは種間に最も保存され；この領域を通しての保存は、それが機能的に有意であることを示唆する。ヒト及びネズミzcytor17ligのDヘリックスもまた保存される。zcytor17受容体アンタゴニストは、zcytor17ligヘリックスD内の突然変異を通して企画され得る。それらは、残基Thr156（配列番号2）からのタンパク質の切断、又は受容体へのリガンドの結合を付与するが、しかしシグナル活性を低める残基の保存を包含することができる。

30

【0043】

4-ヘリカル束サイトカインはまた、それらの成分ヘリックスの長さにより分類される。“長い-ヘリックス”形のサイトカインは一般的に、24〜30個の残基のヘリックスから成り、そしてIL-6、繊維好中球因子（CNTF）、白血病阻害因子（LIF）及びヒト成長ホルモン（hGH）を包含する。“短い-ヘリックス”形のサイトカインは一般的に、18〜21個の残基のヘリックスから成り、そしてIL-2、IL-4及びGM-CSFを包含する。zcytor17ligは、短い-ヘリックス形のサイトカイングループの新規メンバーであると思われる。CNTF及びIL-6を用いての研究は、CNTFヘリックスがIL-6における相当のヘリックスにより交換され得、キメラにCNTF-結合性質を付与することを示した。

40

【0044】

従って、4-ヘリカル束サイトカインの機能的ドメインが配列同一性に関係なく、構造的相同性に基づいて決定され、そしてキメラにおいて機能的に組み込みを維持することができると思われる（Kallenなど., J. Biol. Chem. 274: 11859-11867, 1999）。従って、zcytor17ligのヘリカルドメインは、受容体結合特異性を決定し、そして調節するために他の短い-ヘリックス形のサイトカインを有するキメラ融合分子を調製するために有用であろう。本発明はまた、ヘリックスA及び/又はヘリックスDにより構築された融合タンパク

50

質、及び他の短い形のサイトカイン、IL-2, IL-4, IL-15, Lif, IL-12, IL-3及びGM-CSFからのヘリカル及びループドメインを組合す融合タンパク質が特に興味の対象である。

【0045】

ヒトIL-2についてのポリヌクレオチド配列は、配列番号161で示され、そしてその対応するアミノ酸配列は配列番号162で示される。分泌シグナル配列は、配列番号162のアミノ酸残基1 (Met) ~20 (Ser) (配列番号161のヌクレオチド48~107) から構成される。成熟ポリペプチドは、配列番号162のアミノ酸残基21 (Ala) ~156 (Thr) (配列番号161のヌクレオチド108~515) から構成される。ヒトIL-2のヘリックスAは、配列番号162のアミノ酸残基27 (Thr) ~48 (Leu) (配列番号161のヌクレオチド126~191) から構成される。ヒトIL-2のヘリックスBは、ヘリックスB1及びヘリックスB2を含んで成る。

10

【0046】

ヒトIL-2のヘリックスB1は、配列番号162のアミノ酸残基73 (Ala) ~80 (Gln) (配列番号161のヌクレオチド264~287) から構成される。ヒトIL-2のヘリックスB2は、配列番号162のアミノ酸残基83 (Glu) ~92 (Val) (配列番号161のヌクレオチド294~323) から構成される。従って、IL-2のヘリックスB (ヘリックスB1及びB2を含んで成る) は、配列番号168のアミノ酸配列 (配列番号167のヌクレオチド配列) により示され、ここでアミノ酸残基9及び10はいずれのアミノ酸でもあり得る。

【0047】

配列番号168は、配列番号162のアミノ酸73 (Ala) ~92 (Val) と同一であり、ここでアミノ酸81及び82はいずれのアミノ酸であっても良い。好ましい形においては、IL-2のヘリックスBは、配列番号162のアミノ酸73 (Ala) ~92 (Val) (配列番号161のヌクレオチド264~323) を含んで成る。ヒトIL-2のヘリックスCは、配列番号162のアミノ酸残基102 (His) ~116 (Val) (配列番号162のアミノ酸残基134 (Thr) ~149 (Gln) (配列番号161のヌクレオチド447~494) から構成される。

20

【0048】

ヒトIL-4についてのポリヌクレオチド配列は、配列番号163で示され、そしてその対応するアミノ酸配列は配列番号164で示される。分泌シグナル配列は、配列番号164のアミノ酸残基1 (Met) ~24 (Gly) (配列番号163のヌクレオチド64~135) から構成される。成熟ポリペプチドは、配列番号164のアミノ酸残基25 (His) ~153 (Ser) (配列番号163のヌクレオチド136~522) から構成される。ヒトIL-4のヘリックスAは、配列番号164のアミノ酸残基30 (Thr) ~42 (Thr) (配列番号163のヌクレオチド151~189) から構成される。ヒトIL-4のヘリックスBは、配列番号164のアミノ酸残基65 (Glu) ~83 (His) (配列番号163のヌクレオチド256~312) から構成される。ヒトIL-4のヘリックスCは、配列番号164のアミノ酸残基94 (Ala) ~118 (Ala) (配列番号163のヌクレオチド343~417) から構成される。ヒトIL-4のヘリックスDは、配列番号164のアミノ酸残基133 (Leu) ~151 (Cys) (配列番号163のヌクレオチド460~516) から構成される。

30

【0049】

ヒトGM-CSFについてのポリヌクレオチド配列は、配列番号165で示され、そしてその対応するアミノ酸配列は配列番号166で示される。分泌シグナル配列は、配列番号166のアミノ酸残基1 (Met) ~17 (Ser) (配列番号165のヌクレオチド9~59) から構成される。成熟ポリペプチドは、配列番号166のアミノ酸残基18 (Ala) ~144 (Glu) (配列番号165のヌクレオチド60~440) から構成される。ヒトGM-CSFのヘリックスAは、配列番号166のアミノ酸残基30 (Trp) ~44 (Asn) (配列番号165のヌクレオチド96~140) から構成される。

40

【0050】

ヒトGM-CSFのヘリックスBは、配列番号166のアミノ酸残基72 (Leu) ~81 (Gln) (配列番号165のヌクレオチド222~251) から構成される。ヒトGM-CSFのヘリックスCは、配列番号166のアミノ酸残基85 (Gly) ~103 (Gln) (配列番号165のヌクレオチド261~317) から構成される。ヒトGM-CSFのヘリックスDは、配列番号166のアミノ酸残基120 (Phe) ~131 (Leu) (配列番号165のヌクレオチド366~401) から構成される。

50

ヒトzcytor17lig, IL-3, IL-2, IL-4及びGM-CSFに関して、ヘリックスA, B, C及びDを含んで成るアミノ酸残基が、表1に示される。

【0051】

【表1】

表1:

	ヘリックスA	ヘリックスB	ヘリックスC	ヘリックスD	
zcytor17lig	38-52	83-98	104-117	137-152	配列番号2の
IL-3	35-45	73-86	91-103	123-141	配列番号102の
IL-2	27-48	73-92	102-116	134-149	配列番号162の、又は配列番号168に記載されるようなヘリックスB
IL-4	30-42	65-83	94-118	133-151	配列番号164の
GM-CSF	30-44	72-81	85-103	120-131	配列番号166の

【0052】

本発明はまた、ポリヌクレオチド分子、本明細書に開示されるzcytor17ligポリペプチドをコードするDNA及びRNA分子を提供する。当業者は、遺伝子コードの縮重の観点から、相当の配列変動がそれらのポリヌクレオチド分子間で可能であることを容易に認識するであろう。配列番号3は、配列番号2のzcytor17ligポリペプチド、及びそのフラグメントをコードするすべてのDNAを包含する縮重DNA配列である。当業者はまた、配列番号3の変性配列がUとTとを置換することによって、配列番号2をコードするすべてのRNA配列も供給することを理解するであろう。

【0053】

従って、配列番号3のヌクレオチド1又は70-492を含んで成る、zcytor17ligポリペプチド-コードのポリヌクレオチド及びそれらのRNA相当物は、本発明により包含される。表2は、縮重ヌクレオチド位置を示すために、配列番号3内に使用される1文字コードを示す。“決定”は、コード文字により示されるヌクレオチドである。“補体”とは、相補的ヌクレオチドのためのコードを示す。例えば、コードYはC又はTのいずれかを示し、そしてその補体RはA又はGを示し、AはTに対して相補的であり、そしてGはCに対して相補的である。

【0054】

10

20

30

40

【表 2】

表 2

ヌクレオチド	解	相補体	解
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

20

【 0 0 5 5 】

30

与えられたアミノ酸のためのすべての可能なコドンを含む配列番号 3 に使用される縮重コドンが表 3 に示される。

【表 3】

表 3

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	10
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	20
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	30
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	
Asn Asp	B		RAY	
Glu Gln	Z		SAR	40
任意	X		NNN	

【0056】

当業者は、いくらかのあいまいさが、個々のアミノ酸をコードするすべての可能なコドンの代表である縮重コドンの決定において導入されることを理解するであろう。例えば、セリン (WSN) のための縮重コドンは、ある環境下で、アルギニン (AGR) をコードすることができ、そしてアルギニン (MGN) のための縮重コドンは、ある環境下で、セリン (AGY) をコードすることができる。類似する関係が、フェニルアラニン及びロイシンをコードするコドン間に存在する。従って、縮重配列により包含されるいくつかのポリヌクレオチ

ドは、変異体アミノ酸配列をコードすることができるが、しかし当業者は、配列番号2のアミノ酸配列への参照によりそのような変異体配列を容易に同定することができる。変異体配列は、本明細書に記載のようにして官能性について容易に試験され得る。

【0057】

当業者はまた、異なった種が“選択的コドン使用法”を示すことも理解するであろう。一般的には、Grantham, など., Nuc. Acids Res. 8: 1893-912, 1980; Haas, など., Curr. Biol. 6: 315-24, 1996; Wain-Hobson, など., Gene 13: 355-64, 1981; Grosjean and Fiers, Gene 18: 199-209, 1982; Holm, Nuc. Acids Res. 14: 3075-87, 1986; Ikemura, J. Mol. Biol. 158: 573-97, 1982を参照のこと。本明細書において使用される場合、用語、“選択的コドン使用法”又は“選択的コドン”とは、一定の種の細胞に最も頻繁に使用され、従って個々のアミノ酸をコードする可能なコドンの1又は少数の代表を好むタンパク質翻訳コドンを言及する技術的用語である(表3を参照のこと)。

10

【0058】

例えば、アミノ酸トレオニン(Thr)は、ACA、ACC、ACG、又はACTによりコードされるが、しかし哺乳類細胞においては、ACCが最も通常に使用されるコドンであり；他の種においては、例えば昆虫細胞、酵母、ウィルス又は細菌においては、異なったThrコドンが好ましい。特定の種のための選択的コドンは、当業界において知られている種々の方法により、本発明のポリヌクレオチド中に導入され得る。

【0059】

例えば、組換えDNA中への選択的コドン配列の導入は、特定の細胞型又は種内でタンパク質の翻訳により効果的にすることによって、そのタンパク質の生成を増強する。従って、配列番号3に開示される縮重コドン配列は、当業界において通常使用され、そして本明細書において開示される種々の細胞型及び種においてポリペプチドの発現を最適化するための鑄型として作用する。選択コドンを含む配列は、種々の種における発現について試験され、そして本明細書に開示される官能性について試験され得る。

20

【0060】

前で示されたように、本発明の単離されたポリヌクレオチドは、DNA及びRNAを包含する。DNA及びRNAを調製するための方法は、当業界において良く知られている。一般的には、RNAは、多量のzytor17lig RNAを生成する組織又は細胞から単離される。そのような組織及び細胞は、ノザンブロット(Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5201, 1980)により、又は標的細胞又は組織に対する活性について種々の細胞型からのならし培地をスクリーニングすることにより同定される。

30

【0061】

前記活性、又はRNA生成細胞又は組織が同定されると、全RNAは、グアニジウム HCl抽出、続くCsClグラジエントにおける遠心分離による単離により調製され得る(Chirgwinなど., Biochemistry 18:52-94, 1979)。ポリ(A)⁺ RNAは、Aviv and Leder (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 1408-1412, 1972)の方法を用いて全RNAから調製される。相補的DNA(cDNA)は、既知の方法を用いて、ポリ(A)⁺ RNAから調製される。他方では、ゲノムDNAが単離され得る。次に、zytor17ligポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが、例えばハイブリダイゼーション又はポリメラーゼ鎖反応(PCR)により同定され、そして単離される。

40

【0062】

zytor17ligをコードする十分な長さのクローンは、従来のクローニング方法により得られる。相補的DNA(cDNA)クローンが好ましいが、但し、いくつかの用途(例えば、トランスジェニック動物における発現)に関しては、ゲノムクローンを使用し、又は少なくとも1つのゲノムイントロンを含むようcDNAクローンを修飾することが好ましい。cDNA及びゲノムクローンを調製するための方法は、よく知られており、そして当業者のレベルの範囲内であり、そしてライブラリーをプローブし又は感作するために、本明細書に開示される配列又はその一部の使用を包含する。発現ライブラリーは、zytor17lig、受容体フラグメント、又は他の特定の結合パートナーに対する抗体によりプローブされ得る。

50

【0063】

本発明書に開示されるzcytor17ligポリヌクレオチド配列はまた、zcytor17lig遺伝子の5'非コード領域をクローン化するためのプローブ又はプライマーとしても使用され得る。zcytor17ligについて観察される組織特異的発現を考慮して、この遺伝子領域は、造血及びリンパ系特異的発現を提供することが予測される。zcytor17lig遺伝子のプロモーター要素は、例えば遺伝子療法により処理されたトランスジェニック動物又は患者において異種遺伝子の組織特異的発現を指図するために使用され得る。5'フランキング配列のクローニングはまた、アメリカ特許第5,641,670号に開示されるように、“遺伝子活性化”によりzcytor17ligタンパク質の生成を促進する。

【0064】

手短には、細胞における内因性zcytor17lig遺伝子の発現は、zcytor17lig遺伝子座中に、少なくとも1つの標的配列、調節配列、エキソン及び不対スプライスドナー部位を含んで成るDNA構造体を導入することによって、変更される。前記標的配列は、内因性zcytor17lig遺伝子座を有する構造体の相同組換えを可能にするzcytor17lig 5'非コード配列であり、それにより、その構造体内の配列は内因性zcytor17ligコード配列により作用可能に転結されるようになる。この手段においては、内因性zcytor17ligプロモーターが、増強された、組織特異性の、又は他方では、調節された発現を提供するために、他の調節配列により置換されるか、又はそれにより補充され得る。

【0065】

本発明はさらに、他の種（オルト体）からの相対物リガンド及びポリヌクレオチドを供給する。これらの種は、哺乳類、鳥類、両性類、ハ虫類、魚類、昆虫及び他の脊椎及び無脊椎動物種を包含するが、但しそれらだけには限定されない。特に興味あるものは、他の哺乳類種、例えばネズミ、ブタ、羊、ウシ、犬、ネコ、馬及び他の霊長類ポリペプチドからのzcytor17ligポリペプチドである。ヒトzcytor17ligポリペプチドのオルト体は、従来のクローニング技法と組合して、本発明により供給される情報及び組成物を用いてクローン化され得る。例えば、cDNAは、zcytor17ligを発現する組織又は細胞型から得られるmRNAを用いてクローン化され得る。mRNAの適切な源は、本明細書に開示される配列から企画されたプローブによりノザン プロットをプローブすることによって同定され得る。

【0066】

次に、ライブラリーが陽性の組織又は細胞系のmRNAから調製される。次に、オルト体のzcytor17ligコードのcDNAが種々の方法、例えば完全な又は部分的なヒトcDNAにより、又は前記開示される配列に基づく1又は複数の変性プローブにより、プローブすることによって単離され得る。cDNAはまた、本明細書に開示される代表的なヒトzcytor17lig配列から企画されたプライマーを用いて、PCR（Mullis, アメリカ特許第4,683,202号）を用いてもクローン化され得る。さらなる方法においては、cDNAライブラリーが宿主細胞を形質転換し、又はトランスフェクトするために使用され、そして興味あるcDNAの発現がzcytor17ligポリペプチドに対する抗体により検出され得る。類似する技法がまた、ゲノムクローンの単離に適用され得る。

【0067】

zcytor17ligのマウスオルト体についてのポリヌクレオチド配列は、同定されており、そして配列番号10及び90で示され、そしてその対応するアミノ酸配列は配列番号11及び91で示される。配列番号11のポリペプチドをコードする変性ポリヌクレオチド配列は、配列番号12で示される。zcytor17ligマウスサイトカインアミノ酸配列に関しては、配列番号11及び92で示されるように、ヘリックスAはアミノ酸残基38～52により定義され；ヘリックスBはアミノ酸残基85～98により定義され；ヘリックスCはアミノ酸残基104～118により定義され；そしてヘリックスDはアミノ酸残基141～157により定義されることが予測される。

【0068】

zcytor17ligのアミノ酸配列（配列番号2及び11）の完全な長さにわたって、マウス配列とヒト配列との間に31%の同一性が存在する。マウスzcytor17ligについての成熟配列

10

20

30

40

50

は、配列番号11で示されるように、Met₁で推定上開始し、これは、ヒト配列においては、配列番号2で示されるように、Met₁に対応する。組織分析は、マウスzcytor17ligの発現精巢、脳、CD90+細胞、前立腺細胞、唾液腺及び皮膚に見出されることを示した。293T細胞からの精製されたzcytor17ligのさらなるN-末端配列分析は、配列番号11及び91で示されるように、残基31 (Ala) でのN-末端を示し、そして成熟ポリペプチドは、アミノ酸残基31 (Ala) ~163 (Cys) (配列番号11及び91で示されるように) から成る。

【0069】

当業者は、配列番号1に開示される配列がヒトzcytor17ligの単一の対立遺伝子を表し、そして対立遺伝子変動及び交互のスプライシングが生じることが予測されることを認識するであろう。この配列の対立遺伝子変異体は、標準の方法に従って、異なった個人からのcDNA又はゲノムライブラリーをプローブすることによってクローン化され得る。配列番号1に示されるDNA配列の対立遺伝子変異体、例えばサイレント突然変異を含むそれらの変異体及び突然変異がアミノ酸配列変更をもたらすそれらの変異体は、配列番号2の対立遺伝子変異体であるタンパク質と同じように、本発明の範囲内である。zcytor17ligポリペプチドの性質を保持する、もう1つのスプライスされたmRNAから生成されるcDNAは、そのようなcDNA及びmRNAによりコードされるポリペプチドと同じように、本発明の範囲内に包含される。それらの配列の対立遺伝子変異体及びスプライス変異体は、当業界において知られている標準の方法に従って、異なった個人又は組織からのcDNA又はゲノムライブラリーをプローブすることによってクローン化され得る。

【0070】

本発明はまた、診断用途に使用される試薬を提供する。例えば、zcytor17lig遺伝子、すなわちzcytor17lig DNA又はRNA又はその副配列を含んで成るプローブは、zcytor17lig遺伝子がヒト染色体、例えば染色体12上に存在するかどうか、又は突然変異が生じたかどうかを決定するために使用され得る。zcytor17ligは染色体12の12q24.31領域に存在する(例13を参照のこと)。zcytor17lig遺伝子座での検出できる染色体異常型は、異数性、遺伝子コピー数変化、異種性の損失(LOH)、トランスロケーション、挿入、欠失、制限部位変更及び転位を包含するが、但しそれらだけには限定されない。

【0071】

それらの異常性は、コード配列内、イントロン内、又は上流のプロモーター及び調節領域を包含するフランキング配列内で発生することができ、そしてコード配列内での物理的変更、又は遺伝子発現レベルでの変化として明らかである。そのような異常性は、分子遺伝学的技法、例えば制限フラグメント長さ多型現象(RELP)分析、PCR技法を用いる短いタンデム反復体(STR)分析、及び当業界において知られている他の遺伝子連鎖分析技法を用いることによって、本発明のポリヌクレオチドを用いて検出され得る(Sambrookなど., 前記; Ausubel など., 前記; Marian, Chest 108: 255-65, 1995)。

【0072】

遺伝子位置の正確な知識は、次のような多くの目的のために有用である: 1) 配列が存在するコンティグの一部であるかどうかの決定及び種々の形、例えばYAC, BAC又はcDNAクローンにおける追加の周囲遺伝子配列の獲得; 2) 同じ染色体領域への結合を示す遺伝的な疾病についての可能な候補体遺伝子の提供; 及び3) 特定遺伝子が有する機能の決定を助けるモデル生物、例えばマウスの相互参照。

【0073】

当業者は、12q24領域が時折、種々の癌に関連する全体的なゲノム転位、例えばトランスロケーション、欠失、逆位及び重複に包含されることを認識するであろう。インターネット上に位置する、the Mitelan Database of Chromosomal Aberrations in Cancer, at the Cancer Genome Anatomy Project, National Institutes of Health, Bethesda, Mdは、12q24を包含するゲノム転位を有する199の癌の症例を列挙する。それらのうち、ほとんどは、他の転位を有する複雑な核型の一部であり; しかしながら、いくつかの場合、12q24に関連する転位が、唯一のゲノム変更である。

【0074】

リンパ及び骨髄性系統の細胞上でのzcytor17ligのための受容体の発現が存在するなら、トランスロケーション（2つの症例：Yamagataなど., Cancer Genet 114: 51-57, 1999）、又は重複（2つの症例：Bonamiなど., Cancer Genet Cytogenet 108: 75-78, 1999）のいずれかが唯一のゲノム変更である、文献に報告される骨髄性白血病の少なくとも4つの症例が存在することを注目することは特に有意である。これは、12q24内に存在する遺伝子又は遺伝子類がそれらの患者の細胞の悪性形質転換に直接的に包含され得る。zcytor17ligの不適切な過剰発現は、オートクライン又はパラクリン機構のいずれかを通して、受容体—担持の細胞の異常増殖を促進することによって、悪性形質転換に寄与する。

【0075】

従って、zcytor17lig活性の阻害が、そのような細胞の増殖を阻害する。他方では、zcytor17lig遺伝子の不活性化をもたらすゲノム転位は、zcytor17lig免疫調節機能を除くことによって、悪性形質転換及び/又は転移を促進することができる。実際、前立腺癌における転移を抑制する遺伝子は、12q24-qter上に位置づけられている（Ichikawaなど., Asian J. Androl. 2: 167-171, 2000）。zcytor17ligが転移の抑制を担当するこの領域内の遺伝子である場合、zcytor17lig自体は、癌の処理において治療価値を有することができる。

【0076】

診断は、疾病のタイプ及び適切な関連する治療の決定において医者を助けることができるか、又は遺伝的カウンセリングを助けることができる。それ自体、本発明の抗-zcytor17lig抗体、ポリヌクレオチド及びポリペプチドは、zcytor17ligポリペプチド、mRNA又は抗-zcytor17lig抗体の検出のために使用され、従って当業界において知られており、そして本明細書において記載される方法を用いて、本明細書に記載されるようにして、遺伝的疾患又は癌の検出のためのマーカーとして作用し、そしてそのために直接的に使用される。

【0077】

さらに、zcytor17ligポリヌクレオチドプローブは、ヒト疾病に関連する染色体12q24.3欠失及びトランスロケーション、又は悪性又は他の癌における染色体転位に関与することが予測される、腫瘍の悪性進行又は他の12q24.3突然変異に関与する他のトランスロケーションに関連する異常性又は遺伝子型を検出するために使用され得る。同様に、zcytor17ligポリヌクレオチドプローブが、染色体12三染色体性、及びヒト疾病又は自然流産に関連する染色体欠失に関連する異常性又は遺伝子型を検出するために使用され得る。従って、zcytor17ligポリヌクレオチドプローブは、それらの欠陥の関連する異常性又は遺伝子型を検出するために使用され得る。

【0078】

当業者は、zcytor17ligポリヌクレオチドプローブが異種性の損失（LOH）、染色体獲得（例えば、トリソミー）、トランスロケーション、DNA増幅、及び同様のものに関連する全体的な染色体異常性の診断のために特に有用であることを認識するであろう。zcytor17lig遺伝子が位置する染色体遺伝子座12q24.3内でのトランスロケーションは、ヒト疾病に関連していることが知られている。例えば、12q24欠失及びトランスロケーション、重複及びトリソミーは、上記で論じられたような癌に関連している。従って、zcytor17lig遺伝子は、この決定的な領域に位置するので、本発明のzcytor17ligポリヌクレオチドプローブは、12q24トランスロケーション、欠失、トリソミー及び同様のものに関連する異常性又は遺伝子型を検出するために使用され得る。

【0079】

上記で論じられるように、zcytor17lig遺伝子自体における欠陥は、遺伝性ヒト疾病状態をもたらすことができる。本発明の分子、例えば本発明のポリペプチド、アンタゴニスト、アゴニスト、ポリヌクレオチド及び抗体は、zcytor17lig遺伝子欠陥に関連する疾患の検出、診断予防及び処理を助ける。さらに、zcytor17ligポリペプチドプローブは、zcytor17lig染色体遺伝子座で、疾患又は非疾患の個人間での対立遺伝子差異を検出するために使用され得る。それ自体、zcytor17lig配列は、法的なDNAプロファイリングにおける診

断として使用され得る。

【0080】

一般的に、患者における遺伝子異常性又は異常型を検出するために遺伝子連鎖分析に使用される診断方法は、当業界において知られている。分析用プローブは一般的に、少なくとも20個の長さのntを有するが、但し幾分短いプローブも使用され得る（例えば、14-17 nt）。PCRプライマーは、少なくとも5個の長さのnt、好ましくは15又はそれ以上の長さのnt、より好ましくは20-30個の長さのntである。遺伝子又は染色体DNAの全体的な分析のために、zcytor17ligポリヌクレオチドプローブは、完全なエキソン又はそれ以上を含むことができる。エキソンは、zcytor17lig配列（配列番号1）とマウスzcytor17ligについてのゲノムDNA（配列番号76）とを比較することによって、容易に決定される。一般的に、患者における遺伝子異常性又は異常型を検出するために遺伝子連鎖分析に使用される診断方法は、当業界に知られている。

10

【0081】

ほとんどの診断方法は、(i) 潜在的に疾病の患者、疾病の患者又は劣性疾病対立遺伝子の可能性ある非疾病キャリアーから遺伝子サンプルを得；(ii) zcytor17ligポリヌクレオチドプローブと共に遺伝子サンプルをインキュベートすることにより（ここで、前記ポリヌクレオチドは、RFIP分析においては、相補的ポリヌクレオチド配列にハイブリダイズするであろう）、又は適切なPCR反応条件下でPCR反応において、センス及びアンチセンスプライマーと共に遺伝子サンプルをインキュベートすることにより、第1反応生成物を生成し；(iii) 前記第1反応生成物を、電気泳動及び/又は他の既知方法により可視化し、例えば、前記第1反応生成物を、zcytor17ligポリヌクレオチドプローブ（ここで、前記ポリヌクレオチドは第1反応の相補的ポリヌクレオチド配列にハイブリダイズするであろう）により可視化し、そして(iv) 正常又は対照の個人からの遺伝子サンプルの第2対照反応生成物と、前記可視化された第1反応生成物とを比較する段階を含んで成る。

20

【0082】

第1反応生成物と対照反応生成物との間の差異は、疾病又は潜在的に疾病の患者における遺伝子異常性の、又は非疾病患者についてのヘテロ接合性劣性キャリアー表現型の存在の、又は疾病患者からの腫瘍における遺伝子欠陥の存在の、又は胎児又は移植前胚における遺伝子異常性の存在の表示である。例えば、制限フラグメントパターン、PCR生成物の長さ、zcytor17lig遺伝子座の反復性配列の長さ、及び同様のもの差異は、遺伝子異常性、遺伝子異常型、又は正常な対照に比較しての対立遺伝子差異の表示である。対照は、サンプルの試験及び利用性に依存して、影響されていないファミリーメンバー又は無関係の個人からであり得る。

30

【0083】

本発明内への使用のための遺伝子サンプルは、患者からのいずれかの組織又は他の生物学的サンプル、例えば血液、唾液、精子、胚細胞、羊水及び同様のもの（但し、それらだけには限定されない）から単離されたゲノムDNA、mRNA及びcDNAを包含する。ポリヌクレオチドプローブ又はプライマーは、RNA又はDNAであり得、そして配列番号1の一部、配列番号1の補体、又はそれらのRNA同等物を含んで成る。ヒト疾病表現型への遺伝子連鎖分析を示すそのような方法は、当業界において良く知られている。

40

【0084】

診断における、PCRに基づく方法の参照のためには、一般的、次の文献を参照のこと：Mathew (ed.), *Protocols in Human Molecular Genetics* (Humana Press, Inc. 1991), White (ed), *PCR Protocols; Current Methods and Applications* (Humana Press, Inc. 1993), Cotter (ed), *molecular Diagnosis of Cancer* (Humana Press, Inc. 1996), Hanau sek and Walaszek (eds.), *Tumor Marker Protocols*. (Humana Press, Inc. 1998). Lo (ed), *Clinical Application of PCR* (Humana Press, Inc. 1998), 及びMeltzer (ed), *PCR in Bioanalysis* (Humana Press. Inc. 1998))。

【0085】

zcytor17lig遺伝子座に関連する突然変異は、直接的な突然変異分析のための標準の方

50

法、例えば制限フラグメント長さ他型現象分析、PCR技法を用いる短いタンデム反復体分析、増幅—不応性突然変異システム分析、一本鎖コンホメーション多型現象検出、RNアーゼ切断方法、変性グラジエントゲル電気泳動、蛍光—助力のミスマッチ分析、及び当業界において知られている他の遺伝子分析により、本発明の核酸分子を用いて検出され得る（例えば、Mathew (ed.), *Protocols in Human Molecular Genetics* (Humana Press, Inc. 1991), Marian, *Chest* 108: 255 (1995), Coleman and Tsongalis, *Molecular Diagnostics* (Human Press, Inc. 1996), Elles (ed.) *Molecular Diagnosis of Genetic Diseases* (Humana Press, Inc. 1996), Landegren (ed.), *Laboratory Protocols for Mutation Detection* (Oxford University Press 1996), Burren など. (eds.), *Genome Analysis*, Vol. 2: *Detecting Genes* (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1998), Dracopoli など. (eds.), *Current Protocols in Human Genetics* (John Wiley & Sons 1998), 及び Richards and Ward, “Molecular Diagnostic Testing,” in *Principles of Molecular Medicine*, Pages 83-88 (Humana Press, Inc. 1998) を参照のこと）。

10

【0086】

突然変異についてのzcytor17lig遺伝子の直接的な分析は、対象のゲノムDNAを用いて行われ得る。末梢血液リンパ球から得られるゲノムDNAを増幅するための方法は、当業者に良く知られている（例えば、Dracopoliなど. (eds.), *Current Protocols in Human Genetics*, at page 7.1.6 to 7.1.7 (John Wiley & Sons 1998) を参照のこと）。

【0087】

マウスzcytor17lig遺伝子におけるイントロン位置は、ゲノムクローンの同定、続くイントロン/エキソン連結の分析により決定された。マウスゲノムDNAは、配列番号76で示される。配列番号76に関しては、イントロンにより分離される次の3種のコードエキソンが明らかである：第1のコードエキソンは配列番号76の核酸番号1104～1119間に存在し、第2のエキソンは配列番号76の核酸番号1300～1451間に存在し、そして第3のエキソンは配列番号76の核酸番号2411～2998間に存在する。

20

【0088】

本発明の好ましい態様においては、単離されたzcytor17lig—コードの核酸分子は、緊縮条件下で、配列番号1のヌクレオチド配列を有する核酸分子、配列番号1のヌクレオチド28～519のヌクレオチド配列を有する核酸分子、又は配列番号1に対して相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子にハイブリダイズすることができる。一般的に、緊縮条件は、定義されたイオン強度及びpHで、特定の配列のための熱溶融点 (T_m) よりも約5℃低くなるよう選択される。 T_m は、標的配列の50%が好ましく適合されたプローブにハイブリダイズする温度（定義されたイオン強度及びpH下で）である。

30

【0089】

1対の核酸分子、例えばDNA-DNA、RNA-RNA及びDNA-RNAは、ヌクレオチド配列がいくらかの程度の相補性を有する場合、ハイブリダイズすることができる。ハイブリッド二重ヘリックスにおけるミスマッチ塩基対を許容できるが、しかしハイブリッドの安定性はミスマッチの程度により影響される。ミスマッチハイブリッドの T_m は、1～1.5%の塩基対ミスマッチごとに1℃低下する。ハイブリダイゼーション条件の緊縮性の変更は、ハイブリッドに存在するであろうミスマッチの程度に対する制御を可能にする。緊縮性の程度は、ハイブリダイゼーション温度が上昇し、そしてハイブリダイゼーション緩衝液のイオン強度が低下するにつれて、上昇する。

40

【0090】

それは特定のポリペプチドハイブリッドとの使用のためのそれらの条件を適合するために、十分に当業者の能力の範囲内である。特定の標的配列についての T_m は、標的配列の50%が完全に適合されたプローブ配列にハイブリダイズするであろう温度（定義された条件下での）である。 T_m に影響を及ぼすそれらの条件は、ポリヌクレオチドプローブのサイズ及び塩基対含有率、ハイブリダイゼーション溶液のイオン温度、及びハイブリダイゼーション溶液における不安定化剤の存在を包含する。

【0091】

50

T_m を計算するための多くの等式は当業界において知られており、そして種々の長さのDNA、RNA及びDNA-RNAハイブリッド及びポリヌクレオチドプローブ配列に対して特異的である（例えば、Sambrook など., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (Cold Spring Harbor Press 1988) ; Ausubel など., (eds.), Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Inc. 1987); Berger and Kimmel (eds.), Guide to Molecular Cloning Techniques, (Academic Press, Inc. 1987); 及びWetmur, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 26:227 (1990)を参照のこと）。

【0092】

配列分析ソフトウェア、例えばOLIGO6.0 (LSR; Long Lake, MN) 及びPrimer Premier 4.0 (Premier Biosoft International; Palo Alto, CA), 並びにインターネット上のサイトが所定の配列を分析し、そして使用者の定義された基準に基づいて T_m を計算するための手段を入手できる。そのようなプログラムはまた、定義された条件下で所定の配置を分析し、そして適切なプローブ配列を同定することができる。典型的には、50以上の塩基対の長いポリヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションは、計算された T_m よりも約20~25℃低い温度で行われる。50以下の塩基対の小さなプローブに関しては、ハイブリダイゼーションは典型的には、 T_m 又はそれよりも5~10℃以下で行われる。これは、DNA-DNA及びDNA-RNAハイブリッドに関して、最大速度のハイブリダイゼーションを可能にする。

【0093】

ハイブリダイゼーションに続いて、核酸分子は、緊縮条件下で、又は高い緊縮条件下で、ハイブリダイズされなかった核酸分子を除去するために洗浄され得る。典型的な緊縮洗浄条件は、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を含む0.5×~2×SSC溶液による55~65%での洗浄を包含する。すなわち、変異体zcytor17ligポリペプチドをコードする核酸分子は、緊縮洗浄条件下で、配列番号1のヌクレオチド配列（又はその補体）を有する核酸分子とハイブリダイズし、ここで前記洗浄緊縮性は、55~65℃での、0.1%SDSを含む0.5×~2×SSC溶液、例えば55℃での、0.1%SDSを含む0.5×SSC溶液、又は65℃での0.1%SDSを含む2×SSC溶液に等しい。当業者は、例えば洗浄溶液におけるSSCをSSPEにより置換することによって同等の条件を容易に製造することができる。

【0094】

典型的な高い緊縮洗浄条件は、50~65℃での0.1%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を含む0.1×~0.2×SSCの溶液による洗浄を包含する。換言すれば、変異体zcytor17ligポリペプチドをコードする核酸分子は、高い緊縮洗浄条件下で、配列番号1のヌクレオチド配列（又はその補体）を有する核酸分子とハイブリダイズし、ここで前記洗浄緊縮性は、50~65℃での、0.1%SDSを含む0.1×~0.2×SSC溶液、例えば50℃での、0.1%SDSを含む0.1×SSC溶液、又は65℃での0.1%SDSを含む0.2×SSC溶液に等しい。

【0095】

本発明はまた、配列番号2のポリペプチド又はそれらのオルト体に対して実質的に類似する配列同一性を有する単離されたzcytor17ligポリペプチドも提供する。用語“実質的に類似する配列同一性”とは、配列番号2で示される配列又はそれらのオルト体に対して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は99%以上の配列同一性を有するポリペプチドを示すために本明細書において使用される。本発明はまた、配列番号2のアミノ酸残基1-162又は33-162の配列に対して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は99%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含んで成るポリペプチドも包含する。本発明はさらに、そのようなポリペプチドをコードする核酸分子も包含する。％同一性を決定するための方法は、下記に記載される。

【0096】

本発明はまた、2種の次の基準を用いて同定され得る変異体zcytor17lig核酸分子を企画する：上記記載のような、配列番号2のアミノ酸配列とコードされたポリペプチドとの間の類似性の決定、及びハイブリダイゼーションアッセイ。そのようなzcytor17lig変異

体は、(1) 55～65℃での0.1%SDSを含む $0.5 \times \sim 2 \times$ SSC溶液に等しい緊縮洗浄条件下で、配列番号1のヌクレオチド配列（又はその補体）を有する核酸分子とハイブリダイズし、そして(2) 配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は99%以上の配列同一性を有するポリペプチドをコードする核酸分子を包含する。

【0097】

あるいは、zcytor17lig変異体は、(1) 50～65℃での0.1%SDSを含む $0.1 \times \sim 0.2 \times$ SSC溶液に等しい、高い緊縮洗浄条件下で、配列番号1のヌクレオチド配列（又はその補体）を有する核酸分子とハイブリダイズし、そして(2) 配列番号2のアミノ酸配列に対して

10

【0098】

%配列同一性は、従来の方法により決定される。例えば、Altschulなど., Bull. Math. Bio. 48 : 603–616, 1986及びHenikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 10915–10919, 1992を参照のこと。手短に言及するば、2種のアミノ酸配列が、10のギャップ開始ペナルティー、1のギャップ拡張ペナルティー、及び表4（アミノ酸は標準の1文字コードにより示される）に示されるようなHenikoff and Henikoff（前記）の“blosum 62” 評点マトリックスを用いて、その整合評点を最適化するために整合される。次に、%同一性が次のようにして計算される：

20

【0099】

【数1】

$$\frac{\left[\text{同一適合するものの合計数} \right]}{\left[\begin{array}{l} \text{長い方の配列の長さ+2つの配列を} \\ \text{整合させるために長い方の配列に導} \\ \text{入されるギャップの数} \end{array} \right]} \times 100$$

30

【0100】

【表 4】

表 4

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																10
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								20
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
																				30

【0101】

当業者は、2種のアミノ酸配列を整列するために多くの確立されたアルゴリズムが存在することを理解している。Pearson and Lipmanの“FASTA”類似性調査アルゴリズムは、本明細書に開示されるアミノ酸配列及び推定上の変異体ZCYT018のアミノ酸配列により共有される同一性のレベルを試験するための適切なタンパク質整列方法である。前記FASTAアルゴリズムは、Pearson and Lipman, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), 及びPearson, Meth. Enzymol. 183: 63 (1990) により記載される。

【0102】

手短には、FASTAがまず、問題の配列（例えば、配列番号2）及び保存性アミノ酸置換、挿入又は欠失を考慮しないで、最高密度の同一性（ktup変数が1である場合）又は対の同一性（ktup=2である場合）のいずれかを有する試験配列により共有される領域を同定することによって配列を特徴づける。次に、最高密度の同一性を有する10の領域が、アミノ酸置換マトリックスを用いて、すべての対合されたアミノ酸の類似性を比較することによって再評価され、そして前記領域の末端が、最高の評点に寄与するそれらの残基のみを含むよう“整えられる”。

【0103】

“カットオフ”値（配列の長さ及びktup値に基づいて予定された式により計算される）よりも高い評点を有するいくつかの領域が存在する場合、その整えられた初期領域が、そ

10

20

30

40

50

の領域がギャップとのおおよそその一列配列を形成するために結合され得るかどうかを決定するために試験される。最終的に、2種のアミノ酸配列の最高評点領域が、アミノ酸挿入及び欠失を可能にする、Needleman-Wunsch アルゴリズム (Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 444, 1970; Sellers, SIAM J. Appl. Math. 26: 787, 1974) の変法を用いて整列される。FASTA 分析のための例示的なパラメーターは次のものである: ktup=1、ギャップ開始ペナルティー=10、ギャップ拡張ペナルティー=1 及び置換マトリックス=BLOSUM62。それらのパラメーターは、Appendix 2 of Pearson, 1990 (前記) に説明されるように、評点マトリックスを調節することによって FASTA プログラム中に導入され得る。

【0104】

FASTA はまた、上記に開示されるような割合を用いて、核酸分子の配列同一性を決定するためにも使用され得る。ヌクレオチド配列比較のためには、ktup 値は、誤りとして設定される他のパラメーターを伴って、1~6、好ましくは 4~6 であり得る。

10

【0105】

変異体 zcytor17lig ポリペプチド及び実質的に類似する配列同一性は、1 又は複数のアミノ酸置換、欠失又は付加を有するものとして特徴づけられる。それらの変化は、好ましくは、保存性アミノ酸置換 (表 5 を参照のこと) 及びタンパク質及びポリペプチドの折りたたみ又は活性に実質的に影響を及ぼさない他の置換; 小さな欠失、典型的には 1~約 30 個のアミノ酸の欠失; 及び小さなアミノ-又はカルボキシル-末端の延長、例えばアミノ-末端メチオニン残基、約 20~25 個までの残基の小さなリンカーペプチドの延長、又は親和性標識の延長である。

20

【0106】

従って、本発明は、配列番号 2 のその対応する領域に対して、少なくとも 70%、好ましくは少なくとも 90%、およびより好ましくは 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 99% 以上の同一性を有する配列を含んでなる、約 108~216 個のアミノ酸残基のポリペプチドを包含する。親和性標識を含んで成るポリペプチドはさらに、zcytor17lig ポリペプチドと親和性標識との間にタンパク質分解部位を含む。好ましいそのような部位は、トロンビン分解部位及び第 Xa 因子分解部位を含む。

【0107】

【表 5】

表 5
保存性アミノ酸置換

塩基性：	アルギニン	
	リシン	
	ヒスチジン	
酸性：	グルタミン酸	
	アスパラギン酸	10
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	
芳香族：	フェニルアラニン	
	トリプトファン	
	チロシン	
小さな：	グリシン	
	アラニン	
	セリン	20
	トレオニン	
	メチオニン	

【0108】

構造統合性の維持に対して決定的である領域又はドメインを含んで成るアミノ酸残基の決定が行われ得る。それらの領域内で、多かれ少なかれ、変化に耐性であり、そして分子の全体的な三次構造を維持するであろう特定の残基を決定することができる。配列構造を分析するための方法は、高いアミノ酸又はヌクレオチド同一性を有する複数配列の一系列整列、二次構造成質、二元パターン、相補的パッケージング及び埋もれた極性相互作用を包含するが、但しそれらだけには限定されない (Barton, Current Opin. Struct. Biol. 5: 372-376, 1995及びCordesなど., Current Opin. Struct. Biol. 6: 3-10, 1996)。一般的に、分子への修飾を企画するか又は特定のフラグメントを同定する場合、構造の決定は、修飾された分子の活性を評価することによって付随されるであろう。

【0109】

アミノ酸配列の変更が、生物学的活性に対して必須である高次構造体の破壊を最少にするためにzcytor17ligポリペプチドにおいて行われる。例えば、zcytor17ligポリペプチドが1又は複数のヘリックスを含む場合、アミノ酸残基の変更が、分子のヘリックス幾何学的及び他の成分を破壊しないよう行われ、ここでコンホメーションの変化が、いくつかの決定的な機能、例えば分子の、その結合パートナー、例えばA及びDヘリックス、すなわち配列番号2の残基43 (Glu) , 44 (Glu) 及び136 (Phe) への結合を妨害する。

【0110】

アミノ酸配列の変更の効果は、例えば上記に開示されるようなコンピューターモデルにより予測され得、又は結晶構造の分析により決定され得る (例えば、Lapthornなど., Nat. Struct. Biol. 2: 266-268, 1995)。当業界において良く知られている他の技法は、標準の分子 (例えば、生来のタンパク質) と変異体タンパク質の折りたたみを比較する。例えば、変異体及び標準の分子におけるシステインパターンの比較が行われ得る。質量分光及び還元及びアルキル化を用いての化学的修飾は、ジスルフィド結合に関連するか又はそのような関連を有さないシステイン残基を決定するための方法を提供する (Beanなど., Anal. Biochem. 201: 216-226, 1992; Gray, Protein Sci. 2: 1732-1748, 1993; 及びPat

tersonなど., Anal. Chem. 66: 3727-3732, 1994)。

【0111】

一般的に、修飾された分子が標準の分子と同じジスルフィド結合パターンを有さない場合、折りたたみが影響を及ぼされると思われる。折りたたみを測定するためのもう1つの良く知られており、且つ許容できる方法は、円二色性 (CD) である。修飾された分子及び標準の分子により生成されるCDスペクトルの測定及び比較は、通常のことである (Johnson, Protein 7:205-214, 1990)。結晶学は、折りたたみ及び構造を分析するためのもう1つの良く知られた方法である。核磁気共鳴 (NMR)、消化ペプチドマッピング及びエピートマッピングはまた、タンパク質とポリペプチドとの間の折りたたみ及び構造的類似性を分析するための既知方法でもある (Schaananなど., Science 257: 961-964, 1992)。

10

【0112】

配列番号2に示されるようなzcytor17ligタンパク質配列のHopp/Woods親水性プロフィールが生成され得る (Hoppなど., Proc Natl. Acad. Sci. 78: 3828, 1981; Hopp, J. Immun. Meth. 88: 1-18, 1986及びTriquierなど., Protein Engineering 11: 153-169, 1998)。前記プロフィールは、スライドする6-残基窓 (sliding six-residue window) に基づかれている。埋もれたG, S及びT残基及び暴露されたH, Y及びW残基は無視された。例えば、ヒトzcytor17ligポリペプチドにおいては、親水性領域は、配列番号2のアミノ酸残基54~59; 配列番号2のアミノ酸残基129~134; 配列番号2のアミノ酸残基53~58; 配列番号2のアミノ酸残基35~40; 及び配列番号2のアミノ酸残基33~38を包含する。例えば、マウスzcytor17ligポリペプチドにおいては、親水性領域は、配列番号11のアミノ酸残基34~39; 配列番号11のアミノ酸残基46~51; 配列番号11のアミノ酸残基131~136; 配列番号11のアミノ酸残基158~163; 及び配列番号11のアミノ酸残基157~162を包含する。

20

【0113】

当業者は、親水性又は疎水性が、全体的な構造及び生物学的プロフィールを破壊しないよう、zcytor17ligポリペプチドのアミノ酸配列における修飾を企画する場合、考慮されるであろうことを認識するであろう。Val, Leu及びIleから成る群、又はMet, Gly, Ser, Ala, Tyr及びTrpから成る群から選択された疎水性残基の置換が特に興味の対象である。例えば、置換に耐性の残基は、Val, Leu及びIle、又は配列番号2に示されるようなMet, Gly, Ser, Ala, Tyr及びTrp残基から成る群を包含する。配列番号2及び11内の位置での保存されたシステイン残基は、置換に対して比較的耐性であろう。

30

【0114】

必須アミノ酸の正体はまた、zcytor17ligとの、IL-3、Lif、IL-12、IL-15、IL-2、IL-4及びGM-CSF間の配列類似性の分析から推定され得る。前に記載された“FASTA”分析のような方法を用いて、高い類似性の領域が、タンパク質ファミリー内に同定され、そして保存された領域のためのアミノ酸配列を分析するために使用される。構造に基づいて変異体zcytor17ligポリヌクレオチドを同定するためのもう1つのアプローチは、可能性ある変異体zcytor17lig遺伝子をコードする核酸分子が、上記で論じられたように、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どうかを決定することである。

【0115】

40

本発明のポリペプチドにおける必須アミノ酸を同定する他の方法は、当業界において知られている方法、例えば特定部位の突然変異誘発又はアラニン走査突然変異誘発である (Cunningham and Wells. Science 244: 1081 (1989); Bass など., Pro. Nat. Acad. Sci. USA 88: 4498 (1991); Coombs and Gorey, “Site-Directed Mutagenesis and Protein Engineering”, in Proteins. Analysis and Design, Angeletti (ed.), P. 259-311 (Academic Press, Inc. 1998))。後者の技法においては、単一のアラニン突然変異が分子におけるあらゆる残基で導入され、そして得られる変異体分子が、分子の活性に対して決定的であるアミノ酸残基を同定するために、下記に開示されるように、生物学的又は生化学的活性について試験される。また、Hiltonなど., J. Biol. Chem. 271: 4699 (1996) を

参照のこと。

50

【0116】

本発明はまた、zcytor17ligポリペプチドの機能的フラグメント、及びそのような機能的フラグメントをコードする核酸分子を包含する。本明細書において定義されるような、“機能的” zcytor17lig又はそのフラグメントは、その増殖又は分化活性により、特殊化された細胞機能を誘発し、又は阻害するその能力により、又は抗-zcytor17lig抗体、又はzcytor17lig受容体抗体、又はそれらの受容体（可溶性又は固定された）のzcytor17、WSX-1又はOSMR β 受容体又はヘテロダイマー（例えば、zcytor17/WSX-1又はzcytor17/OSMR β ）又はマルチマー（例えば、zcytor17/WSX-1/OSMR β ）に特異的に結合するその能力により特徴づけられる。

【0117】

前に本明細書において記載されたように、zcytor17ligは、配列番号2に示されるように、ヘリックスA（アミノ酸残基38～52）、ヘリックスB（アミノ酸残基83～98）、ヘリックスC（アミノ酸残基104～117）、及びヘリックスD（アミノ酸残基137～152）を含んで成る4ヘリックス束構造により特徴づけられる。従って、本発明はさらに、（a）上記に記載される1又は複数のヘリックスを含んで成るポリペプチド分子；及び（b）1又は複数のこれらのヘリックスを含んで成る機能的フラグメントを包含する融合タンパク質を提供する。融合タンパク質の他のポリペプチド部分は、もう1つの4ヘリックス束サイトカイン、例えばIL-15、IL-2、IL-4及びGM-CSFにより、又は融合タンパク質の分泌を促進する非生来の及び/又は関連のない分泌シグナルペプチドにより寄与され得る。

【0118】

従って、本発明は、少なくとも4種のポリペプチドを含んで成る融合タンパク質を提供し、ここでN末端からC末端の方へのポリペプチドの順序が、（a）配列番号162のIL-2ヘリックスA残基27～48；（b）配列番号164のIL-4ヘリックスA残基30～42；（c）配列番号102のIL-3ヘリックスA残基35～45；（d）配列番号166のGM-CSFヘリックスA残基30～441；及び（e）配列番号2のアミノ酸残基38～52の群からのアミノ酸残基の配列を含んで成る第1ポリペプチド；6～27個のアミノ酸残基の第1スペーサー；（a）配列番号168のIL-2ヘリックスB残基；（b）配列番号164のIL-4ヘリックスB残基65～83；（c）配列番号102のIL-3ヘリックスB残基73～86；（d）配列番号166のGM-CSFヘリックスB残基72～81；及び（e）配列番号2のアミノ酸残基83～98の群からのアミノ酸残基の配列を含んで成る第2ポリペプチド；5～11個のアミノ酸残基の第2スペーサー；（a）配列番号162のIL-2ヘリックスC残基102～116；（b）配列番号164のIL-4ヘリックスC残基94～118；（c）配列番号102のIL-3ヘリックスC残基91～103；（d）配列番号166のGM-CSFヘリックスC残基85～103；及び（e）配列番号2のアミノ酸残基104～117の群からのアミノ酸残基の配列を含んで成る第3ポリペプチド；3～29個のアミノ酸残基の第3スペーサー；及び（a）配列番号162のIL-2ヘリックスD残基134～149；（b）配列番号102のIL-3ヘリックスD残基123～141；（c）配列番号164のIL-4ヘリックスD残基133～151；（d）配列番号166のGM-CSFヘリックスD残基120～131；及び（e）配列番号2のアミノ酸残基137～152の群からのアミノ酸残基の配列を含んで成る第4ポリペプチドであることを特徴とし、ここで前記4種のポリペプチドの少なくとも1つがzcytor17ligからである。他の態様においては、スペーサーペプチドは、表1に示されるように、zcytor17ligのA/B、B/C及びC/Dループ、及びIL-3から選択される。

【0119】

核酸分子の通常の欠失分析は、zcytor17ligポリペプチドをコードする核酸分子の機能的フラグメントを得るために行われ得る。例示されるように、配列番号1のヌクレオチド配列又はそのフラグメントを有するDNA分子は、一連の欠失を得るためにBal31ヌクレアーゼにより消化され得る。次に、それらのDNAフラグメントが正しい読み取り枠を整合して発現ベクター中に挿入され、そして発現されたポリペプチドが単離され、そしてzcytor17lig活性について、又は抗-zcytor17lig抗体又はzcytor17受容体を結合する能力について試験される。エキソヌクレアーゼ消化のための1つの方法は、欠失を導入するためにオリゴヌクレオチド指図された突然変異誘発を使用し、又は所望するzcytor17ligフラグメ

10

20

30

40

50

ントの生成を特定するために停止コドンを使用することである。他方では、zcytor17lig 遺伝子の特定のフラグメントは、ポリメラーゼ鎖反応を用いて合成され得る。

【0120】

機能的ドメインを同定するための標準の方法は、当業者に良く知られている。例えば、インターフェロンのいずれかの又は両末端での切断に対する研究が、Horisberger and Di Marco, *pharmac. Ther.* 66: 507 (1995) により要約されている。さらに、タンパク質の機能的分析のための標準技法は、例えばTreulterなど., *Molec. Gen. Genet.* 240: 113 (1993), Content など., “Expression and preliminary deletion analysis of the 42 kDa 2-5A synthetase induced by human interferon”, in *Biological Interferon Systems, Proceedings of ISIR-TNO Meeting on Interferon Systems*, Cantell (ed.), Pages 65-72 (Nijhoff 1987), Herschman, “The EGF Enzyme”, in *Control of Animal Cell Proliferation*, Vol. 1, Boynton など., (eds.) pages 169-199 (Academic Press 1985), Counaillieu など., *J. Biol. Chem.* 270: 29270 (1995); Fukunaga など., *J. Biol. Chem.* 270: 25291 (1995); Yamaguchi など., *Biochem. Pharmacol.* 50: 1295 (1995); 及びMeiselなど., *Plant Molec. Biol.* 30: 1 (1996)により記載される。

10

【0121】

複数アミノ酸置換は、突然変異誘発及びスクリーニングの既知方法、例えばReidhaar-Olson and Sauer (*science* 241: 53-57, 1988) 又はBowie and Sauer (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2152-2156, 1989) により開示される方法を用いて行われ、そして試験される。手短に言及すれば、それらの著者は、ポリペプチドにおける複数の位置を同時ランダム化し、機能的ポリペプチドをスクリーンし、そして次に個々の位置での可能な置換の範囲を決定するために、突然変異誘発されたポリペプチドを配列決定するための方法を開示する。使用され得る他の方法は、ファージ表示 (例えば、Lowman など., *Biochem.* 30: 10832-10837, 1991; Ladner など., アメリカ特許第5,223,409号; Huse, WIPO公開WO 92/06204号)、及び領域一指図された突然変異誘発 (Derbyshire など., *Gene* 46: 145, 1986; Ner など., *DNA* 7: 127, 1988) を包含する。

20

【0122】

開示されるzcytor17ligヌクレオチド及びポリペプチド配列の変異体は、Stemmer, *Nature* 370: 389-91, 1994, Stemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10747-51, 1994 及びWIPO公開WI97/20078により開示されるように、DNA シャフリングを通して生成され得る。手短に言及すれば、変異体DNA分子が、ランダムに導入された点突然変異をもたらす、親DNAのランダム断片化、続く、PCRを用いてのアセンブリーによるインビトロ相同組換えにより生成される。この技法は、前記工程中に追加の変動性を導入するために、親DNAのファミリー、例えば異なった種からの対立遺伝子変異体又はDNAを用いて改良され得る。所望する活性の選択又はスクリーニング、突然変異誘発及びアッセイの続くさらなる相互作用が、有害な変化に対して同時に選択しながら、所望する突然変異について選択することによって、配列の急速な“進化”を提供する。

30

【0123】

本明細書に開示されるような突然変異誘発方法は、宿主細胞におけるクローン化された突然変異誘発されたポリペプチドの活性を検出するために高処理量の自動化されたスクリーニング方法と組み合わせられ得る。生物学的活性ポリペプチド、又は抗-zcytor17lig抗体又は可溶性zcytor17受容体、または可溶性WSX-1又は可溶性OSMR、又は本明細書に記載されるようなそれらの可溶性受容体のヘテロマー又はマルチマーと結合するポリペプチドをコードする突然変異誘発されたDNA分子が、宿主細胞から回収され、そしてすぐに、近代的装置を用いて配列され得る。それらの方法は、興味あるポリペプチドにおける個々のアミノ酸残基の重要性の急速な決定を可能にし、そして未知の構造のポリペプチドに適用され得る。

40

【0124】

さらに、本発明のタンパク質 (又はそのポリペプチドフラグメント) は、多機能分子を供給するために、他の生物活性分子、特に他のサイトカインに連結され得る。例えば、zc

50

zcytor17ligからの1又は複数のヘリックスが、それらの生物学的性質又は生成の効率を高めるために、他のサイトカインに連結され得る。

【0125】

従って、本発明は、zcytor17ligの1又は複数のヘリックスを含んで成るセグメントが他のポリペプチドに融合されている一連の新規ハイブリッド分子を提供する。融合は好ましくは、組換え生成システムにおけるキメラ分子の発現を可能にするためにDNAレベルをスプライシングすることにより行われる。次に、その得られる分子は、改良された溶解性、改良された安定性、延長されたクリアランス半減期、改良された発現及び分泌レベル、及び薬物力学についてアッセイされる。そのようなハイブリッド分子はさらに、成分タンパク質又はポリペプチド間に追加のアミノ酸残基（例えば、ポリペプチドリンカー）を含んで成る。

10

【0126】

天然に存在しないアミノ酸は、トランス-3-メチルプロリン、2,4-メタプロリン、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、アロートレオニン、メチルトレオニン、ヒドロキシアセチルシステイン、ヒドロキシアセ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、tert-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を包含する。天然に存在しないアミノ酸残基をタンパク質中に導入するためのいくつかの方法が当業界において知られている。例えばナンセンス突然変異が化学的にアミノアシル化されたサプレッサーtRNAを用いて抑制されるインビトロシステムが使用され得る。

20

【0127】

アミノ酸を合成し、そしてtRNAをアミノアシル化するための方法は、当業者において知られている。ナンセンス突然変異を含むプラスミドの転写及び翻訳は、E.コリS30抽出物及び市販の酵素及び他の試薬の含んで成る細胞フリーシステムにおいて実施される。タンパク質は、クロマトグラフィーにより精製される。例えば、Rovertsonなど., J. Am. Chem. Soc. 113:2722, 1991; Ellman など., Meth. Enzymol. 202: 301,1991; Chung など., Science 259: 806-09, 1993; 及びChungなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10145-49, 1993を参照のこと。

30

【0128】

第2の方法においては、翻訳は、突然変異誘発されたmRNA及び化学的にアミノアシル化されたサプレッサーtRNAのマイクロインジェクションによりアフリカツメガエル卵母細胞において行われる(Turcatti など., J. Biol. Chem. 271: 1991-98, 1996)。第3の方法においては、E.コリ細胞が、置換される予定である天然のアミノ酸（例えば、フェニルアラニン）の不在下で及び所望する天然に存在しないアミノ酸（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）の存在下で培養される。天然に存在しないアミノ酸は、その天然の相対物の代わりにタンパク質中に導入される。Koide など., Biochem. 33: 7470-46, 1994を参照のこと。

40

【0129】

天然に存在するアミノ酸残基は、インビトロ化学的に修飾により天然に存在しない種に転換され得る。化学的修飾は、置換の範囲をさらに拡張するために特定部位の突然変異誘発と組み合わされ得る(Wynn and Richards, Protein Sci. 2: 395-403, 1993)。分子の半減期を延長するために、特に、活性状態で代謝持続性を延長するために、zcytor17ligを安定化することは好都合である。延長された半減期を達成するためには、zcytor17lig分子は、本明細書に記載される方法を用いて、化学的に修飾され得る。PEG化は、血漿半減期、高められた安定性、及び低められた抗原性及び免疫原性を高めるために示されて来た、通常使用される1つの方法である(Nucciなど., Advantage Drug Delivery Reviews 6: 133-155, 1991及びLuなど., Int. J. Peptide Protein Res. 43: 127-138, 1994)。

50

【0130】

限定された数の非保存性アミノ酸、遺伝子コードによりコードされないアミノ酸、天然に存在しないアミノ酸、及び不自然なアミノ酸が、zcytor17ligアミノ酸により置換され得る。

【0131】

本発明はまた、本明細書に記載されるzcytor17ligポリペプチドのエピトープ担持の部分を含んで成るポリペプチドフラグメント又はペプチドも提供する。そのようなフラグメント又はペプチドは、完全なタンパク質が免疫原として使用される場合、抗体応答を誘発するタンパク質の一部である“免疫原性エピトープを含んで成る。免疫原性エピトープ担持のペプチドは、標準方法を用いて同定され得る。（例えば、Geysenなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA81: 3988, 1983を参照のこと）。

10

【0132】

対照的に、ポリペプチドフラグメント又はペプチドは、抗体が特異的に結合することができるタンパク質分子の領域である“抗原性エピトープ”を含んで成る。一定のエピトープは、線状又は連続した範囲のアミノ酸から成り、そしてそのようなエピトープの抗原性は、変性剤により破壊されない。タンパク質のエピトープを模倣する比較的短い合成ペプチドがタンパク質に対する抗体の生成を刺激するために使用され得ることは、当業界において知られている（例えば、Sutcliffeなど., Science 219: 660, 1983を参照のこと）。従って、本発明の抗原性エピトープ担持のペプチド及びポリペプチドは、本明細書に記載されるポリペプチドと結合する抗体（例えば、中和抗体）を生ぜしめるために有用である。

20

【0133】

Hopp/Woods親水性プロフィールは、最も抗原性の可能性を有する領域を決定するために使用され得る（Hoppなど., 1981, 前記；及びHopp, 1986, 前記）。例えば、ヒトzcytor17ligにおいては、親水性領域は、配列番号2のアミノ酸残基54～59；配列番号2のアミノ酸残基129～134；配列番号2のアミノ酸残基53～58；配列番号2のアミノ酸残基35～40；及び配列番号2のアミノ酸残基33～38を包含する。例えば、マウスzcytor17ligにおいては、親水性領域は、配列番号11のアミノ酸残基34～39；配列番号11のアミノ酸残基46～51；配列番号11のアミノ酸残基131～136；配列番号11のアミノ酸残基158～163；及び配列番号11のアミノ酸残基157～162を包含する。

30

【0134】

抗原性エピトープ担持のペプチド及びポリペプチドは好ましくは、配列番号2又は11の少なくとも4～10個のアミノ酸、少なくとも10～14個のアミノ酸、又は約14～約30個のアミノ酸を含む。そのようなエピトープ担持のペプチド及びポリペプチドは、本明細書に記載されるように、zcytor17ligポリペプチドのフラグメント化又は化学的ペプチド合成により生成され得る。さらに、エピトープは、ランダムペプチドライブラリーのファージ表示により選択され得る（例えば、Lane and Stephen, Curr. Opin. Immunol. 5: 268, 1993, 及びCortese など., Curr. Opin. Biotechnol. 7: 616, 1996を参照のこと）。

【0135】

エピトープを含んで成る小さなペプチドからエピトープを同定し、そして抗体を生成するための標準の方法は、例えばMole, “Epitope Mapping,” in Methods in Molecular Biology, Vol. 10, Manson (ed.), Pages 105-16 (The Humana Press, Inc., 1992), Price, “Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies,” in Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application, Ritter and Ladyman (eds.), page 60-84 (Cambridge University Press 1995), 及びColigan など. (eds.), Current Protocols in Immunology, pages 9.3.1-9.3.5 and pages 9.4.1-9.4.11 (John Wiley & Sons, 1997)により記載される。

40

【0136】

変異体zcytor17ligポリヌクレオチドの特定のヌクレオチド配列にもかかわらず、そのポリヌクレオチドは、その増殖又は分化活性、特殊化された細胞機能を誘発するか又は阻

50

害する能力、又は抗-zcytor17lig抗体又はzcytor17受容体に対して特異的に結合する能力に特徴づけられるポリペプチドをコードする。より特定には、変異体zcytor17ligポリヌクレオチドは、配列番号2に示されるようなポリペプチドの活性の少なくとも50%及び好ましくは、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は少なくとも99%以上の活性を示すポリヌクレオチドをコードするであろう。

【0137】

変異体及び融合タンパク質を包含するいずれかのzcytor17ligポリペプチドに関しては、当業者は、上記表1及び2に示される情報を用いて、その変異体をコードする、十分な縮重ポリヌクレオチド配列を容易に生成することができる。

10

【0138】

本発明はさらに、種々の他のポリペプチド融合体（及びい又は複数のポリペプチド融合体を含んで成る関連するマルチマータンパク質）を提供する。例えば、zcytor17ligポリペプチドは、アメリカ特許第5,155,027号及び第5,567,584号に開示されるようなダイマータンパク質への融合として調製され得る。それに関しての好ましいダイマータンパク質は、免疫グロブリン不変領域ドメインを包含する。免疫グロブリン-zcytor17ligポリペプチド融合体は、（種々のマルチマーzcytor17lig類似体を生成するために）、遺伝子的に構築された細胞において発現され得る。補助ドメインは、特定の細胞、組織又は高分子に対してそれらを標的化するためにzcytor17ligポリペプチドに融合され得る。

【0139】

20

例えば、zcytor17ligポリペプチド又はタンパク質が、標的細胞の表面上の受容体又は受容体に対して特異的に結合するリガンドにzcytor17ligポリペプチドを融合せしめることによって、予定された細胞型に標的化され得る。この場合、ポリペプチド及びタンパク質は、治療又は診断目的のために標的化され得る。zcytor17ligポリペプチドは、複数の成分、例えば精製のための親和性標識及び標的化ドメインに融合され得る。ポリペプチド融合はまた、特にドメイン間に、1又は複数の切断部位を含むことができる。Tuanなど., *Connective Tissue Research* 34: 1-9, 1996を参照のこと。

【0140】

本明細書において論じられた方法を用いて、当業者は、配列番号2の残基1-164又は24-164に対して実質的に類似する配列同一性を有する種々のポリペプチド、又はその機能的フラグメント及び融合体、例えばヘリックスA-D(配列番号2の残基38~152)を同定し、そして/又は調製することができ、ここでそのようなポリペプチド、又はフラグメント又は融合体は野生型タンパク質の性質、例えば増殖、分化を刺激し、特殊化された細胞機能を誘発し、又はzcytor17受容体又はzcytor17lig抗体を結合する能力を保持する。

30

【0141】

本発明のzcytor17ligポリペプチド、例えば十分な長さのポリペプチド、機能的フラグメント及び融合ポリペプチドは、従来の技法に従って、遺伝的に構築された宿主細胞において生成され得る。適切な宿主細胞は、外因性DNAにより形質転換又はトランスフェクトされ得、そして培養において増殖され得るそれらの細胞型であり、そして細菌、菌類細胞、及び培養された高等真核細胞を包含する。真核細胞、特に多細胞生物の培養された細胞が好ましい。クローン化されたDNA分子を操作し、そして種々の宿主細胞中に外因性DNAを導入するための技法は次の文献に開示される：Sambrook など., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, 及びAusubel など., eds., *Current Protocol in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Ins., NY, 1987。

40

【0142】

一般的に、本発明のzcytor17ligポリペプチドをコードするDNA配列は、その発現のために必要とされる他の遺伝子的要素、例えば一般的に、発現ベクター内の転写プロモーター及びターミネーターに操作可能的に連結される。ベクターはまた、通常、1又は複数の選択マーカー及び1又は複数の複製の起点を含むであろうが、しかし当業者は、一定のシス

50

テム内で、選択マーカーが別のベクター上に供給され得、そして外因性DNAの複製が宿主細胞ゲノム中への組み込みにより供給され得ることを認識するであろう。プロモーター、ターミネーター、選択マーカー、ベクター及び要素の選択は、当業者のレベルの範囲内の通常のことである。多くのそのような要素は文献に記載されており、そして商業的供給者を通して入手できる。

【0143】

zcytor17ligポリペプチドを、宿主細胞の分泌路中に方向づけるためには、分泌シグナル配列（又は、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ている）が、発現ベクターに供給される。分泌シグナル配列は、zcytor17ligの配列であり得、又はもう1つの分泌されたタンパク質（例えばt-PA）に由来し、又は新たに合成され得る。分泌シグナル配列は、zcytor17lig DNA配列に操作可能的に連結され、すなわち2つの配列は正しく読み取り枠を整合して連結され、そして宿主細胞の分泌経路中に新しく合成されたポリヌクレオチドを方向づけるように配置される。分泌シグナル配列は通常、興味あ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、但し一定の分泌シグナル配列は、興味あるDNA配列の他の場所に位置することもできる（例えば、Welchなど., アメリカ特許第5,037,743号; Hollandなど., アメリカ特許第5,143,830号を参照のこと）。

【0144】

他方では、本発明のポリペプチドに含まれる分泌シグナル配列は、分泌路中に他のポリペプチドを方向づけるために使用される。本発明はそのよう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が製造され得、ここで配列番号2のアミノ酸残基1~23又は配列番号11のアミノ酸残基1~23に由来する分泌シグナル配列が当業界において知られている方法及び本明細書に開示される方法を用いて、もう1つのポリペプチドに操作可能的に連結されている。本発明の融合ポリペプチドに含まれる分泌シグナル配列は好ましくは、分泌路中い追加のペプチドを方向づけるためにその追加のペプチドにアミノ末端的に融合される。そのような構造体は、当業界において知られている多くの用途を有する。例えば、それらの新規の分泌シグナル配列融合構造体は通常分泌されないタンパク質の活性成分の分泌を方向づけることができる。そのような融合は、分泌路を通してペプチドを方向づけるためにインビボ又はインビトロで使用され得る。

【0145】

培養された哺乳類細胞または、本発明内の適切な宿主である。外因性DNAを、哺乳類宿主細胞中に導入するための方法は、リン酸カルシウム-伸介トランスフェクション (Wiglerなど., Cell 14: 725, 1978; Corsaro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7: 603, 1981; Graham など., Virology 52: 456, 1973), エレクトロポレーション (Neumann など., EMBO J. 1: 841-845, 1982); DEAE-デキストラン伸介トランスフェクション (Ausubel など., 前記)、及びリポソーム-伸介トランスフェクション (Hawley -Nelson など., Focus 15: 73, 1993; Ciccarone など., Focus 15: 80, 1993) を包含する。

【0146】

培養された哺乳類細胞における組換えポリペプチドの生成は、例えばlevinson など., アメリカ特許第4,713,339号; Hagen など., アメリカ特許第4,784,950号; Palmiter など., アメリカ特許第4,579,821号; 及びRingold, アメリカ特許第4,656,134号により開示される。培養された適切な哺乳類細胞は、COS-1 (ATCC No. CRL 165)、COS-7 (ATCC No. CRL 1651)、BHK (ATCC No. CRL 1632)、BHK 570 (ATCC No. CRL 10314)、293 (ATCC No. CRL 1573; Graham など., J. Gen. Viro. 36: 59-72, 1977)、及びチャイニーズ ハムスター卵巣(例えば CHO-K1; ATCC No. CCL61)細胞系を包含する。

【0147】

追加の適切な細胞系は当業界において知られており、そして公的な寄託所、例えば American Type Culture Collection, Manassas, VAから入手できる。一般的に、強い転写プロモーター、例えばSV-40又はサイトメガロウィルスからのプロモーターが好ましい。例えば、アメリカ特許第4,956,288号を参照のこと。他の適切なプロモーターは、メタロチ

オネイン遺伝子からのプロモーター（アメリカ特許 4,579,821 号及び第 4,601,978 号）、アデノウィルス主要後期プロモーターを包含する。

【0148】

薬物選択は一般的に、外来性DNAが挿入されている、培養された哺乳類細胞を選択するために使用される。そのような細胞は通常、“トランスフェクタント”として言及される。選択剤の存在下で培養され、そしてそれらの子孫に興味ある遺伝子を伝達することができる細胞は、“適切なトランスフェクタント”として言及される。好ましい選択マーカーは、抗生物質ネオマイシンに対する耐性をコードする遺伝子である。選択は、ネオマイシン型薬物、例えばG-418又は同様のもの存在下で実施される。“増幅”として言及される方法である選択システムは、興味ある遺伝子の発現レベルを高めるためにも使用される。

10

【0149】

増幅は、低レベルの選択剤の存在下でトランスフェクタントを培養し、そして次に、導入された遺伝子の生成物を高レベルで生成する細胞を選択するために選択剤の量を高めることによって実施される。好ましい増幅可能選択マーカーは、メトトレキセートに対する耐性を付与するジヒドロ葉酸レダクターゼである。他の耐薬物性遺伝子(例えば、ヒグロマイシン耐性、複数薬物耐性、ピューロマイシン アセチルトランスフェラーゼ)もまた、使用され得る。変更された表現型を導入する他のマーカー、例えば緑色蛍光タンパク質、又は細胞表面タンパク質、例えばCD4、CD8、クラスI MHC、胎盤アルカリホスファターゼが、FACS分類又は磁気ビース分離技法のような手段により、トランスフェクトされていない細胞とトランスフェクトされた細胞とを分類するために使用され得る。

20

【0150】

他の高等真核細胞、例えば植物細胞、昆虫細胞、及び鳥類細胞もまた、宿主として使用され得る。植物細胞において遺伝子を発現するためのベクターとしてのアグロバクテリウム・リゾゲネス (*Agrobacterium rhizogenes*) の使用は、Sinkarなど、J. Biosci. (Bangalore) 11: 47-58, 1987 により総説されている。昆虫細胞の形質転換、及びそこにおける外来性ポリペプチドの生成は、Guarino など、アメリカ特許第5,162,222号；及びWIPO公開W094/06463号により公開される。

【0151】

昆虫細胞は、オートグラフ・カリホルニカ (*Autographa californica*) 核多角体病ウィルス (AcNPV) に通常由来する組換えバキュロウィルスにより感染され得る。King, L. A. and Possee, R.D., *The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide*, London, Chapman & Hall; O'Reilly, D. R., *Baculovirus Expression Vector: A Laboratory Manual*, New York, Oxford University Press., 1994; 及びRichardson, C. D., Ed., *Baculovirus Expression Protocols. Methods in Molecular Biology*, Totowa, NJ, Humana Press, 1995を参照のこと。組換えバキュロウィルスを製造するための第2の方法は、Luckow (Luckow, VA, など、J. Virol 67: 4566-79, 1993) により記載されるトランスポゾンに基づくシステムを利用する。

30

【0152】

このシステムは、Bac-to-BacTMキット (Life Technologies, Rockville, MD) として市販されている。このシステムは、“bacmid”と呼ばれる大きなプラスミドとして、E. コリに維持されるバキュロウィルスゲノム中に、zcyltor17ligポリペプチドをコードするDNAを移動せしめるために、Tn7トランスポゾンを含むトランスファーベクター、pFastBacITM (Life Technologies) を利用する。pFastBacITM トランスファーベクターは、興味ある遺伝子、この場合、ZCYT018の発現を誘導するためにAcNPVポリヒドロリンプロモーターを使用する。

40

【0153】

しかしながら、pFastBacITMは相当の程度まで修飾され得る。前記ポリヒドロリンプロモーターは、除去され、そしてバキュロウィルス感染において早めに発現され、そして分泌されたタンパク質を発現するために好都合であることが知られているバキュロウィルス塩基性タンパク質プロモーター（また、Pcor, p6.9又はMPプロモーターとしても知られてい

50

る)により置換され得る。Hill-Perkins, M.S. and Possee, R.D., J. Gen. Virol. 71: 971-6, 1990; Bonning, B.C. など., J. Gen. Virol. 75: 1551-6, 1994; 及び Chazebalk, G. D., and Rapoport, B., J. Biol Chem. 270: 1543-9, 1995 を参照のこと。

【0154】

そのようなトランスファーベクター構造体においては、塩基性タンパク質プロモーターの短い又は長いバージョンが使用され得る。さらに、昆虫タンパク質に由来する分泌シグナル配列により天然の zcytor17lig 分泌シグナル配列を置換しているトランスファーベクターが構成され得る。例えば、エクジステロイド・グルコシルトランスフェラーゼ (EGT)、ミツバチ Melittin (Invitrogen, Carlsbad, CA) 又はバキュロウィルス gp67 (PharMingem, San Diego, CA) は、生来の分泌シグナル配列を置換するために、構造体で使用され得る。さらに、トランスファーベクターは発現された zcytor17lig ポリペプチドの C-又は N-末端でエピトープ標識、例えば Glu-Glu エピトープ標識をコードする DNA とのインフレーム融合体を含むことができる (Grussenmeyer, T. など., Peoc. Natl. Acad. Sci. 82: 7952-6, 1985)。

【0155】

当業界において知られている技法を用いて、zcytor17lig を含むトランスファーベクターにより、E. コリが形質転換され、そして組換えバキュロウィルスの表示である断続的 lacZ 遺伝子を含む bacmida についてスクリーンされる。組換えバキュロウィルスゲノムを含む bacmid DNA が、通常の技法を用いて単離され、そしてスポドプテラ・フルギペルダ (Spodoptera frugiperda) 細胞、例えば Sf9 細胞をトランスフェクトするために使用される。zcytor17lig を発現する組換えウィルスが結果的に生成される。組換えウィルス ストックは、当業者において通常使用される方法により製造される。

【0156】

組換えウィルスは、宿主細胞、典型的には、アワヨトウの幼虫、スポドプテラ・フルギペルダに由来する細胞系を感染せしめるために使用される。一般的には、Glick and Pasternak, Molecular Biotechnology: Principles and Application of Recombinant DNA, ASM Prss, Washington, D.C., 1994 を参照のこと。もう 1 つの適切な細胞系は、トリコプルシア・ニ (Trichoplusia ni) に由来する High FiveTM 細胞系 (Invitrogen) である (アメリカ特許第 5,300,435 号)。

【0157】

菌類細胞、例えば酵母細胞はまた、本発明内で使用され得る。これに関して、特に興味ある酵母種は、サッカロミセス・セレビスシアエ (Saccharomyces cerevisiae), ピチア・パストリス (Pichia pastoris) 及びピチア・メタノリカ (pichia methanolica) を包含する。外因性 DNA により S. セレビスシアエ細胞を形質転換し、そしてそれから組換えポリペプチドを生成するための方法は、例えば Kawasaki, アメリカ特許第 4,599,311 号; Kawasaki など., アメリカ特許第 4,931,373 号; Brake, アメリカ特許第 4,870,008 号; Welch など., アメリカ特許第 5,037,743 号; 及び Murray など., アメリカ特許第 4,845,075 号により開示される。形質転換された細胞は、選択マーカー、通常、耐薬物性、又は、特定の栄養物 (例えばロイシン) の不在下で増殖する能力により決定される表現型により選択される。

【0158】

サッカロミセス・セレビスシアエへの使用のための好ましいベクターシステムは、グルコース含有培地における増殖により形質転換された細胞の選択を可能にする、Kawasaki など. (アメリカ特許第 4,931,373 号) により開示される POT1 ベクターシステムである。酵母への使用のための適切なプロモーター及びターミネーターは、解糖酵素遺伝子 (例えば、Kawasaki, アメリカ特許第 4,599,311 号; Kingsman など., アメリカ特許第 4,615,974 号; 及び Bitter, アメリカ特許第 4,977,092 号を参照のこと) 及びアルコール デヒドロゲナーゼ遺伝子からのものを包含する。また、アメリカ特許第 4,990,446 号; 第 5,063,154 号; 第 5,139,936 号; 及び第 4,661,454 号を参照のこと。

【0159】

他の酵素、例えばハンセヌラ・ポリモルファ (Hansenula polymorpha)、シゾサッカロ

10

20

30

40

50

ミセス・ボンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、クルイベリミセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*)、クルイベリミセス・フラギリス (*Kluyveromyces fragilis*)、ウスチラゴ・マイジス (*Ustilago maydis*)、ピチア・パストリス (*Pichia pastoris*)、ピチア・メタノリカ (*Pichia methanolica*)、ピチア・グイレルモンジ (*Pichia guilliermondii*)、及びカンジタ・マルトサ (*Candida maltosa*) のための形質転換システムは、当業界において知られている。

【0160】

例えば、Gleeson など., *J. Gen. Microbiol.* 132: 3459–3465, 1986 及び Cregg, アメリカ特許第4,882,279号を参照のこと。アスペルギラス細胞は、Mcknight など., アメリカ特許第4,935,349号の方法に従って使用され得る。アクレモニウム・クリソゲナム (*Acremonium chrysogenum*) を形質転換するための方法は、Sumino ., アメリカ特許第5,162,228号により開示される。ニューロスポラ (*Neurospora*) を形質転換するための方法は、Lambowitz, アメリカ特許第4,486,533号により開示される。

10

【0161】

組換えタンパク質の生成のための宿主としてのピチア・メタノリカの使用は、WIPO公開W097/17450, W097/17451, W098/02536及びW098/02565に開示される。P.メタノリカの形質転換に使用するためのDNA分子は通常、形質転換の前、好ましくは線状化される、二本鎖の環状プラスミドとして調製されるであろう。P.メタノリカにおけるポリペプチド生成のためには、プラスミドにおけるプロモーター及びターミネーターは、P.メタノリカ遺伝子、例えばP.メタノリカ アルコール利用遺伝子 (AUG1 又は AUG2) のものであることが好ましい。他の有用なプロモーターは、ジヒドロキシアセトンシンターゼ (DHAS)、ギ酸デヒドロゲナーゼ (FMD)、及びカタラーゼ (CAT) 遺伝子のものを包含する。宿主染色体中へのDNAの組み込みを促進するためには、宿主DNA配列を両端に有するプラスミドの完全な発現セグメントを有することが好ましい。

20

【0162】

ピチア・メタノリカへの使用のための好ましい選択マーカーは、アデニンの不在下でade2宿主細胞の増殖を可能にする、ホスホリボシルー5-アミノイミダゾールカルボキシラーゼ (AIRC; EC. 4.1.1.21) をコードするP.メタノリカADE2遺伝子である。メタノールの使用を最少にすることが所望される大規模産業方法のためには、両メタノール利用遺伝子 (AUG1 及び AUG2) が欠失されている宿主細胞を使用することが好ましい。分泌されたタンパク質の生成のためには、液胞プロテアーゼ遺伝子 (PEP4 及び PRB1) を欠いている宿主細胞が好ましい。エレクトロポレーションが、P.メタノリカ細胞中への、興味あるポリペプチドをコードするDNAを含むプラスミドの導入を促進するために使用される。2.5~4.5kV/cm, 好ましくは約3.75kV/cmの電場の強さ、及び1~40m秒、最も好ましくは約20m秒の時定数 (t) を有する、指数的に減衰する、パルスされた電場を用いて、エレクトロポレーションによりP.メタノリカ細胞を形質転換することが好ましい。

30

【0163】

原核宿主細胞、例えば細菌E.コリ、バシラス及び他の属の菌株はまた、本発明において有用な宿主細胞である。それらの宿主を形質転換し、そしてそこにクローン化される外来性DNA配列を発現するための技法は、当業界において良く知られている (例えば、Sambrook など., 前記を参照のこと)。細菌、例えばE.コリにおいてzytor17ligポリペプチドを発現する場合、そのポリペプチドは、典型的には不溶性顆粒として細胞質に保持され得、又は細菌の分泌配列により細胞周辺腔に向けられ得る。前者の場合、細胞は溶解され、そして顆粒が回収され、そして例えばグアニジンイソチオシアネート又はウレアを用いて変性される。

40

【0164】

次に、変性されたポリペプチドが再生され、そして例えばウレア、及び還元された及び酸化されたグルタチオンの組み合わせの溶液に対する透析、続く緩衝溶液に対する透析により、前記変成体を希釈することによって二量体化され得る。後者の場合、ポリペプチドは、細胞周辺腔の内容物を開放するために細胞を破壊し (例えば、音波処理又は浸透ショ

50

ックにより)、そしてタンパク質を回収することによって、細胞周辺腔から可溶性及び機能性形で回収され、それにより、変性及び再生のための必要性を回避することができる。

【0165】

形質転換され又はトランスフェクトされた宿主細胞は、選択された宿主細胞の増殖のために必要とされる栄養物及び他の成分を含む培養培地において、従来の方

【0166】

法に従って培養される。種々の適切な培地、例えば定義された培地及び複合培地は、当業界において知られており、そして一般的には、炭素源、窒素源、必須アミノ酸、ビタミン及び鉱物を含む。培地はまた、必要とされる場合、成長因子又は血清のような成分も含むことができる。

【0167】

増殖培地は一般的に、外因的に付加されたDNAを含む細胞を、例えば発現ベクター上に担持される選択マーカーにより補足され、又は宿主細胞中に同時トランスフェクトされる必須栄養物における薬物選択又は栄養欠乏により選択するであろう。P.メタノリカ細胞は適切な炭素源、窒素源及び微量栄養物を含んでなる培地において、約25℃〜35℃の温度で培養される。液体培養物は、従来の手段、例えば小さなフラスコの振盪又は発酵器のスパージングにより十分なエアレーションを提供される。P.メタノリカのための好ましい培養培地は、YEPD(2%D-グルコース、2%のBactoTMペプトン(Difco Laboratories, Detroit, MI), 1%のBactoTM酵母抽出物(Difco Laboratories), 0.004%のアデニン及び0.006%のL-ロイシン)である。

【0168】

本発明のポリペプチドを80%以上の純度、より好ましくは90%以上の純度、さらに好ましくは95%以上の純度に精製することが好ましく、そして汚染性高分子、特に他のタンパク質及び核酸に対して、99.9%以上の純度であり、そして感染性及び発熱性剤を有さない医薬的に純粋な状態が特に好ましい。好ましくは、精製されたポリペプチドは、他のポリペプチド、特に動物起源の他のポリペプチドを実質的に有さない。

【0169】

発現された組換え体zcytor17ligポリペプチド(又はキメラzcytor17ligポリペプチド)は、分別及び/又は従来の精製方法及び媒体を用いて精製され得る。硫酸アンモニウム沈殿及び酸又はカオトロピック剤抽出は、サンプルの分別のために使用される。典型的な精製段階は、ヒドロキシアパタイト、サイズ排除、FPLC及び逆相高性能液体クロマトグラフィーを包含する。適切なクロマトグラフィー用媒体は、誘導体化されたデキストラン、アガロース、セルロース、ポリアクリルアミド、特別なシリカ及び同様のものを包含する。PEI、DEAE、QAE及びQ誘導体が好ましい。

【0169】

典型的なクロマトグラフィー用媒体は、フェニル、ブチル又はオクチル基により誘導体化されたもの、例えばフェニル-Sepharose FF(pharmacia), Toyopearl ブチル650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA)、オクチル-Sepharose (Pharmacia)及び同様のもの;又はポリアクリル樹脂、例えばAmberchrom CG71 (Toso Haas)及び同様のものを包含する。適切な固体支持体は、ガラスビーズ、シリカ基材の樹脂、セルロース樹脂、アガロースビーズ、架橋されたアガロースビーズ、ポリスチレンビーズ、架橋されたポリアクリルアミド樹脂及びそれらが使用される条件下で不溶性である同様のものを包含する。それらの支持体は、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るタンパク質の結合を可能にする反応性基より変性され得る。

【0170】

カップリング化学物質の例は、臭化シアン活性化、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カップリング化学物質のためのカルボキシル及びアミノ誘導体を包含する。それらの及び他の固体媒体は当業界において良く知られており、そして広く使用されており、そして商業的供給者から入手できる。支持媒体にリガンド又は受容体ポリペプチドを結合するための方法は当業界において良く知られている。特定方法の選択は、通常のことであり、そして選択された支持体の性質により一部決定される。例えば、Affinity Chromatography: Pr

inciples & Methods, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden, 1988を参照のこと。

【0171】

本発明のポリペプチドは、それらの物理的又は生化学的性質の使用により単離され得る。例えば、固定された金属イオン吸着 (IMAC) クロマトグラフィーが、ヒスチジンに富んでいるタンパク質、及びポリヒスチジン標識を含んでなるそれらのタンパク質を精製するために使用され得る。手短に言及すれば、ゲルがまず、二価金属イオンにより荷電され、キレートが形成される (Sulkowski, Trends in Biochem. 3: 1-7, 1985)。ヒスチジンに富んでいるタンパク質が、使用される金属イオンに依存して、異なった親和性を有するこのマトリックスに吸着され、そして競争溶出、pHの低下、又は強いキレート化剤の使用により溶出されるであろう。

10

【0172】

他の精製方法は、レク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ル化されたタンパク質の精製 (Methods in Enzymol., Vol. 182, "Guide to Protein Purification", M. Deutscher, (ed.), Acad. Press, San Diego, 1990, pp. 529-39)、及び可溶性zcytor17受容体の使用を包含する。本発明のさらなる態様においては、興味あるポリペプチド、及び親和性標識 (例えばマルトースー結合タンパク質、FLAG標識、Glu-Glu標識、免疫グロブリンドメイン) の融合体が、精製を促進するために構成され得る。

【0173】

さらに、当業界において記載される方法を用いて、ポリペプチド融合体又はハイブリッドzcytor17ligタンパク質が、他のヒトサイトカインファミリータンパク質 (例えば、インターロイキン又はGM-CSF)、又は異種タンパク質と組合して、本発明のzalpha11リガンドの領域又はドメインを用いて構成される (Sambrook など., 前記; Altschul など., 前記; Picard, Cur. Opin. Biology, 5: 511-5, 1994及びそれらにおける引例)。それらの方法は、興味あるポリペプチドにおける大きなドメイン又は領域の生物学的重要性の決定を可能にする。そのようなハイブリッドは、反応運動学、結合を変更し、基質特異性を抑制し、又は拡張し、又はポリペプチドの組織及び細胞局在性を変更し、そして未知の構造のポリペプチドに適用される。

20

【0174】

融合タンパク質は、その融合タンパク質の個々の成分を調製し、そしてそれらを化学的に接合することによって、当業者に知られている方法により調製され得る。他方では、正しく読み取り枠を整合して融合タンパク質の両成分をコードするポリヌクレオチドは、既知の技法を用いて生成され、そして本明細書に記載される方法により発現され得る。例えば、生物学的機能を付与するヘリックスの一部又はすべてが、本発明のzcytor17ligと、もう1つのファミリーメンバー、例えばIL-15、IL-2、IL-4、又はGM-CSFからのその機能的に同等のヘリックスとの間で交換され得る。

30

【0175】

そのような成分は次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：分泌シグナル配列；4-ヘリカル束サイトカインのヘリックスA、B、C、D；ループA/B、B/C、C/D。そのような融合タンパク質は、構成される融合体に依存して、本発明のポリペプチド又は他の既知の4-ヘリカル束サイトカインファミリータンパク質と同じか又は類似する生物学的機能プロファイルを有することが予測される。さらに、そのような融合タンパク質は、本明細書に開示されるように、他の性質も示すことができる。

40

【0176】

標準の分子生物学及びクローニング技法が、zcytor17ligポリペプチドと、それらが融合されるそれらのポリペプチドとの間の同等のドメインを交換するために使用され得る。一般的に、興味あるドメイン、例えばzcytor17ligヘリックスA~D、又は本明細書に記載される他のドメインをコードするDNAセグメントが、追加のポリペプチド (例えば、他のサイトカイン、例えばIL-2、又は同様のものからのドメイン又は領域) をコードする少

50

なくとも1つの他のDNAセグメントに読み取り枠を接合して操作可能的に結合され、そして本明細書に記載されるように、適切な発現ベクター中に挿入される。

【0177】

一般的に、DNA構造体は、ポリペプチドのその対応する領域をコードするいくつかのDNAセグメントが、完全な融合タンパク質又はその機能的部分をコードする単一の構造体を製造するために読み取り枠を整合して、操作可能的に連結されるように、製造される。例えばDNA構造体は、N-末端からC-末端側に、シグナルポリペプチドを含んで成る融合タンパク質、続いて、ヘリックスA、ヘリックスB、ヘリックスC、ヘリックスDを含む4-ヘリカル束サイトカイン融合タンパク質をコードする。そのような融合タンパク質は、本明細書に記載されるように、発現され、単離され、そして活性についてアッセイされ得る。

10

【0178】

zcytor17ligポリペプチド又はそのフラグメントはまた、化学的合成を通して調製され得る。zcytor17ligポリペプチドはモノマー又はマルチマーであり得；グリコシル化されても又はグリコシル化されなくても良く；ペルギレート化されても又はペルギレートされなくても良く；そして開始メチオニンアミノ酸残基を含んでも又は含まなくても良い、例えば、ポリペプチドは、Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, 1963により記載されるように、固相ペプチド合成により調製され得る。

【0179】

本発明の分子の活性は、zcytor17受容体を発現する細胞の増殖及び/又はその細胞への結合を測定する種々のアッセイを用いて測定され得る。zcytor17lig-依存性細胞における変化が特に興味の対象である。zcytor17lig-依存性である構築され得るべき適切な細胞系は、IL-3-依存性BaF3細胞系 (Palacios and Steinmetz, Cell 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot など., Mol. Cell. Biol. 6: 4133-4135, 1986)、FDC-P1 (Hapel など., Blood 64: 786-790, 1984) 及びM07e (Kissなど., Leukemia 7: 235-240, 1993) を包含する。成長因子-依存性細胞系は、公開された方法 (例えば、Greenbergerなど., Leukemia Res. 8: 363-375, 1984; Dexterなど., in Baum など., Eds., Experimental Hematology Today, 8th ann. Mtg. Int. Soc. Exp. Hematol. 1979, 145-156, 1980) に従って確立され得る。

20

【0180】

本発明のタンパク質は、造血機能及び免疫機能の関連する恒常性の細胞の特殊化された細胞機能の増殖、活性化、分化及び/又は誘発又は阻害を刺激するために有用である。特に、zcytor17ligポリペプチドは、造血系の細胞、例えばT細胞、B細胞、単球/マクロファージ、NK細胞、好中球、内皮細胞、線維芽細胞、好酸球、軟骨細胞、肥満細胞、ランゲルハンス細胞、単球及びマクロファージ、並びに上皮細胞 (但し、それらだけには限定されない) の特殊化された細胞機能の増殖、活性化、分化、誘発又は阻害を刺激するために有用である。上皮細胞は、例えばエナメル芽細胞、主細胞、色素体、腸クロム親和細胞、腸クロム親和様細胞、杯細胞、顆粒膜細胞、ケラチノサイト、樹状突起細胞、迷路支持細胞、メラノサイト、メルケル細胞、パーネト細胞、壁細胞、セルトリ細胞及び同様のものを包含する。造血細胞の増殖及び/又は分化は、培養された細胞を用いてインビトロで、又は本発明の分子を適切な動物モデル中に投与することによって、インビトロで測定され得る。細胞増殖又は分化を測定するアッセイは、当業者において良く知られている。

30

40

【0181】

たとえば、増殖を測定するアッセイは、次のようなアッセイを包含する：中性赤色素に対する化学感受性 (Caranaugh など., Investigational New Drugs 8: 347-354, 1990; 引用により本明細書に組み込まれる)、放射性ラベルされたヌクレオチドの組み込み (Cook など., Analytical Biochem. 179: 1-7, 1989; 引用により本明細書に組み込まれる)、増殖する細胞のDNAへの5-プロモ-2'-デオキシウリジン (BrdU) の組み込み (Porstmann など., J. Immunol. Methods 82: 169-179, 1985; 引用により本明細書に組み込まれる)、及びテトラゾリウム塩の使用 (Mosmann, J. Immunol. Methods 65: 55-63, 1983; Alley など., Cancer Res. 48: 589-601, 1988; Marshall など., Growth Reg. 5: 69-8

50

4, 1995; 及びScudiero など., Cancer Res. 48: 4827-4833, 1988; すべては引用により本明書に組み込まれる)。

【0182】

分化を測定するアッセイは、たとえば組織の段階—特異的発現に関連する細胞表面マーカー、酵素活性、官能的活性、又は形態変化の測定を包含する (Watt, FASEB 5: 281-284, 1991; Francis, Differentiation 57: 63-75, 1994; Raes, Adv. Anim. Cell Biol. Technol. Bioprocesses, 1161-171, 1989; すべては引用により本明細書に組み込まれる)。

【0183】

本発明の分子は、ウィルス供給システムを用いてインビボでアッセイされ得る。この目的のための典型的なウィルスは、アデノウィルス、ヘルペスウィルス、ワクシニアウィルス及びアデノ関連ウィルス (AAV) を包含する。アデノウィルス、すなわち二本鎖DNAウィルスは現在、異種拡散の供給のための最も研究されている遺伝子トランスファーベクターである (T. C. Becker など., Meth. Cell Bio. 43: 161-89, 1994; 及びJ. T. Douglas and D.T. Curiel, Science & Medicine 4: 44-53, 1997 を参照のこと)。

【0184】

リガンドとして、zcytor17ポリペプチドの活性は、受容体結合及び続く生理学的細胞応答に関連する細胞外酸性化速度又はプロトン排泄を測定する珪素基材のバイオセンサーマイクロフィジオメーターにより測定され得る。典型的な装置は、Molecular device, Sunnyvale, CAにより製造されるCytosensorTM Microphysiometerである。種々の細胞応答、たとえば細胞増殖、イオン輸送、エネルギー生成、炎症応答、調節及び受容体活性化及び同様のものが、この方法により測定され得る。例えば、McConnell, H.M. など., Science 257: 1905-1912, 1992; Pitchford, S. など., Meth. Enzymol. 228: 84-108, 1997; Arimilli, S. など., J. Immunol. Meth. 212: 49-59, 1998; Van Liefde, I. など., Eur. J. Pharmacol. 346: 87-95, 1998を参照のこと。

【0185】

さらに、zcytor17ligは、zcytor17lig—刺激された経路に応答する、細胞、組織又は細胞系を同定するために使用され得る。上記に記載されるマイクロフィジオメーターは、リガンド—応答性細胞、例えば、本発明のzcytor17ligに応答する細胞を急速に同定するために使用され得る。細胞は、zcytor17ligポリペプチドの存在又は不在下で培養され得る。zcytor17ligの存在下で細胞外酸性化において測定できる変化を誘発するそれらの細胞は、zcytor17ligに対して応答性である。そのような細胞又は細胞系は、上記に記載されるように、zcytor17ligポリペプチドのアンタゴニスト及びアゴニストを同定するために使用され得る。

【0186】

zcytor17lig受容体アゴニストに関して観察され組織分布の観点においては、アゴニスト (例えば、天然のzcytor17lig/基質/補因子/等) 及びアンタゴニストは、インビトロ及びインビボ用途において莫大な可能性を有する。zcytor17ligアゴニストとして同定される化合物は、造血機能及び免疫機能の恒常性に関連する細胞の特殊化された細胞機能の拡張、増殖、活性化、分化及び/又は誘発又は阻害を刺激するために有用である。例えば、zcytor17lig及びアゴニスト化合物は、定義された細胞培養培地の成分として有用であり、そして細胞培養物において通常使用される血清を置換するために、単独で、又は他のサイトカインと組合して使用され得る。従って、アゴニストは、培養物におけるT-細胞、B-細胞、単球/マクロファージ、NK細胞、細胞毒性リンパ球、及びリンパ球及び骨髓系の増殖及び/又は成長を特異的に促進することにおいて有用である。

【0187】

アンタゴニストはまた、リガンド—受容体相互作用の部位を特徴づけるための研究試薬として有用である。アンタゴニストは、造血機能の調節に関与する細胞の拡張、増殖、活性化、及び/又は分化を阻害するために有用である。zcytor17lig活性のインヒビター (zcytor17ligアンタゴニスト) は、抗-zcytor17lig抗体、及び可溶性zcytor17lig受容体、

並びに他のペプチド及び非ペプチド剤（例えば、リボザイム）を包含する。

【0188】

zcytor17ligはまた、その活性のインヒビター（アンタゴニスト）を同定するためにも使用される。試験化合物が、zcytor17ligの活性を阻害する化合物を同定するために、本明細書に開示されるアッセイに添加される。本明細書に開示されるそれらのアッセイの他に、サンプルは、受容体結合、すなわちzcytor17受容体－発現細胞のzcytor17lig－依存性細胞応答又は増殖を測定するよう企画された種々のアッセイ内でのzcytor17lig活性の阻害について試験され得る。

【0189】

zcytor17ligポリペプチドは、免疫グロブリンH鎖不変領域、典型的には2つの不変領域ドメインを含み、そして可変領域を欠いているFcフラグメントとの融合体として発現され得る。そのような融合体を調製するための方法は、アメリカ特許第5,155,027号及び第5,567,584号に開示される。そのような融合体は典型的には、マルチマー分子として分泌され、ここでFc部分はお互いジスルフィド結合され、そして2つの非-Igポリペプチドはお互い接近して整列されている。このタイプの融合体は例えば、インビトロアッセイ手段又はアンタゴニストとして、リガンドを親和性精製するために、安定性及びインビボ半減期を高める二量体化のために使用され得る。アッセイへの使用に関しては、前記キメラはFc領域を通して支持体に結合され、そしてELISA型に使用される。

【0190】

zcytor17lig－結合ポリペプチドはまた、リガンドの精製のためにも使用される。前記ポリペプチドは、固体支持体、例えばアガロース、架橋されたアガロース、ガラス、セルロース樹脂、シリカ基材の樹脂、ポリスチレン、架橋されたポリアクリルアミド又は使用の条件下で安定している同様の材料のビーズ上に固定される。固体支持体にポリペプチドを結合するための方法は、当業界において知られており、そしてアミン化学、臭化シアノゲン活性化、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及びヒドラジド活性化を包含する。得られる媒体は一般的に、カラムの形で形状化され、そしてリガンドを含む流体が、受容体ポリペプチドへのリガンドの結合を可能にするために、カラムに1又は複数回、通される。次に、リガンドが、塩濃度の変化、カオトロピック剤（グアニジンHCl）、又はリガンド－受容体結合を破壊するpHを用いて溶出される。

【0191】

リガンド－結合受容体（又は抗体、補体／抗補体対の1つのメンバー）、又はその結合フラグメント、及び市販のバイオセンサー装置を用いるアッセイシステムが、好都合には、使用され得る（例えば、BIAcore, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ）。そのような受容体、抗体、補体／抗補体対のメンバー、又はフラグメントは、受容体チップの表面上に固定される。この装置の使用は、Karlsson, J. Immunol. Methods 145: 229-40, 1991 及びCunningham and Wells, J. Mol. Biol. 234: 554-63, 1993により開示される。受容体、抗体、メンバー又はフラグメントは、アミン又はスルフヒドリル化学を用いて、流動細胞内の金フィルムに結合されるデキストラン線維に共有結合される。試験サンプルが細胞に通される。

【0192】

リガンド、エピトープ又は補体／抗補体対の反対のメンバーがサンプルに存在する場合、それは、それぞれ固定された受容体、抗体又はメンバーに結合し、金フィルムの表面のプラズモン共鳴の変化として検出される、媒体の屈折率の変化を引き起こす。このシステムは、オン－及びオフ速度の決定を可能にし、これから、結合親和性が計算され、そして結合の化学量の評価が可能にされる。他方では、リガンド/受容体結合は、SELDI™ technology (Ciphergen, Inc. Palo Alto, CA) を用いて分析され得る。

リガンド－結合受容体ポリペプチドはまた当業界において知られている他のアッセイシステム内でも使用され得る。そのようなシステムは、結合親和性の決定のためのスカチャード分析 (Scatchard, Ann. NY. Acad. Sci. 51:660-72, 1949) 及び熱量測定アッセイ

10

20

30

40

50

(Cunningham など., Science 253: 545-48, 1991;Cunningham など., Science 245: 821-25, 1991) を包含する。

【0193】

zcytor17ligポリペプチドはまた、zcytor17ligエピトープ、ペプチド又はポリペプチドに特異的に結合する抗体を調製するためにも使用され得る。zcytor17ligポリペプチド又はそのフラグメントは、動物を接種し、そして免疫応答を誘発するための剤(免疫原)として作用する。そのような抗体は、前炎症性zcytor17ligの生物学的作用を阻止するために使用され、そして本明細書に記載されるような種々の疾病における前炎症性治療剤として有用である。当業者は、抗原性エピトープ担持のポリペプチドがzcytor17ligポリペプチド(例えば、配列番号2)の少なくとも6、好ましくは少なくとも9及びより好ましくは少なくとも15~約30個の連続したアミノ酸残基を含むことを認識するであろう。

10

【0194】

zcytor17ligポリペプチドの大きな部分、すなわちアミノ酸配列の30~100個の残基~その全体の長さの残基を含んでなるポリペプチドが含まれる。抗原又は免疫原エピトープはまた、本明細書に記載されるように、結合された標識、アジュバンド及びキャリアを含むことができる。適切な抗原は、配列番号2のアミノ酸番号24~アミノ酸番号164によりコードされるzcytor17ligポリペプチド、又は連続した9~141個のそのアミノ酸フラグメントを含む。他の適切な抗原は、本明細書に記載されるように、zcytor17lig4-ヘリカル束構造の個々の又は複数のヘリックスA、B、C及びDを包含する。

【0195】

20

抗原として使用するための好ましいペプチドは、親水性ペプチド、例えば本明細書に記載されるように、疎水性プロットから当業者により予測されるそれらのもの、例えば、配列番号2のアミノ酸残基114~119、101~105、126~131、113~118及び158~162、及び配列番号11のアミノ酸残基34~39、46~51、131~136、158~163及び157~162を包含する。さらに、例えばDNASTAR Proteanプログラム(DNASTAR, Inc.,Madison, WI)を用いて、Jameson-Wolfにより推定されるように、zcytor17lig抗原性エピトープは、好ましい抗原として作用し、そして当業者により容易に決定される。

【0196】

それらの抗原による動物の接種により生成される免疫応答からの抗体は、本明細書に記載のようにして単離され、そして精製され得る。ポリクローナル及びモノクローナル抗体を調製し、そして単離するための方法は、当業界において良く知られている。例えば、Current Protocols in Immunology, Cooligan, など., (eds.), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995; Sambrook など., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, NY, 1989; 及びHurrell, J.G.R., Ed., Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1982 を参照のこと。

30

【0197】

当業者に明らかなように、ポリクローナル抗体は、種々の温血動物、例えば馬、ウシ、ヤギ、羊、犬、鶏、ウサギ、マウス、及びラットをzcytor17ligポリペプチド又はそのフラグメントにより接種することにより生成され得る。zcytor17ligポリペプチドの免疫性は、アジュバント、例えばミヨウバン(水酸化アルミニウム)又はフロイント完全又は不完全アジュバントの使用により高められ得る。免疫化のために有用なポリペプチドはまた、免疫グロブリン ポリペプチド又はマルトース結合タンパク質との融合体ポリペプチド、例えばzcytor17lig又はその一部の融合体を包含する。ポリペプチド免疫原は、十分な長さの分子又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、そのような部分は、免疫化のために、高分子キャリアー(例えば、カサガイヘモシアニン(KLH)、ウシ血清アルブミン(BSA)又は破傷風トキソイド)に都合良く連結又は結合され得る。

40

【0198】

本明細書で使用される場合、用語“抗体”とは、ポリクローナル抗体、親和性精製され

50

たポリクローナル抗体、モノクローナル抗体及び抗原結合フラグメント、例えば $F(ab')_2$ 及びFabタンパク質分解性フラグメントを包含する。遺伝子的に構築された損なわれていない抗体又はフラグメント、例えばキメラ抗体、Fvフラグメント、一本鎖抗体及び同様のもの、並びに合成抗原結合ペプチド及びポリペプチドもまた包含される。非ヒト抗体は、ヒト骨格及び不変領域上に非ヒトCDRのみを移植することによって、又は完全な非ヒト可変ドメインを組み込むことによって（任意には、暴露された残基の置換によってヒト様表面によりそれらのドメインを“おおう（cloaking）”ことによって；ここで結果物は“張り合わされた”抗体である）、ヒト適合され得る。

【0199】

多くの場合、ヒト型化抗体は、正しい結合特性を増強するために、ヒト可変領域骨格ドメイン内に非ヒト残基を保持することができる。ヒト適合化抗体を通して、生物学的半減期が高められ、そしてヒトへの投与に基づく有害な免疫反応の可能性が低められる。さらに、ヒト抗体は、WIPO公開W098/24893号に開示されるように、ヒト免疫グロブリン遺伝子を含むよう構築されたトランスジェニック非ヒト動物において生成される。好ましくは、それらの動物における内因性免疫グロブリン遺伝子は、相同組換えにより不活性化されるか又は排除される。

【0200】

抗体は、1) それらが限界レベルの結合活性を示す場合、及び2) それらが関連するポリペプチド分子と有意に交差反応しない場合、特異的に結合すると考えられる。限界レベルの結合は、本明細書における抗-zcytor17lig抗体が対照（非-zcytor17lig）ポリペプチドへの結合親和性よりも少なくとも10倍高い親和性を伴って、zcytor17ligポリペプチド、ペプチド又はエピトープに結合するかどうか決定される。好ましくは、抗体は、 $10^6 M^{-1}$ 又はそれ以上、好ましくは $10^7 M^{-1}$ 又はそれ以上、より好ましくは $10^8 M^{-1}$ 又はそれ以上、及び最も好ましくは $10^9 M^{-1}$ 又はそれ以上の結合親和性（ K_a ）を示す。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）を用いて、当業者によって容易に決定され得る。

【0201】

zcytor17lig抗体は関連するポリペプチド分子と有意に交差反応しないかどうかは、例えば、標準のウェスタンブロット分析を用いてzcytor17ligポリペプチドであるが、しかし知られていない関連するポリペプチドを検出する抗体により示される（Ausubel など., 前記）。既知の関連するポリペプチドの例は、従来技術に開示されているそれらのもの、例えば既知のオルト体及びパラ体、及びタンパク質ファミリーの類似する既知メンバーである。スクリーニングはまた、非ヒトzcytor17lig及びzcytor17lig変異体ポリペプチドを用いて行われ得る。さらに、抗体は、zcytor17ligポリペプチドに対して特異的に結合する集団を単離するために、既知の関連するポリペプチドに“対してスクリーンされ得る”。

【0202】

例えば、zcytor17ligに対して生ぜしめられた抗体は不溶性マトリックスに付着される関連するポリペプチドに吸着され；zcytor17ligに対して特異的な抗体は適切な緩衝液条件下で前記マトリックスを通して流れるであろう。スクリーニングは、既知の溶接に関連するポリペプチドに対して交差反応しないポリクローナル及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, など. (eds.), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995）。

【0203】

特異的抗体のスクリーニング及び単離は当業界において当業界において良く知られている。Fundamental Immunology, Paul (eds.), Raven Press, 1993; Getzoffなど., Adv.in Immunol. 43: 1-98, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Goding, J.W. (eds.), Academic Press Ltd., 1996; Benjamin など., Ann. Rev. Immunol. 2: 67-101, 1984を参照のこと。特異的に結合する抗-zcytor17lig抗体は、当業界において

知られており、そして下記に開示される多くの方法により検出され得る。

【0204】

当業者に知られている種々のアッセイがzcytor17ligタンパク質又はペプチドに特異的に結合する抗体を検出するために使用され得る。典型的なアッセイは、Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and lane (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 に詳細に記載されている。そのようなアッセイの代表的な例は次のものを包含する: 同時免疫電気泳動、ラジオイムノアッセイ、ラジオイムノ沈殿、酵素結合の免疫吸着アッセイ (ELISA)、ドットブロット又はウェスタンブロットアッセイ、阻害又は競争アッセイ。及びサンドイッチアッセイ。さらに、野生型対変異体のzcytor17ligタンパク質又はペプチドに結合する抗体がスクリーンされ得る。

10

【0205】

zcytor17ligに対する抗体は、zcytor17ligを発現する細胞を標識するために; アフィニティー精製によりzcytor17ligを単離するために; zcytor17ligポリペプチドの循環レベルを決定するための診断アッセイのために; 根本的な病理学のマーカーとして可溶性zcytor17ligを検出し又は定量化するために; FACS を使用する分析方法において、発現ライブラリーをスクリーニングするために; 抗-インディオタイプ抗体を生成するために; 及びインビトロでzcytor17lig活性を阻止するための中和抗体又はアンタゴニストとして使用され得る。

【0206】

適切な直接的標識又はラベルは、放射性核種、酵素、基質、補因子、インヒビター、蛍光マーカー、化学発光マーカー、磁気粒子及び同様のものを包含し; 間接的な標識又はラベルは、中間体としてのビオチン-アビジン又は他の補体/抗-補体対の使用を特徴とする。本発明書における抗体及び結合タンパク質はまた、薬物、トキシン、放射性核種、及び同様のものに直接的に又は間接的に接合され得、そしてそれらの接合体はインビボ診断又は治療用途のために使用され得る。さらに、zcytor17lig又はそのフラグメントに対する抗体は、アッセイ、例えば当業界において知られているウェスタンブロット又は他のアッセイにおいて、変性されたzcytor17lig又はそのフラグメントを検出するためにインビトロで使用され得る。

20

【0207】

適切な検出可能分子は、ポリペプチド又は抗体に直接的に又は間接的に結合され得、そして放射性核種、酵素、基質、補因子、インヒビター、蛍光マーカー、化学発光マーカー、磁気粒子、及び同様のものを包含する。適切な細胞毒性分子は、ポリペプチド又は抗体に直接的に又は間接的に結合され得、そして細菌又は植物毒性 (例えば、ジフテリア毒素、ブソイドモナシス内毒素、リシン、アブリン及び同様のもの)、及び治療用放射性核種、例えばI-131、レニウム-188又はイットリウム-90 (ポリペプチド又は抗体に直接的に結合されるか、又はキレート成分により間接的に結合される) を包含する。ポリペプチド又は抗体はまた、細胞毒性薬物、例えばアドリアマイシンに結合され得る。検出可能又は細胞毒性分子の間接的な結合に関しては、検出可能又は細胞毒性分子は相補的/抗相補的対のメンバーにより結合され得、ここで他のメンバーはポリペプチド又は抗体部分に結合される。それらの目的のためには、ビオチン/ストレプトアビジンが典型的な相補的/抗相補的対である。

30

40

【0208】

結合ポリペプチドはまた、zcytor17lig結合及びシグナルトランスダクションをインビトロ及びインビボで阻止するために、zcytor17lig “アンタゴニスト” として作用することができる。それらの抗-zcytor17lig結合タンパク質は、zcytor17lig活性又はタンパク質結合を阻害するために有用である。

【0209】

ポリペプチド-毒素融合タンパク質又は抗体-毒素融合タンパク質は、標的化された細胞又は組織阻害又は除去 (例えば、癌細胞又は組織を処理するために) のために使用され得る。他方では、ポリペプチドが複数の機能ドメイン (すなわち、活性化ドメイン又はリ

50

ガンド結合ドメイン、及び標的化ドメイン)を有する場合、標的化ドメインのみを包含する融合タンパク質は、検出可能分子、細胞毒性分子又は相補的分子を、興味ある細胞又は組織型に向けるために適切である。ドメインのみの融合タンパク質が相補的分子を含む場合、抗-相補的分子は検出可能又は細胞毒性分子に接合され得る。従って、そのようなドメイン-相補的分子融合タンパク質は、一般的抗-相補的-検出可能/細胞毒性分子接合体のための一般的標的化ピークルを表す。

【0210】

もう1つの態様においては、zcytor17lig-サイトカイン融合タンパク質又は抗体-サイトカイン融合タンパク質は、zcytor17lig受容体が発現される場合、標的組織(例えば、白血病、リンパ腫、肺癌、結腸癌、メラノーマ、膵臓癌、卵巣癌、血液及び骨髄癌、又は他の癌)のインビボ殺害を増強するために使用され得る(一般的には、Hornickなど., Blood 89: 4437-4447, 1997を参照のこと)。記載される融合タンパク質は、作用の所望する部位へのサイトカインの標的化を可能にし、それにより、サイトカインの高められた局部濃度を提供する。適切なzcytor17ligポリペプチド又は抗-zcytor17lig抗体は、所望しない細胞又は組織(例えば、腫瘍又は白血病)を標的化し、そして融合されたサイトカインはエフェクター細胞による改良された標的細胞溶解を仲介する。例えば、この目的のための適切なサイトカインは、インターロイキン-2及び顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSM)を包含する。

【0211】

さらにもう1つの態様においては、zcytor17ligポリペプチド又は抗-zcytor17lig抗体が血管細胞又は組織を標的化する場合、そのようなポリペプチド又は抗体は、再狭窄を低めるために、放射性核種、及び特にβ線放射性核種により接合され得る。そのような治療アプローチは、放射性治療を管理する臨床医にほとんど危険性を与えない。例えば、必要とされる放射線量が供給されるまで患者のステント管中に配置される、イリジウム-192含浸されたリボン、前記管における低められた組織増殖、及びブラシーポリボンを受けた対照グループよりも大きな管腔直径を示した。さらに、再血管化及びステント血栓症は、処理グループにおいて有意に低かった。類似する結果が、本明細書に記載されるように、放射性核種を含む生活性接合体の標的化により推定される。

【0212】

本明細書に記載される生活性ポリペプチド又は抗体接合体は、静脈内、動脈内又は管内供給され得、又は作用の意図された部位に局部的に導入され得る。

【0213】

さらに、炎症は、侵入剤を受けとめるための生物による保護応答である。炎症は、多くの細胞及び体液メディエーターを包含する段階的に連続した現象である。他方では、炎症応答の制御は宿主を免疫無防備状態にするが、しかしながら、抑制されなければ、炎症は、慢性炎症性疾患(例えば、リウマチ様関節炎、多発性硬化症、炎症性腸疾患及び同様のもの)、敗血性ショック及び多発性器官不全を包含する重度の合併症を導くことができる。重要なことには、それらの種々の疾病状態は、共通する炎症性メディエーターを共有する。炎症により特徴づけられる集合的疾患は、ヒト罹病率及び死亡率に対して大きな衝撃を有する。

【0214】

従って、抗-炎症性抗体及び結合ポリペプチド、例えば本明細書に記載される抗-zcytor17lig抗体及び結合ポリペプチドが、喘息及びアレルギーから自己免疫性及び敗血性ショックまでの莫大に多くのヒト及び動物疾患のための決定的な治療可能性を有することが明白である。本明細書に記載される抗-炎症性抗zcytor17lig抗体及び結合ポリペプチドの使用は、特に関節炎、内毒血症、炎症性腸疾患、乾癬、関連する疾患及び同様のもののような疾病において、本明細書に記載されるzcytor17ligアンタゴニストとして治療的に使用され得る。

【0215】

1. 関節炎:

変形性関節炎、リュウマチ様関節炎、損傷の結果としての関節炎性の関節、及び同様のものを包含する関節炎は、抗炎症性抗体及び結合ポリペプチド、例えば本発明のzcytor17 lig抗体及び結合ポリペプチドの治療使用から利益を得る通常の炎症状態である。例えば、リュウマチ様関節炎（RA）は、全身体に影響を及ぼす全身性疾患であり、そして最も通常の形の関節炎の1つである。それは、痛み、硬直、発熱、赤み及び膨潤を引き起こす、関節の内側をおおう膜の炎症によって特徴づけられる。炎症細胞は、骨及び軟骨を消化することができる酵素を開放する。リュウマチ様関節炎の結果として、炎症の関節内層、すなわち滑液が侵入し、そして骨及び軟骨に損傷を与え、他の生理学的効果の中で、関節変性及び重度の痛みを導く。その関連する関節は、その形状及び整合を失い、痛み及び運動の損傷をもたらす。

10

【0216】

リュウマチ様関節炎（RA）は、重度の疾病及び高められた死亡率を導く、炎症及び続く組織損傷により特に特徴づけられる免疫介在性疾患である。種々のサイトカインがリュウマチ様関節炎において局所的に生成される。多くの研究は、IL-1及びTNF- α （2種のプロトタイプのプロ炎症性サイトカイン）が滑膜炎及び進行性関節破壊に關与する機構において重要な役割を演じることを実証している。実際、RAを有する患者におけるTNF- α 及びIL-1インヒビターの投与は、炎症の臨床学的及び生物学的徴候の劇的な改良、及び骨侵食及び軟骨破壊の放射線学徴候の低下を誘導して来た。

【0217】

しかしながら、それらの有望な結果にもかかわらず、有用な%の患者がそれらの剤に対して応答せず、このことは、他のメディエーターがまた、関節炎の病理学にも關与することを示唆する（Gabay, Expert. Opin. Biol. Ther. 2(2): 135-149, 2002）。それらのメディエーターの1つは、zcytor17ligであり、そしてzcytor17lig、例えば抗zcytor17lig抗体又は結合パートナーを結合するか又は阻害するそのような分子として、リュウマチ様関節炎及び他の関節炎患者における炎症を低めるための価値ある治療剤として作用することができる。

20

【0218】

当業界において知られているリュウマチ様関節炎についてのいくつかの動物モデルが存在する。例えば、コラーゲン誘発された関節炎（CIA）モデルにおいては、マウスは、ヒトリウマチ様関節炎に密接に類似する慢性炎症性関節炎を進行する。CIAはRAと、類似する免疫学的及び病理学的特徴とを共有するので、これは、可能性あるヒト抗炎症性化合物をスクリーニングのための理想的モデルにする。このCIAモデルは、免疫応答及び炎症性応答の両者に依存する、マウスにおける良く知られているモデルである。免疫応答は、抗原として与えられ、そして抗コラーゲン抗体の生成を導く、コラーゲンに反応してB細胞及びCD4+ T細胞の相互作用を包含する。

30

【0219】

炎症相は、マウスの生来のコラーゲンと交差反応し、そして補体カスケードを活性化するそれらのいくつかの抗体の結果として、炎症のメディエーターからの組織応答の結果である。CIAモデルを用いることの利点は、病因の基本的機構が知られていることである。タイプIIコラーゲン上の適切なT細胞及びB細胞エピトープは同定されており、そして免疫介在性関節炎に關係する、種々の免疫学的（例えば、遅延性型過敏症及び抗コラーゲン抗体）及び炎症性（例えば、サイトカイン、ケモカイン及びマトリックスメタセラーゼ）パートナーが決定されており、そして従って、CIAモデルにおける試験化合物の効率を評価するために使用され得る。（Wooley, Curr. Opin. Rheum. 3: 407-20, 1999; Williamsなど., Immunol. 89: 9784-788, 1992; Myersなど., Life Sci. 61: 1861-78, 1997; 及びWangなど., Immunol. 92: 8955-959, 1995）。

40

【0220】

可溶性zcytor17含有ポリペプチド（本明細書に記載されるヘテロダイマー及びマルチマーを包含する）、例えばzcytor17-Fc4又は他のzcytor17可溶性及び融合タンパク質のそれらのCIAモデルマウスへの投与は、症状を改善し、そして疾病の経路を変更するためへのz

50

cytor17の使用を評価するために使用された。免疫及び炎症性応答を調節する分子zcytor17ligは、リウマチ様関節炎の病因に関連するSAAの生成を誘発し、そしてzcytor17ligアンタゴニストはインビトロ及びインビボでSAA活性を阻害することができるので、zcytor17ligアンタゴニスト、例えば抗-zcytor17lig抗体又は結合パートナー、すなわちzcytor17含有ポリペプチド（本明細書に記載されるヘテロダイマー及びマルチマーを包含する）例えばzcytor17-Fc4又は他のzcytor17可溶性及び融合タンパク質の全身性又は局部投与は、RAにおける炎症性応答を実質的に抑制することができる。他の可能性ある治療剤は、zcytor17ポリペプチド、可溶性ヘテロダイマー及びマルチマー受容体ポリペプチド、又は本発明の抗zcytor17lig抗体又は結合パートナー及び同様のものを包含する。

【0221】

10

2. 内毒血症：

内毒血症は、感染剤、例えば細菌及び他の感染性疾患剤、敗血症、毒性ショック症候群に通常起因するか、又は日和見性感染及び同様のものにゆだねられた免疫無防備状態の患者における重症状態である。治療的に有用な抗炎症性抗体及び結合パートナー、例えば本発明の抗-zcytor17lig抗体及び結合パートナーは、ヒト及び動物における内毒血症の予防及び処理を助ける。zcytor17ポリペプチド、可溶性ヘテロダイマー及びマルチマー受容体ポリペプチド、又は抗zcytor17lig抗体又は結合パートナー及び同様のものを包含する他の可能性ある治療剤は、内毒血症における炎症及び病理学的効果を低めるための価値ある治療剤として作用することができる。

【0222】

20

ポリ多糖類（LPS）誘発された内毒血症は、感染性疾患において病理学的効果を生ずる多くのプロ炎症メディエーターと連動し、そして嚙歯動物におけるLPS誘発された内毒血症は、可能性あるプロ炎症又は免疫調節剤の薬理学的効果を研究するための広く使用され、そして許容できるモデルである。グラム陰性細菌において生成されるLPSは、敗血症性ショックの病因における主要原因剤である（Glausnerなど., Lancet 338: 732, 1991）。

【0223】

ショック様状態は実際、LPSの動物中への1回の注射入により実験的に誘発され得る。LPSに応答する細胞により生成される分子は、病原体を直接的に又は間接的に標的化することができる。それらの生物学的応答は侵入性病原体に対して宿主を保護するが、それらは損傷を引き起こすことができる。従って、重度のグラム陰性細菌感染の結果として生じる生来の免疫性の強力な刺激が、サイトカイン及び他の分子の過剰の生成、及び致命的症状、発熱により特徴づけられる敗血症性ショック症状、低血圧、散在性血管内凝固、及び多発性器官不全の進行を誘導する（Dumitruなど., Cell 103: 1071-1083, 2000）。

30

【0224】

LPSのそれらの毒性効果は、複数の炎症性メディエーターの導くマクロファージ活性化に最も関連している。それらのメディエーターの中で、TNFは、中和化抗-TNF抗体の投与によるLPS毒性の予防により示されるように、決定的な役割を演じるように見える（Beutlerなど., Science 229: 869, 1985）。C57Bl/6マウス中へのE. コリLPS 1 µgの注射が、注射の約2時間後、循環性IL-6、TNF-α、IL-1、及び急性相タンパク質（例えば、SAA）の有意な上昇をもたらすであろうことは、十分に確立されている。

40

【0225】

LPSの毒性は、それらのメディエーターに対する受動性免疫化が低められた致死性をもたらすので、それらのサイトカインにより介在されると思われる（Beutler など., Science 229: 869, 1985）。敗血症性ショックの予防及び/又は処理のための可能性ある免疫介入方法は、抗-TNF mAb, IL-1受動体アンタゴニスト、LIF、IL-10及びG-CSFを包含する。LPSは、内毒血症の病理学にたぶん寄与するプロ炎症性因子の生成を誘発するので、zcytor17ligポリペプチドを拮抗することによるzcytor17lig活性、SAA又は他のプロ炎症因子のその中和は、例えば内毒性ショックに見られる内毒血液の症状を減じるために使用され得る。他の可能性ある治療剤は、zcytor17ポリペプチド、可溶性ヘテロダイマー及びマルチマー受容体ポリペプチド、又は抗zcytor17lig抗体又は結合パートナー及び同様のもの

50

のを包含する。

【0226】

3. 炎症性腸疾患、IBD:

アメリカ合衆国においては、約500,000人の人々が、結腸又は直腸のいずれか（潰瘍性大腸炎）、又は小及び大腸の両者（クローン病）に影響を及ぼすことができる炎症性腸疾患（IBD）を有する。それらの疾病の病因は不明であるが、しかしそれらは影響される組織の慢性炎症を包含する。zcytor17ポリペプチド、可溶性ヘテロマー及びマルチマー受容体ポリペプチド又は本発明の抗-zcytor17lig抗体又は結合パートナー、及び同様のものを包含する有力な治療剤は、IBD及び関連する疾病における炎症性及び病理学的効果を低めるための価値ある治療剤として作用する。

10

【0227】

潰瘍性大腸炎（UC）は、結腸の粘膜又は最も内部の内層の炎症及び潰瘍により特徴づけられた、通常結腸と呼ばれる大腸の炎症性疾患である。この炎症は、時折結腸を空にし、下痢をもたらす。症状は、下痢ぎみ及び関連する腸の痙攣、発熱及び体重の低下を包含する。UCの正確な原因は未知であるが、最近の研究は、身体の天然の防御が、身体が外来性に見なすタンパク質に対して作用する（“自己免疫反応”）ことを示唆する。たぶん、それらは腸における細菌タンパク質に類似するので、それらのタンパク質は、結腸の内層を破壊し始める炎症工程を生ぜしめるか又は刺激することができる。

【0228】

結腸の内層が破壊されるにつれて、潰瘍が開放性粘液、膿及び血液を形成する。その疾病は通常、直腸領域で始まり、そして最終的に、全大腸中に拡張する。炎症の反復された症状の発現は、癒痕組織を伴って、腸及び直腸の壁の肥厚化を導く。結腸組織の死又は販血症は、重度の疾病を生ぜしめる。潰瘍性大腸炎の症状は重症度において変化し、そしてそれらの開始は徐々であるか又は突然であり得る。攻撃は、多くの要因、例えば呼吸器感染又はストレスにより刺激され得る。

20

【0229】

現在、UCについての有益な治療は存在しないが、処理は、結腸内層における異常炎症工程の抑制に集中される。コルチコステロイド免疫抑制剤（例えば、アザチオプリン、メルカプトプリン及びメトトレキセート）及びアミノサリチレートを含む処理は、その疾病を処理するために入手できる。しかしながら、免疫抑制剤、例えばコルチコステロイド及びアザチオプリンの長期使用は、骨の微細化、白内障、感染、及び腎臓及び骨髄の効果を包含する重度の副作用をもたらすことができる。現在の治療が好都合でない患者においては、手術が任意である。手術は、全結腸及び直腸の除去を包含する。

30

【0230】

慢性潰瘍性大腸炎に部分的に類似するいくつかの動物モデルが存在する。最も広く使用されるモデルは、結腸において慢性炎症及び潰瘍を誘発する、2, 4, 6-トリニトロベンンスルホン酸/エタノール（TNBS）誘発された大腸炎モデルである。TNBSが直腸内点滴を通して敏感なマウスの結腸中に導入される場合、それは、結腸粘膜において、T-細胞介在性免疫応答を誘発し、この場合、大腸の全壁じゅうへのT-細胞及びマクロファージの強い浸潤により特徴づけられた大量の粘膜浸潤を導く。さらに、この組織病理学的臨床像は、進行性体重の低下（消耗）、出血性下痢、直腸脱出及び大腸壁の肥厚化の臨床学的像を付随する（Neurathなど., Intern. Rev. Immunol. 19: 51-62, 2000）。

40

【0231】

もう1つの大腸炎モデルは、出血性下痢により明白な急性大腸炎、体重の低下、結腸の短縮、及び好中球浸潤を伴った粘膜性潰瘍を誘発する硫酸デキストランナトリウム（DSS）を使用する。DSS誘発された大腸炎は、リンパ過形成、病巣陰窩損傷及び上皮潰瘍を伴って、粘膜固有層中への炎症細胞の浸潤により組織学的に特徴づけられる。それらの変化は、上皮上へのDSSの毒性効果により、及び粘膜固有層細胞のファゴサイトーシス、及びTNF- α 及びIFN- γ の生成により進行すると思われる。その通常の使用にもかかわらず、ヒト疾病への関連性についてのDSSの機構に関するいくつかの問題点は未解決のまま

50

である。DSSは、それがT細胞欠失動物、例えばSCIDマウスにおいて観察されるので、T細胞－無関係モデルとして見なされる。

【0232】

抗-zcytor17lig抗体又は結合パートナー、可溶性zcytor17含有ポリペプチド（ヘテロダイマー及びマルチマー受容体を包含する）、例えばzcytor17-Fc4又は他の可溶性zcytor17及び融合タンパク質のそれらのTNBS又はDSSモデルへの投与は、症状を改善し、そして胃腸病の経路を変更するためにzcytor17ligアンタゴニズムの使用を評価するために使用され得る。zcytor17ligは、大腸炎における炎症応答において役割を演じ、そしてzcytor17ligアンタゴニズムを投与することによるzcytor17lig活性の中和がIBDに関しての可能性ある治療アプローチである。他の可能性ある治療剤は、zcytor17ポリペプチド、可溶性ヘテロダイマー及びマルチマー受容体ポリペプチド、又は抗-zcytor17lig抗体又は本発明の結合パートナー、及び同様のものを包含する。

10

【0233】

4. 乾癬：

乾癬は、700万以上のアメリカ人に影響を及ぼす慢性皮膚状態である。乾癬は、新しい皮膚細胞が異常に増殖する場合に生じ、古い皮膚がすばやく十分に脱皮しない皮膚の赤く熱をもち、はれ上がった、鱗状の皮膚パッチをもたらす。最も通常の形であるプラーク乾癬は、銀色がかった白色鱗片を上部に有する皮膚の炎症性パッチ（“病変”）により特徴づけられる。乾癬は、少数のプラークに限定されるか、又は頭皮、膝、肘及び体幹上に最も通常には出現する、中位～強い皮膚領域を包含する。それは高く認識できるが、乾癬は感染性疾患ではない。疾患の病因は、影響された組織の慢性炎症を包含する。zcytor17ポリペプチド、可溶性ヘテロダイマー及びマルチマー受容体ポリペプチド又は抗-zcytor17lig抗体又は結合パートナーは、乾癬、他の炎症性皮膚疾患、皮膚及び粘膜アレルギー及び関連する疾患における炎症及び病理学的効果を低めるために価値ある治療剤として作用することができる。

20

【0234】

乾癬は、相当な不快性を引き起こすことができる皮膚のT細胞介在性炎症障害である。それは、治癒せず、そしてすべての年齢の人々に影響を及ぼす疾患である。乾癬は、ヨーロッパ及び北アメリカの人口の約2%に影響する。軽い乾癬を有する個人はしばしば、局所剤によりそれらの疾患を制御することができるが、世界じゅうの10万人以上の患者は、紫外線又は全身性免疫抑制療法を必要とする。不運なことには、紫外線の不便性及び危険性、及び多くの治療の毒性が、それらの長期使用を制限する。さらに、患者は通常、乾癬の再発、及び多くの場合、免疫抑制療法の停止後すぐに、再発を有する。

30

【0235】

分化は進行性及び動的な工程であり、多能性幹細胞で始まり、そして最終的に分化された細胞で終結する。拘束なしに系統に再生することができる多能性幹細胞は、細胞系統への拘束が行われる場合、失われる一組の分化マーカーを発現する。前駆体細胞は、細胞が成熟に向かって細胞系統路を進行する場合に、発現され続けることができても又はできなくても良い一組の分化マーカーを発現する。成熟細胞により独占的に発現される分化マーカーは通常、機能的性質のもの、例えば細胞生成物、細胞生成物を生成するための酵素、及び受容体である。細胞集団の分化の段階は、細胞集団に存在するマーカーの同定によりモニターされる。

40

【0236】

最終分化又は脱分化の方の経路に特定細胞型を刺激する化又は調節する因子が、通常の前駆体又は幹細胞に起因する全細胞集団に影響を及ぼすことを示唆する証拠が存在する。従って、本発明は、リンパ細胞、造血細胞及び上皮細胞の刺激又は増殖を包含する。

【0237】

zcytor17ligは、重要な免疫学的機能を有することが知られており、そして免疫系において役割を演じる細胞を含む組織から単離される。zcytor17ligは、CD3+選択された、活性化された末梢血液細胞において発現され、そしてzcytor17lig発現は、T細胞活性化の後

50

、上昇することが示されている。さらに、本明細書における例セクションに記載される実験の結果は、本発明のポリペプチドが単球/マクロファージ、T細胞、B細胞、NK細胞の増殖/拡張、及び/又は単球/マクロファージ、T細胞、B細胞、NK細胞又はそれらの細胞の前駆体の分化された状態に対して効果を有することを示す。

【0238】

造血前駆体の増殖を刺激し、そして成熟細胞を活性化する因子は一般的に知られているが、しかしながら増殖及び活性化はまた、追加の成長因子を必要とする。例えば、IL-7及びSteel因子（c-キットリガンド）がNK前駆体のコロニー形成のために必要とされたことが示されてる。IL-7及びSteel因子と組合してのIL-15+IL-2はより効果的であった（Mr ozekなど., Blood 87:2640, 1996）。しかしながら、未確認のサイトカインが、NK細胞及び/又はNK前駆体の特定サブユニットの増殖のために必要である（Robertson など., Blood 76: 2451-2438, 1990）。同様に、zcytor17ligは、単球/マクロファージ、T細胞、B細胞、NK細胞の分化の成長、増殖拡張及び変性を増強するために、単独で、又は他のサイトカインと共に相乗的に作用することができる。

【0239】

分化を測定するアッセイは例えば、組織、酵素活性、機能的活性又は形態学的変化の段階—特異的発現に関連する細胞—マーカーを測定することに包含する（Watt, FASEB, 5: 281-284, 1991; Francis, Differentiation 57: 63-75, 1994; Raes, Adv. Anim. Cell Biol. Technol. Bioprocesses, 161-171, 1989; すべては引用により本明細書に組み込まれる）。他方では、zcytor17ligポリペプチド自体は、組織の段階—特異的発現に関連する追加の細胞表面又は分泌されたマーカーとして作用することができる。zcytor17ligポリペプチドの直接的な測定、又はそれが分化するにつれての組織における発現のその損失は、組織の分化のためのマーカーとして作用することができる。

【0240】

同様に、zcytor17ligポリペプチドの直接的な測定、又は組織における発現のその損失が、それらが腫瘍の進行を受けるにつれて、組織又は細胞において決定され得る。前癌又は癌状態における細胞の侵襲性及び運動性の上昇、又はzcytor17ligの発現の獲得又は損失が、正常な組織に比較して、腫瘍進行における形質転換、侵襲性及び転移についての診断として作用することができる。進行又は転移の腫瘍段階の知識は、所定の個々の癌患者のために、最も適切な治療又は処理の攻撃性を選択する上で医薬を助けるであろう。

【0241】

発現（mRNA又はタンパク質のいずれかの）の獲得及び損失を測定する方法は、当業界において良く知られており、そして本明細書に記載されており、そしてzcytor17lig発現に適用され得る。例えば、細胞運動性を調節するポリペプチドの出現又は消出が、前立腺癌の診断及び予後を助けるために使用され得る（Banyard, J. and Zetter, B. R., Cancer and Metast. Rev. 17: 449-458, 1999）。細胞運動性のエフェクターとして、発現のzcytor17lig獲得又は損失がリンパ球、B細胞、上皮、造血、及び他の癌についての診断分析として作用することができる。

【0242】

さらに、腫瘍進行及び転移に対するzcytor17ligの活性及び効果が、インビボで測定され得る。いくつかの同系マウスモデルが、腫瘍進行に対するポリペプチド、化合物又は他の処理の影響を研究するために開発されて来た。それらのモデルにおいては、培養継代された腫瘍細胞が、腫瘍ドナーと同じ株のマウス中に移植される。細胞は、受容体マウスにおいて類似する特徴を有する腫瘍中に増殖し、そして転移がまた、そのモデルのいくつかにおいて生じるであろう。本発明者の研究のための適切な腫瘍モデルは、中でも、Lewis肺癌（ATCC No. CRL-1642）及びB16黒色腫（ATCC No. Cr1-6323）を包含する。それらは、インビトロで容易に培養され、そして操作される、C57BL6マウスと同種の通常使用される腫瘍系である。それらの細胞系のいずれかの移植に起因する腫瘍は、C57BL6マウスの肺に転移することができる。

【0243】

Lewis肺癌モデルが最近、脈管形成のインヒビターを同定するためにマウスに使用されている (O'Reilly MS, など. Cell 79: 315-328, 1994)。C57BL6/Jマウスが、組換えタンパク質、アゴニスト又はアンタゴニストの毎日の注入、又は組換えアデノウィルスの1回の注入を通して、実験剤により処理される。この処理に続いて3日で、 $10^5 \sim 10^6$ 個の細胞が背面の皮膚下に移植される。他方では、細胞自体が、タンパク質が全身的によりむしろ腫瘍部位で又は細胞内で合成されるよう、移植の前、組換えアデノウィルス、例えば zcytor17ligを発現するアデノウィルスにより感染され得る。マウスは、通常5日以内に眼に見える腫瘍を進行する。

【0244】

腫瘍が3週間までの間、増殖され、この間、それらは対照の処理グループにおいて1500-1800mm³のサイズに達することができる。腫瘍サイズ及び体重が、その実験を通して注意してモニターされる。殺害の時点で、腫瘍が、肺及び肝臓と共に除去され、そして計量される。肺の重量が、転移性腫瘍負荷量と相互関係することが示された。さらなる測定として、肺表面転移が計数される。切除された腫瘍、肺及び肝臓が、当業界において知られており、そして本明細書に記載される方法を用いて、組織学的試験、免疫組織化学及び現場ハイブリダイゼーションのために調製される。

【0245】

従って血管構造を回復し、そして転移を受ける腫瘍の能力に対する、問題の発現されたポリペプチド、例えば zcytor17ligの影響が評価され得る。さらに、アデノウィルスとは別に、移植された細胞が zcytor17ligにより一時的にトランスフェクトされ得る。安定した zcytor17lig トランスフェクトの使用、及びインビボでの zcytor17lig 発現を活性化する誘発性プロモーターの使用は、当業界において知られており、そして転移の zcytor17lig 誘発を評価するためにこのシステムに使用され得る。さらに、精製された zcytor17lig 又は zcytor17lig ならし培地が、このマウスモデルに直接的に注入され、そして従って、このシステムに使用される。一般的な文献については、O'Reilly MS, など. Cell 79: 315-328, 1994, 及び Rusciano D, など. Murine Models of Liver Metastasis, Invasion Metastasis 14: 349-361, 1995 を参照のこと。

【0246】

zcytor17lig 又はそれに対する抗体は、腫瘍形成を処理することにおいて有用であり、そして従って、癌の処理において有用である。zcytor17lig は、活性化された T-細胞、単球及びマクロファージにおいて発現され、そしてヒト染色体の領域に結合され、ここでトランスロケーションが白血病に共通する。さらに、zcytor17lig は、活性化された T細胞、単球及びマクロファージにおいてもまた発現されるサイトカイン受容体、すなわち zcytor17 マルチマーサイトカイン受容体を通して作用することが示されている。zcytor17lig による、活性化された T-細胞、単球及びマクロファージの過剰刺激は、ヒト疾病状態、例えば免疫細胞癌をもたらす。

【0247】

zcytor17lig 発現を同定すると、ポリペプチド (例えば、抗-zcytor17lig 抗体、zcytor17 可溶性受容体 (例えば、zcytor17 受容体、ヘテロダイマー (例えば、zcytor17/OSMR β , zcytor17/WSX-1)、マルチマー (例えば、zcytor17/OSMR β /WSX-1))、又は他の zcytor17lig 結合パートナー) は、診断剤として作用し、そして zcytor17lig 増殖活性のアンタゴニストとして作用することができる。リガンドは、従来の化学治療剤及び免疫モジュレーター、例えば インターフェロン α を包含する使用において、他の剤と組合して投与され得る。 α/β インターフェロンは、いくつかの白血病及び動物疾病モデルの処理において効果的であることが示されており、そして インターフェクト α 及び zcytor17lig の増殖阻害効果は付加的である。

【0248】

NK細胞は転移性腫瘍細胞の排除において重要な役割を演じると思われ、そして転移及び固形腫瘍を有する患者は、低められたレベルのNK細胞活性を有する (Whiteside など., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 230: 221-244, 1998)。

【0249】

本発明は、腫瘍性単球/マクロファージの増殖を低めるのに十分な量のzcytor17lig又は抗-zcytor17lig組成物を、単球/マクロファージ腫瘍を有する哺乳類に投与することを含んで成る、腫瘍性単球/マクロファージの増殖を低めるための方法を提供する。言い換えれば、前記組成物は少なくとも1つの他のサイトカインを含むことができる。第2サイトカインは、IL-2、IL-3、IL-12、IL-21、IL-22、IL-15、IL-4、GM-CSF、Flt3リガンド又は幹細胞因子から成る群から選択され得る。

【0250】

本発明は、単球/マクロファージの活性化又は分化を阻害するための方法を提供する。単球は、それらが成熟し、そしてマクロファージになる種々の組織に移動する、不完全に分化された細胞である。マクロファージは、リンパ球に抗原を提供することによって免疫応答において中心的役割を演じ、そして多くのサイトカインを分泌することによってリンパ球に対するアクセサリー細胞として支持的な役割を演じる。マクロファージは、細胞外分子を取り込み、そして活性化に基づいて、細胞内微生物及び腫瘍細胞を殺害する高められた能力を有する。活性化されたマクロファージはまた、急性又は局部炎症の刺激にも関与している。

【0251】

もう1つの観点においては、zcytor17ligアンタゴニストを含む組成物を、腫瘍性B又はT-細胞の増殖を低めるのに十分な量、単球/マクロファージ腫瘍を有する哺乳類に投与することを含んで成る、腫瘍性B又はT-細胞の増殖を低めるための方法を提供する。他の態様においては、前記組成物は、少なくとも1つのサイトカインを含んで成り、ここで前記サイトカインは、IL-2、IL-3、IL-12、IL-21、IL-22、IL-15、IL-4、GM-CSF、Flt3リガンド又は幹細胞因子から成る群から選択され得る。さらに、zcytor17ligアンタゴニストは、リガンド/毒素融合タンパク質であり得る。

【0252】

zcytor17lig-サポリン融合トキシンは、類似する組の白血病及びリンパ腫に対して使用され得、その範囲は、zcytor17ligにより処理され得る白血病に拡張する。例えば、そのような白血病は、zcytor17受容体（例えば、zcytor17受容体、ヘテロダイマー（例えば、zcytor17/OSAMR β 、zcytor17/WSX-1）、マルチマー（例えば、zcytor17/OSMR β /WSX-1））を過剰発現するそれらである。zcytor17受容体、zcytor17受容体ヘテロダイマー又はマルチマー（例えば、zcytor17/OSAMR β 、zcytor17/WSX-1又はzcytor17/OSMR β /WSX-1）の融合トキシン介在性活性化は、標的細胞の増殖を阻害するための2種の独立した手段を提供し、ここで1つはリガンドのみにより見出される効果と同一であり、そして2つ目は、受容体インターナリゼーションを通してのトキシンの供給のためである。zcytor17受容体のリンパ及び単球制限された発現パターンは、リガンド-サポリン接合体が患者に耐性であることを示唆する。

【0253】

悪性腫瘍についての処理が異種骨髄又は幹細胞移植を包含する場合、zcytor17ligは、移植片-対-腫瘍効果の増強において価値ある。zcytor17ligは、骨髄前駆体からの溶解NK細胞の生成を刺激し、そして抗原受容体の活性化に続いて、単球及びマクロファージの増殖を刺激することができる。従って、患者が異種骨髄移植体を受ける場合、zcytor17ligは、ドナーリンパ球の注入を伴って又はそれを伴わないで、抗-腫瘍応答の生成を増強するであろう。

【0254】

所定のサイトカインのための受容体の組織分布は、そのサイトカインの作用の可能性ある部位の強い徴候を付与する。zcytor17の発現は単球及びB-細胞に見られ、そしてCD3+、CD4+及びCD8+ T-細胞のための活性化に基づいて発現の劇的な上昇が見られた。さらに、2種の単球細胞系、すなわちTHP-1 (Tsuchiyaなど., Int. J. Cancer 26: 171-176, 1980) 及びU937 (Sundstromなど., Int. J. Cancer 17: 565-577, 1996) は、zcytor17発現に関しては陽性であった。

【0255】

WSX-1受容体のノザン分析は、試験されるすべての組織において転写体を示し、そしてヒト脾臓、胸腺、リンパ節、骨髄及び末梢血液リンパ球において、発現の高められたレベルを有した。また、WSX-1の発現レベルは、T-細胞の活性かに基づいて上昇した。

OSMRの発現は、非常に広いことが報告されている（Mosleyなど., JBC271:32635-32643, 1996）。zcytor17, WXC-1及びOSMR β 受容体のこの分布は、免疫応答、特に活性化に基づいてのT細胞の拡張についての役割、又は免疫系の単球/マクロファージームにおける役割を支持する。

【0256】

従って、本発明の特定の態様は、炎症及びヒト疾病又は病状、例えば脾炎、I型糖尿病（IDDM）、脾臓癌、Graves病、炎症性腸疾患（IBD）、クローン病、結腸及び小腸癌、憩室症、自己免疫疾患、敗血症、器官又は骨髄移植；外傷、手術又は感染による炎症；アミロイドーシス；巨脾腫；対宿主性移植片病において；及び炎症の阻害、免疫抑制、造血、免疫、炎症又はリンパ細胞、マクロファージ、T-細胞（Th1及びTh2細胞、CD4⁺及びCD8⁺細胞）の増殖の低下、病原体又は抗原に対する免疫応答の抑制の場合、アンタゴニストとしての可溶性zcytor17/WSX-1/OSMR β 及びzcytor17/OSMR β ヘテロダイマーの使用に向けられる。

【0257】

さらに、活性化された免疫細胞、例えば活性化されたCD4⁺及びCD19⁺細胞におけるzcytor17発現の存在は、zcytor17受容体が、外来性侵入体、例えば微生物及び細胞残骸に対する身体の免疫防御反応に包含され、そして炎症及び癌形成の間、免疫応答において役割を演じることができたことを示した。zcytor17機能に対して作用性又は拮抗性である本発明の抗体及び結合パートナー、例えばzcytor17ligは、免疫応答及び炎症を改良するために使用され得る。

【0258】

zcytor17lig構造及び組織発現は、初期造血又は胸腺細胞発生及び免疫応答調節又は炎症において役割を演じることができる。それらの工程は、1又は複数のサイトカインのそれらの同種受容体への結合に応答しての細胞増殖及び分化の刺激を包含する。このzcytor17ligに関して観察される組織分布の観点から、アゴニスト（天然の受容体を包含する）及びアンタゴニストは、インビトロ及びインビボ用途において莫大な可能性を有する。zcytor17ligアゴニストに同定される化合物は、インビトロ及びインビボで、標的細胞の増殖及び進化を刺激するために有用である。

【0259】

例えば、アゴニスト化合物、zcytor17lig、又は抗-zcytor17lig抗体は、定義された細胞培養培地の成分として有用であり、そして細胞培養において通常使用される血清を置換するために、単独で又は他のサイトカイン及びホルモンと組合して使用され得る。従って、アゴニストは、T-細胞、B-細胞、及びリンパ球及び骨髄性系の他の細胞、及び培養における造血細胞の増殖及び/又は進化又は活性化を特別に促進することにおいて有用である。

【0260】

zcytor17ligは、細胞-介在性免疫性の刺激において、及びリンパ球増殖の刺激のために、例えば免疫抑制に関与する感染、例えば一定のウィルス感染の処理の研究への使用において有用である。追加の使用は、悪性形質転換が抗原性である腫瘍細胞をもたらす、腫瘍抑制のためのマウスモデルへの使用を包含する。zcytor17ligは、エフェクター細胞、例えばT-細胞、NK（天然のキラー）細胞又はLAK（リンパ性の活性化されたキラー）細胞の活性化を通して介在され得るか、又はアポトシス経路を通して直接的に誘発され得る、細胞毒性を誘発するために使用され得る。zcytor17ligはまた、影響された細胞型のレベルを高めることによって白血球減少の処理において、及び骨髄移植の後、T-細胞レパトリの再生の増強のために、又は単球増殖又は活性化のために、及び本明細書に記載される診断および他の使用のために有用である。

【0261】

zcytor17ligは、免疫系の抑制、例えば自己免疫疾患、例えばリュウマチ様関節炎、多発性硬化症、真性糖尿病、炎症性腫疾患、クローン病、等の処理に使用され得る。免疫抑制はまた、組織又は器官移植の拒絶を低めるために、及び影響された細胞型の増殖を阻害することによってT-細胞、B-細胞又は単球特異的の白血病又はリンパ腫、及び他の免疫細胞癌を処理するためにも使用され得る。さらに、zcytor17ligが、単球、マクロファージ及び活性化されたT-細胞を検出するために、及びそのような自己免疫疾患、特に単球が高められるか又は活性化される疾病状態の診断を助けるために使用され得る。

【0262】

zcytor17ligポリペプチド、ペプチド、抗体及び同様のものはまた、zcytor17ligの循環レベルの検出のための診断システムにも使用され得る。関連する状態においては、zcytor17ligポリペプチドに特異的に結合する抗体又は他の剤は、循環zcytor17ligポリペプチドを検出するために使用され得る。高められたレベルか又は低められたレベルのリガンド又は受容体ポリペプチドは、病理学的状態、例えば癌の表示であり得る。zcytor17ligポリペプチドは、病理学的工程に寄与し、そして基礎をなす疫病の間接的マーカーであり得る。

【0263】

また、zcytor17ligは、一定の疾病状態におけるその受容体を検出するか、又は標的化するために使用され得る。例えば、ヒト血清における高められたレベルの可溶性IL-2は、広範囲の炎症及び腫瘍性状態、例えば心筋梗塞、ぜん息、重症筋無力症、リュウマチ様関節炎、急性T-細胞白血病、B-細胞リンパ腫、慢性リンパ性白血病、結腸癌、乳癌及び卵巣癌に関連している(Heaneyなど., Blood 87: 847-857, 1996)。同様に、zcytor17は、活性化された単球において高められ、そして従って、zcytor17及び/又はその可溶性受容体は、炎症及びそれに関連する新生状態についてのマーカーにより結合されるか又はそれらとして作用することができる。細胞毒性接合体を包含するzcytor17ligは、そのような組織及び疾病状態を検出するか、又は標的化するために使用され得る。

【0264】

本発明の分子は、免疫系の単級/マクロファージアームに特に使用される。そのような活性を評価する方法は知られている。たとえば、インターフェロン γ (IFN- γ) は、単核食細胞の有能な活性化因子である。例えば、インターフェロン γ によるTHP-1細胞(ATCC No. TIB-202)の活性化に基づいてのzcytor17の発現の上昇は、この受容体が単球活性化に包含されることを示唆する。単球は、それらが成熟し、そしてマクロファージによる種々の組織に移動する不完全に分化された細胞である。

【0265】

マクロファージは、リンパ球に対する抗原を提供することによって免疫応答における中心的役割を演じ、そして多くのサイトカインを分泌することによってリンパ球に対する補助細胞として補助的役割を演じる。マクロファージは、細胞外分子をインターナライズすることができ、そして活性化に基づいて、細胞内微生物及び腫瘍細胞を殺害する高められた能力を有する。活性化されたマクロファージはまた、急性又は局部炎症を刺激することにおいても包含される。さらに、単球-マクロファージ機能は、種々の疾病状態において異常であることが示されている。例えば、Johnston, RB, New Eng. J. Med. 318: 747-752, 1998を参照のこと。

【0266】

当業者は、zcytor17受容体のアゴニスト、例えばzcytor17ligが有用であることを認識するであろう。例えば、単球の抑制された移動が、感染の素因を有する集団、例えば新生児、コルチコステロイド又は他の免疫抑制治療を受ける患者、及び真性糖尿病、熱傷又はAIDSを有する患者において報告されている。zcytor17のアゴニスト、例えばzcytor17ligは、それらの集団において感染を移動し、そしてたぶん妨げる単球の能力の上昇をもたらすことができた。慢性肉芽腫の疾患を有する患者からの単核食細胞による食細胞性殺害の根深い欠陥がまた存在する。これは、皮下膿瘍、及び肝臓、肺、脾臓及びリンパ節にお

る膿瘍の形成をもたらず。zcytor17受容体のアゴニスト、例えばzcytor17ligは、この食細胞欠陥を補正し、又は改良することができた。

【0267】

さらに、欠陥性単球細胞毒性が、癌及びWiskott-Aldrich症候群（湿疹、血小板減少症及び再発性感染）を有する患者において報告されている。zcytor17受容体のアゴニスト、例えばzcytor17ligによる単球の活性化は、それらの状態の処理を助けることができる。単球-マクロファージシステムは、いくつかの脂質-貯蔵疾患（スフィンゴリピドーシス）、例えばGaucher's病に優先的に包含される。感染に対する耐性は、zcytor17受容体のアゴニスト、例えばzcytor17ligにより処理され得る、マクロファージ機能の欠陥のために、低められ得る。

10

【0268】

さらに、当業者は、zcytor17ligのアンタゴニストが有用であることを認識するであろう。例えば、アテローム硬化症性病変においては、最初の異常性の1つは、内皮細胞への単球/マクロファージの局在化である。それらの病変は、zcytor17ligに対するアンタゴニストの使用により妨げられ得る。抗-zcytor17lig抗体（例えば、zcytor17lig中和抗体）、zcytor17可溶性受容体、ヘテロダイマー及びマルチマー、及びzcytor17lig結合パートナーはまた、zcytor17ligに対するアンタゴニストとしても使用され得る。

【0269】

さらに、単芽球性白血病は、マクロファージの生物学的生成物の開放に影響を及ぼす種々の臨床学的異常性により結合され、それらの例としては、血清及び尿における高レベルのリゾチーム及び高熱を包含する。さらに、そのような白血病は、単球細胞の異常上昇を示す。それらの効果は、たぶん、本明細書に記載されるような、zcytor17ligに対するアンタゴニストにより妨げられる。さらに、抗-zcytor17ligは、白血病単球細胞の殺害を方向づけるために、本明細書に記載されるように、分子、例えば、毒性分子及びサイトカインに接合され得る。

20

【0270】

当業界において知られており、そして本明細書に開示される方法を用いて、当業者は、本明細書に開示される疾病状態、例えば炎症、免疫（自己免疫）、癌又は感染、並びに単球細胞を包含する他の疾病状態におけるzcytor17ligアゴニスト及びアンタゴニストの活性を容易に評価することができた。さらに、zcytor17ligはT-細胞、マクロファージ及び単核-特異的態様で発現され、そしてそれらの疾病が単球細胞の異常性、例えば細胞増殖、機能、局在化及び活性化を包含するので、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド及び抗体は、そのような単球細胞異常性を検出し、そして疾病の存在を示すための特徴として使用され得る。そのような方法は、患者から生物学的サンプル、例えば血液、唾液又は生検を取り、採取し、そしてそれと正常な対照サンプルとを比較することを包含する。

30

【0271】

組織学的、細胞学的、流動細胞計測性、生化学的及び他の方法が、zcytor17ligの相対的レベル又は局在化、又はzcytor17ligを発現する細胞を測定するために使用され得、すなわち患者サンプルにおける単球が正常対照に比較される。対照と比較しての、zcytor17lig発現のレベル（上昇又は下降）の変化、又は単球の数又は局在化の変化（例えば、それらが正常に存在しない組織における単球細胞の上昇又は浸潤）が、疾病の表示である。そのような診断方法はまた、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド又は抗体に結合される放射分析、蛍光及び比色標識の使用を包含することができる。そのような方法は、当業者において良く知られており、そして本明細書に開示される。

40

【0272】

zcytor17lig活性を有するアミノ酸配列は、zcytor17受容体を結合し、そして従って、内因性zcytor17lig受容体によるzcytor17ligの結合を妨げることによって免疫系を調節するために使用され得る。zcytor17ligアンタゴニスト、例えば抗-zcytor17lig抗体はまた、内因性zcytor17lig受容体によるzcytor17ligの結合を阻害することによって免疫系を調節するために使用され得る。従って、本発明は、zcytor17lig活性を有する、タンパク質

50

、ポリペプチド及びペプチド（例えば、zcytor17ligポリペプチド、zcytor17lig類似体（例えば、抗-zcytor17lig 抗-イディオタイプ抗体）、及びzcytor17lig融合体タンパク質）の、適切な量のこのポリペプチドを欠いているか、又は過剰のzcytor17含有受容体を生成する対象への使用を包含する。zcytor17アンタゴニスト（例えば、抗-zcytor17後退）はまた、過剰のzcytor17lig又はzcytor17含有受容体を生成する対象を処理するためにも使用される。適切な対象は、哺乳類、例えばヒトを包含する。

【0273】

zcytor17ligは、活性化された単核細胞において発現されることが示されており、そして炎症の調節に包含され得る。本発明のポリペプチドは、アッセイされ、そして炎症を改良するために使用され得るか、又は炎症のためのマーカーとして使用され得る。zcytor17の前炎症及び抗炎症性質を決定するための方法は、当業界において知られており、そして本明細書に論じられる。さらに、それは、急性相反応体、例えば血清アミロイドA（SAA）、 $\alpha 1$ -アンチキモトリプシン及びハプトグロビンの生成のアップレギュレーションに包含され得る。そしてzcytor17リガンドの発現は、炎症応答に関与するインビボでのリポ多糖（LPS）の注入に基づいて高められ得る（Dumoutier, L. など., Proc. Nat'l. Acad. Sci. 97: 10144-10149, 2000）。

【0274】

急性相タンパク質、例えばSAAの生成は、炎症が有益である短期生存機構であると思われるが、しかしながら、長い期間、急性相タンパク質の維持が、慢性炎症に寄与し、そしてヒト健康に対して有害であり得る。再考のためには、Uhlar, Cm and Whitehead, AS, Eur. J. Biochem. 265: 501-523, 1999, 及びBaumann H, and Gauldie, J. Immunology Today 15: 74-80, 1994を参照のこと。さらに、急性相タンパク質SAAは、いくつかの慢性炎症患者の病因に関係し、アテローム硬化症及びリウマチ様関節炎に関与し、そしてアミロイド症において沈着するアミロイドAタンパク質への前駆体である（Uhlar, CM and Whitehead, 前記）。従って、zcytor17ligのためのリガンドが、前炎症性分子として作用し、そしてSAAの生成を誘発する場合、アンタゴニストが、炎症性疾患、及びリガンドにより誘発される急性相応答タンパク質に関連する他の疾病の処理において有用であろう。そのようなアンタゴニストが、本発明により提供される。

【0275】

例えば、炎症を減じるための方法は、炎症を低めるのに十分な量の、zcytor17lig、又は抗-zcytor17lig抗体（例えば、中和抗体）の組成物を、炎症を有するか、又はそれを進行する危険性の哺乳類に投与することを含んで成る。さらに、炎症を有する哺乳類における炎症応答を抑制するための方法は、（1）血清アミロイドAタンパク質のレベルを決定し；（2）許容できる医薬キャリアー中、本明細書に記載されるようなzcytor17ligポリペプチド、又は抗-zcytor17lig抗体を含んで成る組成物を投与し；（3）血清アミロイドAタンパク質の後投与レベルを決定し；（4）段階（3）における血清アミロイドAタンパク質のレベルに、段階（1）における血清アミロイドAタンパク質のレベルを比較することを含んで成り、ここで血清アミロイドAタンパク質の上昇又は下降の欠失が炎症応答の抑制の表示である。

【0276】

本発明のzcytor17ligを結合する受容体は、少なくとも1つのzcytor17受容体サブユニットを含む。ヘテロダイマー可溶性受容体に含まれる第2受容体ポリペプチドは、クラスIサイトカイン受容体サブユニット及びより特異的には、OSMR β 及びWSX-1を含む受容体サブファミリーに属する。本発明によれば、モノマー又はヘテロダイマーzcytor17受容体ポリペプチドの他に、可溶性zcytor17受容体+可溶性クラスI受容体ヘテロダイマー成分、例えばOSMR β 又はWSX-1を含んで成る、1つの態様により例示されるようなヘテロダイマー可溶性zcytor17受容体は、zcytor17ligのアンタゴニストとして作用することができる。他の態様は、zcytor17, 例えばzcyator17受容体+可溶性クラスI受容体マルチマー成分、例えばOSMR β 及びWSX-1を含んで成る可溶性マルチマー受容体を包含する。

【0277】

zcytor17lig のように、そのzcytor17 cDNAに対応するmRNAの組織分布の分析は、mRNA レベルが単球及び前立腺細胞において最高であり、そして活性化された単球、及び活性化されたCD4⁺、CD8⁺及びCD3⁺細胞において高められることを示した。従って、zcytor17受容体は、炎症及び免疫応答の誘発に包含される。従って、本発明の特定の態様は、炎症及びヒト疾病又は病状、例えば膵炎、I型糖尿病（IDDM）、膵臓癌、Graves病、炎症性腸疾患（IBD）、クローン病、結腸及び小腸癌、憩室症、自己免疫疾患、敗血症、器官又は骨髄移植；外傷、手術又は感染による炎症；アミロイドーシス；巨脾腫；対宿主性移植片病において；及び炎症の阻害、免疫抑制、造血、免疫、炎症又はリンパ細胞、マクロファージ、T-細胞（Th1及びTh2細胞、CD4⁺及びCD8⁺細胞）の増殖の低下、病原体又は抗原に対する免疫応答の抑制の場合、アンタゴニストとしてのzcytor17lig-抗体及びzcytor17lig、並びに可溶性zcytor17受容体ヘテロダイマーの使用に向けられる。

10

【0278】

さらに、活性化された免疫細胞、例えば活性化されたCD4⁺及びCD19⁺細胞におけるzcytor17受容体及びzcytor17lig発現の存在は、zcytor17受容体が、外来性侵入体、例えば微生物及び細胞残骸に対する身体の免疫防御反応に包含され、そして炎症及び癌形成の間、免疫応答において役割を演じることができたことを示した。zcytor17受容体機能に対して作用性又は拮抗性である本発明のzcytor17lig及びzcytor17lig-抗体は、免疫応答及び炎症を改良するために使用され得る。

【0279】

さらに、zcytor17受容体ポリペプチド及びそれに対する抗体を結合するzcytor17受容体ポリペプチドは、次のことを実施するために有用である：

20

1) 急性炎症、外傷、組織損傷、手術、敗血症又は感染の結果としての炎症、及び慢性炎症疾患、例えばぜん息、炎症性腸疾患（IBD）、慢性大腸炎、巨脾腫、リウマチ様関節炎、再発性急性炎症性エピソード（例えば、結核）、及びアミロイドーシス及びアラローム硬化症、Castleman病、ぜん息、及び急性相応答の誘発に関連する他の疾病の処理においてzcytor17-含有受容体を通してのシグナル化を拮抗するか又は阻止するために；

【0280】

2) zcytor17受容体を通して免疫細胞（例えば、リンパ球、単球、白血球）におけるシグナル化を妨げるか又は阻害するために、自己免疫疾患、例えばIDDM、多発性硬化症（MS）、全身性エリテマトーデス（SLE）、重症筋無力症、リウマチ様関節炎及びIBDの処理においてzcytor17受容体を通してのシグナル化を拮抗するか又は阻害するために（Hughes C など., J. Immunol. 153: 3319-3325, 1994）；他方では、抗体、例えばzcytor17ligに対するモノクローナル抗体（MAb）はまた、自己免疫疾患を処理するために所望しない免疫細胞を消耗するためのアンタゴニストとしても使用され得る。ぜん息、アレルギー及び他のアトピー性疾患は、免疫応答を阻害するか又は攻撃性細胞を消耗するために、例えば抗-zcytor17lig抗体、可溶性zcytor17受容体、又はzcytor17/CRF2-4ヘテロダイマーに対するMAbにより処理され得る。

30

【0281】

本発明のポリペプチド及び抗体を用いて、zcytor17を通してシグナル化を阻止し、又は阻害することはまた、膵臓、肝臓及びニューロン細胞の疾病を治療することができる。IDDM、NIDDM、膵炎及び膵癌のためにも有益であり得る。zcytor17は、拮抗性MAbが癌増殖を阻害し、そして免疫介在性殺害を標的化する、癌のMAb治療のための標的物として作用することができる（Holliger P. and Hoogenboom, H: Nature Biotech. 16: 1015-1016, 1998）。可溶性zcytor17モノマー、ホモダイマー、ヘテロダイマー及びマルチマーに対するMAbはまた、腎症、糸球体硬化症、膜ニューロパシー、アミロイドーシス（他の組織の中で腎臓に影響を及ぼす）、腎動脈硬化症、種々の起原の糸球体腎炎、腎臓の線維増殖疾患、及びSLE、IDDM、II型糖尿病（NIDDM）、腎腫瘍及び他の疾病に関連する腎機能不全を処理するためにも有用であり；

40

【0282】

3) 自己免疫疾患、例えばIDDM、MS、SLE、重症筋無力症、リウマチ様関節炎及びIBDの

50

処理においてzcytor17受容体を通してのシグナル化を作用するか又は開始するために；zcytor17ligは、分化するリンパ球又は他の免疫細胞をシグナル化し、増殖を変更し、又は自己免疫性を改良する、サイトカイン又は細胞表面タンパク質の生成を変えることができる。特に、サイトカイン分泌の他のパターンに対するT-ヘルパー細胞応答の調節が、疾病を改善するために自己免疫応答を偏向することができる（Smith SAなど., J. Immunol. 160: 4841-4849, 1998）。

【0283】

同様にzcytor17ligは、ぜん息、アレルギー及びアトピー性疾患に関与する免疫細胞を表示し、消耗し、そして偏向するために使用され得る。zcytor17受容体によるシグナル化はまた、膵臓、腎臓、下垂体及びニューロン細胞の疾病に有益であり得る。IDDM、NIDDM、膵癌のために有益であり得る。zcytor17は、シグナル化MAbが癌増殖を阻害し、そして免疫介在性殺害を標的化する、膵臓のMAb治療のための標的物として作用することができる（Tutt, ALなど., J. Immunol. 161: 3175-3185, 1998）。同様に、T-細胞特異的白血病、リンパ腫、血漿細胞障害（たとえば多発性骨髄腫）、及び癌は、本発明のzcytor17含有の可溶性受容体に対するモノクローナル抗体（例えば、中和抗体）により処理され得る。

【0284】

本明細書に記載される抗-zcytor17lig抗体、可溶性zcytor17受容体モノマー、ホモダイマー、ヘテロダイマー及びマルチマーポリペプチドは、上記に記載されるような自己免疫疾患、アトピー性疾患、NIDDM、膵炎及び腎機能不全の処理においてzcytor17受容体リガンド活性を中和するか、又は阻止するために使用され得る。可溶性形のzcytor17は、T細胞により介在される抗体応答を促進するために、及び/又はリンパ球又は他の免疫細胞によるIL-4又は他のサイトカインの生成を促進するために使用され得る。

【0285】

抗-zcytor17lig抗体、及び可溶性zcytor17含有受容体は、zcytor17ligのアンタゴニストとして有用である。そのようなアンタゴニスト効果は、直接的な中和又はその天然のリガンドの結合により達成され得る。アンタゴニスト使用の他に、可溶性受容体は、zcytor17ligを結合し、そしてそのzcytor17ligを身体内の異なった組織、器官及び細胞に輸送するために、キャリアー又はビークルタンパク質として作用することができる。

【0286】

本発明の可溶性受容体は、特定の部位、例えば組織、特定の免疫細胞、単球又は腫瘍に可溶性受容体-リガンド複合体を方向づける、分子、ポリペプチド又は化学的成分に融合されるか又はカップリングされ得る。例えば、急性感染又はいくつかの癌においては、有益性は、炎症及び局部急性相応答タンパク質の誘発に起因することができる。従って、本明細書に記載される可溶性受容体又は本発明の抗体は、前炎症性zcytor17ligリガンドの作用を特異的に方向づけるために使用され得る。Cosman, D. Cytokine 5: 95-106, 1993; 及びFernandez-Botran, R. Exp. Opin. Invest. Drugs 9: 497-513, 2000を参照のこと。

【0287】

さらに、可溶性受容体は、分解又はクリアランスからリガンドを安定化するか、又は身体内の作用の部位にリガンドを標的化することによって、リガンドの生物利用性及び/又は治療効力を高めるために、zcytor17ligの安定化のために使用され得る。例えば、天然に存在するIL-6/可溶性IL-6R複合体は、IL-6を安定化し、そしてgp130受容体を通してシグナル化することができる。Cosman, D. 前記及びFernandez-Botran, R. 前記を参照のこと。さらに、zcytor17は、リガンド/可溶性受容体複合体を含むよう、同種リガンド、例えばそのリガンドと共に組合され得る。そのような複合体は、コンパニオン受容体サブユニットを提供する細胞からの応答を刺激するために使用され得る。

【0288】

zcytor17受容体/zcytor17lig複合体の細胞特異性は、単独で投与されるリガンドについて見られるその特異性とは異なる。さらに、前記複合体は、異なった薬力学的性質、例え

ば影響を及ぼす半減期、用量/応答性及び器官又は組織特異性を有する。従って、zcytor17 / リガンド複合体は、免疫応答を増強し、又は糸球体間質細胞又は肝細胞を刺激するためにアゴニスト活性を有することができる。他方では、IL6/IL6R複合体に対する応答に類似する複合体とヘテロダイマー化するシグナル化サブユニットを発現する組織のみが、影響され得る (Hirota H. など., Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 4862-4866, 1995; Hirano, T. in Thamsan, A. (ED.) "The Cytokine Handbook", 3rd ED., p. 248-209)。IL12 及びCNTFのための可溶性受容体/サイトカイン複合体は、類似する活性を示す。

【0289】

zcytor17ligはまた、リガンドの循環レベルの検出のために、及び急性相炎症応答の検出において、診断システム内で使用され得る。関連する態様においては、zcytor17ligに特異的に結合する抗体又は他の剤は、循環性zcytor17ligポリペプチドを検出するために使用され得；逆に言えば、zcytor17lig自体が、循環性又は局部的に作用するリガンドポリペプチドを検出するために使用され得る。リガンド又は受容体ポリペプチドの高められた又は低められたレベルが、炎症又は癌を包含する病理学的状態の表示であり得る。さらに、急性相タンパク質又は分子、例えばzcytor17ligの検出は、一定の疾病状態（例えば、リウマチ様、関節炎）における慢性炎症状態の表示であり得る。そのような状態の検出は、疾病診断を助け、そして正しい治療の医者による選択を助けるよう作用する。

【0290】

本発明のポリペプチド及びタンパク質はまた、エクスピボ、例えば自己由来の骨髓培養物においても使用され得る。手短に言及すれば、骨髓が、化学治療又は器官移植の前、患者から除去され、そして任意には、1又は複数の他のサイトカインと組合して、zcytor17ligにより処理される。次に、処理された骨髓が、骨髓の回復を早めるために化学治療の後、又は移植片対一宿主疾病を抑制するために移植の後、患者に戻される。さらに、本発明のタンパク質はまた、骨髓又は末梢血液前駆体 (PBPC) 細胞のエクスピボ拡張のために使用され得る。処理の前、骨髓が、末梢循環中に初期前駆体細胞を解放するために、幹細胞因子 (SCF) により刺激され得る。それらの前駆体が、末梢血液から集められ、そして濃縮され、そして次に、培養において、任意には、1又は複数の他のサイトカイン、例えばSCF, IL-2, IL-4, IL-7, Lif, IL-3, IL-12, IL-21又はIL-15と組合して、zcytor17ligにより処理され、分化され、そして高密度リンパ球培養物中に増殖され、次に、化学治療又は移植に続いて、患者に戻され得る。

【0291】

本発明は、zcytor17ligの不在下で培養される骨髓又は末梢血液細胞に比較して、骨髓又は末梢血液細胞におけるリンパ球の数を高めるために十分な量のzcytor17ligを含んで成る組成物と共に、骨髓又は末梢血液細胞を培養することを含んで成る、造血細胞及び造血細胞前駆体の拡張方法を提供する。他の態様においては、造血細胞及び造血前駆体細胞は、リンパ球細胞である。もう1つの態様においては、リンパ球細胞はNK細胞又は細胞毒性T細胞である。さらに、前記組成物はまた、IL-2, IL-15, IL-4, Lif, IL-3, IL-12, IL-21, GM-CSF, Flt3リガンド及び幹細胞因子から成る群から選択された少なくとも1つの他のサイトカインを含んで成る。

【0292】

他方では、zcytor17ligは、感染性疾病に対する免疫性を高めることにおいて、免疫無防備状態の患者、例えばHIV+患者の処理において、又はワクチンを改良することにおいて重要である免疫系を活性化することができる。特に、単球/マクロファージ、T-細胞、B-細胞、NK細胞又はそれらの前駆体のzcytor17lig刺激又は拡張は、ウィルス感染の処理において治療的価値を、及び抗一腫瘍因子として提供する。同様に、ウィルス及び非ウィルス病原剤（例えば、細菌、原生動物及び菌類）に対する免疫応答のzcytor17lig刺激は、そのような感染剤の増殖を阻害することによって、そのような感染の処理において治療価値を提供するであろう。身体に存在する病原体又は抗原、例えば腫瘍細胞のレベルの直接的又は間接的決定は、当業界において知られており、そして本明細書に記載される多くの方法により達成され得る。

【0293】

本発明は、抗原又は病原体に暴露される哺乳類における免疫応答を刺激するための方法を提供し、ここで前記方法は、(1) 前記哺乳類に存在する抗原又は病原体のレベルを直接的又は間接的に決し；(2) 医薬的に許容できるピークルにおけるzcytor17ligポリペプチドを含んで成る組成物を投与し；(3) 前記哺乳類に存在する抗原又は病原体のレベルを直接的又は間接的に決し；そして(4) 段階3における抗原又は病原体レベルに、段階1における抗原又は抗原レベルを比較し、ここで前記レベルの変化が免疫応答の刺激の表示である段階を含んで成る。もう1つの態様においては、前記zcytor17lig組成物は、再投与される。他の態様においては、抗原はB細胞腫瘍；ウィルス；寄生体又は細菌である。

10

【0294】

もう1つの観点において、本発明は抗原又は病原体に暴露される哺乳類における免疫応答を刺激するための方法を提供し、ここで前記方法は、(1) 抗原—又は病原体—特異的抗体のレベルを決定し；(2) 許容できる医薬キャリアーにzcytor17ligポリペプチドを含んで成る組成物を投与し；そして(3) 抗原—又は病原体—特異的抗体の後投与レベルを決定し；(4) 段階(3)における抗体のレベルに、段階(1)における抗体のレベルを比較し、ここで抗体レベルの上昇が免疫応答の刺激の表示であることを含んで成る。

【0295】

zcytor17ligポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、zcytor17lig活性を高め、又は阻害することが所望される遺伝子治療用途内で有用である。哺乳類が突然変異誘発されたzcytor17lig遺伝子を有するか、又はそれを欠いている場合、zcytor17lig遺伝子が哺乳類の細胞中に導入され得る。1つの態様においては、zcytor17ligポリペプチドをコードする遺伝子がウィルスベクターにおいてインビボで導入される。そのようなベクターは、弱毒化された又は欠陥DNAウィルス、例えばヘルペス単純ウィルス(HSV)、乳頭種ウィルス、エプスタインバーウイルス(EBV)、アデノウィルス、アデノ関連ウィルス(AAV)及び同様のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない。

20

【0296】

ウィルス遺伝子を完全に又はほとんど完全に欠いている欠陥ウィルスが好ましい。欠陥ウィルスは、細胞中への導入の後、感染性ではない。欠陥ウィルスベクターの使用は、ベクターが他の細胞を感染することを心配しないで、特定の局在化された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は、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：欠陥ヘルペスウィルス1(HSV1)ベクター (Kaplitt など., Mol. Cell. Neurosci. 2: 320-30, 1991)、弱毒化されたアデノウィルス ベクター、例えばStratford-Perricaudat など. (J. Clin. Invest. 90: 626-30, 1992) により記載されるベクター、及び欠陥アデノ関連ウィルスベクター (Samulski など., J. Virol. 61: 3096-101, 1987; Samulski など., J. Virol. 63: 3822-28, 1989)。

30

【0297】

zcytor17lig遺伝子は、次の文献に記載のようにして、レトロウィルスベクターに導入され得る：Anderson など., アメリカ特許第5,399,346号；Mann など., Cell 33: 153, 1983；Temin など., アメリカ特許第4,650,764号；Temin など., アメリカ特許第4,980,289号；Markowitz など., J. Virol. 62: 1120, 1988；Temin など., アメリカ特許第5,124,263号；Dougherty など., WIP0 Publication W095/07358号；及びkuo など., Blood 82: 845-52, 1993。他方では、ベクターは、リボソームを用いてのインビボリポフェクションにより導入され得る。合成カチオン脂質が、マーカーをコードする遺伝子のインビボトランスフェクションのためのリボソームを調製するために使用され得る (Felgner など., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-17, 1987；及びMackey など., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8027-31, 1988)。

40

【0298】

インビボで特定の器官中に外因遺伝子を導入するためへのリポフェクションの使用は、一定の実際的な利点を有する。特定細胞へのリボソームの分子標的化は、1つの領域の利

50

点を表す。より特定には、特定細胞へのトランスフェクションの方向づけは、1つの有益な分野を提供する。例えば、特定細胞型へのトランスフェクションの方向づけが、細胞異質性を有する組織、例えば脾臓、肝臓、腎臓及び脳において特に好都合であることは明白である。脂質は、標的化のために他の分子に科学的に得られる。標的化されたペプチド、例えばホルモン又は神経伝達物質、及びタンパク質、例えば抗体又は非ペプチド分子は、化学的にリポソームに結合され得る。

【0299】

身体から細胞を除去し、そして裸DNAプラスミドとしてベクターを導入し、そして次に、身体中に形質転換された細胞を再移植することは可能である。遺伝子治療のための裸DNAベクターは、所望する宿主細胞中に、当業界において知られている方法、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、トランスダクション、細胞融合、DEAEデキストラン、リン酸カルシウム沈殿、遺伝子ガンの使用、又はDNAベクタートランスポートの使用により導入され得る（例えば、Wu など., J. Biol. Chem. 267: 963-7, 1992; Wu など., J. Biol. Chem. 263: 14621-24, 1988）。

【0300】

アンチセンス方法は、zcytor17lig遺伝子転写を阻害するために、例えばインビボでの細胞増殖を阻害するために使用され得る。zcytor17ligコードのポリヌクレオチドのセグメントに対して相補的であるポリヌクレオチド（例えば、配列番号1に示されるようなポリヌクレオチド）は、zcytor17ligコードのmRNAに結合し、そしてそのようなmRNAの翻訳を阻害するよう企画される。そのようなアンチセンスポリヌクレオチドは、細胞培養物、又は対象において、zcytor17ligポリペプチドコードの遺伝子の発現を阻害するために使用される。

【0301】

“トランスジェニックマウス”として言及される、zcytor17lig遺伝子を発現するように構築されたマウス、及び“ノックアウトマウス”として言及される、zcytor17lig遺伝子機能の完全な不在を示すマウスがまた、生成され得る（Snouwaertなど., Science 257: 1083, 1992; Lowellなど., Nature 366: 740-742, 1993; Capecchi, Science 244: 1288-1292, 1989; Palmiterなど., Annu. Rev. Genet. 20: 465-499, 1986）。例えば、偏在的に、又は組織一特異的又は組織一制限されたプロモーター下でzcytor17ligを過剰発現するトランスジェニックマウスは、過剰発現が表現型を引き起こすかどうかを決定するために使用され得る。

【0302】

例えば、野生型zcytor17ligポリペプチド、そのポリペプチドフラグメント又は変異体の過剰発現は、正常な細胞工程を変更することができ、zcytor17lig発現が機能的に適切であり、そしてzcytor17lig、そのアゴニスト又はアンタゴニストのための治療標的物を示すことができる組織を同定する表現型をもたらす。例えば、構築する好ましいトランスジェニックマウスは、zcytor17lig（配列番号2のアミノ酸残基23~164；又は配列番号11の24~163）を過剰発現するマウスである。さらに、そのような過剰発現は、ヒト疾病との類似性を示す表現型をもたらすことができる。同様に、ノックアウトzcytor17ligマウスは、zcytor17ligがインビボで絶対的に必要とされる場所を決定するために使用され得る。ノックアウトマウスの表現型は、zcytor17ligアンタゴニスト、例えば可溶性zcytor17マルチマーサイトカイン受容体が有することができるインビボ効果を予測することができる。

【0303】

本明細書に記載されるヒト又はマウスzcytor17lig cDNAは、ノックアウトマウスを生成するために使用される。それらのマウスは、zcytor17lig遺伝子及びそれによりコードされるタンパク質をインビボシステムにおいて研究するために使用され得、そして対応するヒト疾病のためのインビボモデルとして使用され得る。さらに、本明細書に記載される、zcytor17ligに対して向けられた、zcytor17ligアンチセンスポリヌクレオチド又はリボザイムのトランスジェニックマウス発現がまた、上記トランスジェニックマウスと同じよう

にして使用され得る。研究は、精製されたzcytor17ligタンパク質の投与により行われ得る。

【0304】

実験的証拠は、皮膚又は内表面の上皮、例えば大腸、小腸、脾臓、肺、前立腺、子宮及び同様のものを包含する、疾病の進行におけるzcytor17ligについての役割を示す。最初に、本明細書に開示されるように、OSM受容体 β 及びzcytor17を包含するzcytor17受容体は、上皮細胞に位置するいくつかの細胞型、例えば肺上皮、肺線維芽細胞、前立腺、結腸、乳房、肺上皮、骨及び皮膚上皮、骨線維芽細胞及び同様のものに由来する細胞系において発現される。さらに、本明細書に開示されるように、それらの細胞型の個々からの例は、STATレポーター構造体のzcytor17lig活性化に応答した。さらに、いくつかの細胞系が、本明細書に記載されるような高められたレベルのIL-6、IL-8、MCP-1（走化性因子）を生成することによりzcytor17lig刺激に応答した。

10

【0305】

全体的に、それらのデータは、次の疾病におけるzcytor17ligについての役割を示す：アトピー性皮膚炎；皮膚炎；乾癬；乾癬性関節炎；湿疹；歯肉炎、歯周病；炎症性腸疾患（IBD）（例えば、潰瘍性大腸炎、クローン病）；生殖疾患、例えば子宮頸部形成異常、子宮頸部癌；他の皮膚病、例えば皮膚癌；肉腫、メラノーマ、等、すなわち免疫系が癌の活性化/治癒に関与するので、炎症性疾患ではない；バリア機能不全に関与する疾患、例えば対宿主性移植片病（GVHD）及び刺激性腸症候群（IBS）；及び肺皮膚に関与する疾病、及び喘息、気腫、及び同様のもの。さらに、zcytor17ligに暴露された細胞によるサイトカインIL-6、IL-8及びMCP-1の開放は、zcytor17ligが炎症に関与することを示唆する。

20

【0306】

従って、zcytor17ligの調節が、受容体を発現する組織に関連する、自己免疫性、炎症性又は癌性疾患の処理において有用である。それらの疾病は、例えば前立腺炎、肝炎、変形性関節炎及び同様のものを包含する。zcytor17ligは、それらの疾病を、陽性的に又は陰性的に、直接的に又は関節的に調節することができる。従って、zcytor17ligの投与は、zcytor17lig活性を阻害する分子、例えばzcytor17ligに対するモノクローナル抗体又はzcytor17に対するモノクローナル抗体、又はzcytor17及びOSM受容体 β 複合体を確認するモノクローナル抗体により、本明細書に記載されるような疾病を直接的に処理するために使用され得る。

30

【0307】

データはまた、zcytor17ligがTH2 T-細胞介在性疾病の調節に関与することを示唆する。第1に、zcytor17ligは、TH2サブセットの活性化されたT細胞により製造される。TH2細胞は、TH1細胞に比較して、より一層のzcytor17ligを発現する。さらに、少なくとも2種の肺上皮細胞系（SK-LU-1, A549）が、本明細書に記載されるようなzcytor17リガンド刺激に応答してIL-13受容体 $\alpha-2$ mRNAを高めるために刺激された。IL-13受容体の2鎖、及びヒト乳及び脾臓腫瘍形成の関連性が存在する。これは、zcytor17ligが、それらのタイプの癌、及び他の癌の腫瘍形成の調節において役割を演じることができることを示唆する。従って、zcytor17ligアンタゴニストの投与、又はzcytor17ligの直接的な使用は、それらのタイプの癌（良性又は悪性）の処理において、及び種々の等級（I-IV等級）及び段階（例えば、TNM又はAJC段階方法）の腫瘍進行で、哺乳類、好ましくはヒトにおいて有用であり得る。

40

【0308】

IL-13が活性化されたTH2細胞の生成に、及びTH2介在性疾病、例えば喘息、アトピー性皮膚炎、及び同様のものに関与することは、当業界において良く知られている。zcytor17lig又はzcytor17ligアンタゴニストは、TH2 T-細胞に関与する疾病の処理において有用である。これは、疾病、例えばアトピー性皮膚炎、喘息、及び活性化されたTH2細胞により悪化される他の疾病を包含する。疾病、例えばアトピー性皮膚炎へのzcytor17ligの関与がまた、zcytor17ligを過剰発現し、そして本明細書に記載されるようなアトピー性皮膚炎の症状を進行するトランスジェニックマウスの表現型によっても支持される。

50

【0309】

Zcytor17ligのTH2細胞による選択的発現にかかわらず、TH1細胞及びCD8+ T-細胞におけるzcytor17ligのいくらかの発現が存在する。従って、zcytor17lig又はそのアンタゴニストは、活性化されたT-細胞の免疫調節に関与する疾病、例えばウィルス感染、癌、移植変拒絶及び同様のものの処理において有用であり得る。

【0310】

zcytor17ligはまた、癌の進行にも関与している。ヒト骨線維芽細胞骨肉腫、ヒト皮膚線維芽細胞メラノーマ、結腸上皮癌、腺癌、乳房上皮腺癌、前立腺上皮腺肉腫、及び肺上皮腺肉腫及び癌におけるzcytor17及びOSM受容体β受容体の発現が存在する。従って、zcytor17lig、そのフラグメント又はzcytor17ligアンタゴニストのいずれかにより、上皮起源の腫瘍、例えば癌、腺癌及びメラノーマ（但し、それらだけには限定されない）を処理することが有用である。それにもかかわらず、zcytor17lig又はzcytor17ligアンタゴニストは、癌を処理するために、又は癌の1又は複数の症状を低めるために使用され得、ここで前記癌は、鱗状細胞又は類表皮癌、基底細胞癌、腺癌、乳頭腫、嚢胞腺癌、気管支原性癌、気管支腺癌、メラノーマ、腎細胞癌、肝細胞癌、移行細胞癌、繊毛癌、精上皮腫、胚癌、唾液腺起源の悪性混合腫瘍、Wilms腫瘍、未成熟奇形腫、奇形癌、及び上皮起源の少なくともいくらかの細胞を包含する他の主要を包含するが、但しそれらだけには限定されない。

【0311】

一般的に、投与されるzcytor17ligポリペプチド（又はzcytor17lig類似体又は融合タンパク質）の用量は、患者の年齢、体重、身長、性別、一般的な医学的状态及びこれまでの医学的歴史のような要因に依存して変化するであろう。典型的には、約1 pg/kg~10mg/kg（剤の量/患者の体重）の範囲でのzcytor17ligポリペプチドの用量（但し、それよりも低い又は高い用量もまた、環境が指図する場合、投与され得る）を、受容体に供給することが所望される。当業者は、当業界において知られている方法を用いて、そのような用量及びそれに対する調節を容易に決定することができる。

【0312】

zcytor17ligポリペプチドの対象への投与は、局部カテーテルを通しての灌流によるか又は直接的な病変内注入による、局部、吸入、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、胸膜内、鞘内投与であり得る。注射により治療用タンパク質を投与する場合、投与は連続的注入によるか、又は一回又は複数回のボラスによることができる。

【0313】

投与の追加経路は、経口、粘膜、肺及び経皮を包含する。経口供給は、ポリエステル微小球、ゼイン微小球、プロテイノイド微小球、ポリシアノアクリレート微小球及び脂質基剤システムのために適切である（例えば、DiBase and Morrel, "Oral Delivery of Microencapsulated Protein", in Protein Delivery: Physical Systems, Sanders and Hendren (eds.), p.255-288 (Plenum Press 1977) を参照のこと）。鼻腔内供給の実行可能性は、インスリン投与のそのような態様により例示される（例えば、Hinchcliffe and Illum, Adv. Drug Deliv. Rev. 35: 199 (1997) を参照のこと）。

【0314】

zcytor17ligを含んで成る乾燥又は液体粒子は、乾燥-粉末分散機、液体エーロゾル発生器又はネブライザーの助けにより調製され、そして吸入され得る（例えば、Pettit and Gombotz, TIBTECH 16: 343 (1998); Patton など., Adv. Drug Deliv. Rev. 35: 235 (1999) を参照のこと）。このアプローチは、エーロゾル化されたインスリンを肺に供給する電動吸入器であるAERX糖尿病治療システムにより例示される。研究によれば、48,000kDaほどの大きなタンパク質が、経皮投与の実行可能性を例示する、低周波超音波の助けにより治療濃度で皮膚を通して供給されることが示された（Mitragotriなど., Science 269: 850 (1995)）。エレクトロポレーションを用いての経皮供給は、zcytor17マルチマー受容体結合活性を有する分子を投与するもう1つの手段を提供する（Pottsなど., Pharm. Biotechnol. 10: 213 (1997)）。

【0315】

zcytor17lig結合活性を有するタンパク質、ポリペプチド又はヘプチドを含んで成る医薬組成物は、医薬的に有用な組成物を調製する既知の方法に従って配合され得、それによれば、治療用タンパク質が医薬的に許容できるキャリアーと共に混合される。組成物は、その投与が受容体患者により許容され得る場合、“医薬的に許容できるキャリアー”であると言われる。無菌リン酸緩衝溶液は、医薬的に許容できるキャリアーの1つの例である。他の適切なキャリアーは、当業者に良く知られている。例えば、Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Edition (Mack Publishing Company 1995) を参照のこと。

【0316】

10

治療のためには、zcytor17lig結合活性を有する分子及び医薬的に許容できるキャリアーが、治療的に有効な量で患者に投与される。zcytor17lig結合活性を有するタンパク質、ポリペプチド又はペプチド、及び医薬的に許容できキャリアーの組み合わせは、その投与される量が生理学的に有意である場合、“治療的に有効な量”で投与されると言われる。剤は、その存在が受容体患者の生理学において検出される変化をもたらす場合、生理学的に有意である。例えば、炎症を処理するために使用される剤は、その存在が炎症応答を緩和する場合、生理学的に有意である。

【0317】

zcytor17lig (又はzcytor17lig類似体又は融合タンパク質) を含んで成る医薬組成物は、液体形、エロゾル、又は固体形で維持され得る。液体形は、注射用溶液、エアロゾル、液滴、局部溶液及び経口懸濁液により例示される。典型的な固体形は、カプセル、錠剤及び調節された開放形を包含する。後者の形は、ミニ浸透ポンプ及び移植体により例示される (Bremer など., Pharm. Biotechnol. 10:239 (1997); Ranade, “Implants in Drug Delivery,” in Drug Delivery Systems, Ranade and Hollinger (eds.), pages 95-123 (CRC Press 1995); Bremer など., “Protein Delivery with Infusion Pumps,” in Protein Delivery: Physical Systems, Sanders and Hendren (eds.), Pages 239-254 (Plenum Press 1997); Yewey など., “Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant,” in Protein Delivery: Physical Systems, Sanders and Hendren (eds.), Pages 93-117 (Plenum Press 1997))。他の個体形は、クリーム、ペースト、他の局部適用、及び同様のものを包含する。

20

30

【0318】

リポソームは、治療用ポリペプチドを、患者に、静脈内、腹膜内、鞘内、筋肉内、皮下、又は経口、吸入又は鼻腔内供給するための1つの手段を提供する。リポソームは、水性区画を取り組む1又は複数の脂質二層から成る微小ビークルである (一般的には、Bakker Woudenberg など., Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12 (Suppl. 1): S61 (1993), Kim Drugs 46:618 (1993), and Ranade, “Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers,” in Drug Delivery Systems, Ranade and Hollinger (eds.), pages 3-24 (CRC Press 1995)を参照のこと)。

【0319】

リポソームは、組成において細胞膜に類似し、そして結果として、リポソームは安全に投与され、そして生分解性である。調製方法に依存して、リポソームは、単層又は多層性であり得、そしてリポソームは0.02 μm ~10 μm 以上の範囲の直径でサイズ的に変化することができる。種々の剤がリポソームに封入され得る：疎水性剤は二層に分割され、そして親水性剤は内部水性空間内に封入される (例えば、Mackay など., Liposomes In Cell Biology and Pharmacology (John Libbey 1987), 及びOstroなど., American J. Hosp. Pharm. 46: 1576 (1989) を参照のこと)。さらに、リポソームサイズ、二層の数、脂質組成、及びリポソームの電荷及び表面性質を変えることにより、封入される剤の治療利用性を調節することが可能である。

40

【0320】

リポソームは、実質的にいずれかのタイプの細胞に吸着することができ、そして次に、

50

封入された剤をゆっくりと開放する。他方では、吸収されたリポソームは、食細胞性である細胞によりエンドサイトーシス化され得る。エンドサイトーシスに続いて、リポソーム脂質のリソソーム内分解が伴ない、そして封入された剤が開放される (Scherphof など., Ann. N.Y. Acad. Sci. 446: 368 (1985))。静脈内投与の後、小さなリポソーム (0.1~1.0 μm) は、典型的には、肝臓及び脾臓に主として位置する網内細胞系の細胞により摂取されるが、ところが3.0 μm よりも大きなリポソームは肺に沈着される。網内細胞系の細胞による小さなリポソームのこの好ましい摂取は、マクロファージ及び肝臓の腫瘍に化学治療剤を供給するために使用されて来た。

【0321】

網内細胞系は、いくつかの方法、例えば多量のリポソーム粒子による飽和、又は薬理学的手段による選択的マクロファージ不活性化により回避され得る (Claassenなど., Biochim. Biophys. Acta 802: 428 (1984))。さらに、リポソーム膜中への糖脂質—又はポリエチレングリコール—誘導されたリン脂質の組み込みは、網内細胞系による有意に低められた摂取をもたらすことが示されている (Allen など., Biochim. Biophys. Acta 1068:133 (1991); Allen など., Biochim. Biophys. Acta 1150: 9 (1993))。

【0322】

リポソームはまた、リン脂質組成を変えることによって、又はリポソーム中に受容体又はリガンドを挿入することによって、特定の細胞又は器官を標的化するためにも調製され得る。例えば、高い含有率の非イオン性界面活性剤により調製されたリポソームが、肝臓を標的化するために使用されて来た (Hayakawaなど., 日本特許04-244,018号; Katoなど., Biol. Pharm. Bull. 16:960 (1993))。それらの配合物は、メタノールにおいて、大豆ホスファチジルコリン、 α -トコフェロール及びエトキシ化され、水素付加されたヒマシ油 (HCO-60) を混合し、前記混合物を真空下で濃縮し、そして次に、前記混合物を水により再構成することによって調製された。大豆由来のステリルグルコシド混合物 (SG) 及びコレステロール (Ch) と共にジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) のリポソーム配列物はまた、肝臓を標的化することが示されている (Shimizuなど., Biol. Pharm. Bull. 20:881 (1997))。

【0323】

他方では、種々の標的化リガンドが、リポソーム、例えば抗体、抗体フラグメント、炭水化物、ビタミン及び輸送タンパク質の表面に結合され得る。例えば、リポソームは、肝臓細胞の表面上で独占的に発現されるアシアログリコプロテイン (ガラクトース) 受容体標的化するために、枝分かれ型のガラクトシル脂質誘導体により変性され得る (Kato and Sugiyama, Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst. 14: 287 (1997); Murahashiなど., Biol. Pharm. Bull. 20:259 (1997))。同様に、Wuなど., Hepatology 27: 772 (1988) は、アシアロフェチュインによるリポソームのラベリングが短くされたリポソーム結晶半減期を導き、そしてアシアロフェチュイン—ラベルされたリポソームの肝細胞による摂取を非常に高めたことを示している。

【0324】

他方では、枝分かれ型のガラクトシル脂質誘導体を含んで成るリポソームの肝臓蓄積が、アシアロフェチュインの前注入により阻害され得る (Murahashiなど., Biol. Pharm. Bull. 20: 259 (1997))。ポリアコニチル化されたヒト血清アルブミンリポソームは、肝臓細胞へのリポソームの標的化のためのもう1つのアプローチを提供する (Kamps など., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 11681 (1997))。さらに、Gehoなど., (アメリカ特許第4,603,044号) は、肝臓の特殊化された代謝細胞に関連する肝胆管受容体に対する特異性を有する、肝細胞—指図されたリポソーム小胞供給システムを記載する。

【0325】

組織標的化へのより一般的なアプローチにおいては、標的細胞は、標的細胞により発現されるリガンドに対して特異的な、ビオチニル化された抗体によりブレラベルされる (Harasymなど., Adv. Drug Deliv. Rev. 32: 99 (1998))。遊離抗体の血漿排除の後、ストレプタビジン—接合されたリポソームが投与される。もう1つのアプローチにおいては、

10

20

30

40

50

標的化抗体は、リポソームに直接的に結合される (Harasymなど., Adv. Drug. Deliv. Rev. 32: 99 (1998))。

【0326】

zcytor17lig結合活性を有するポリペプチドは、タンパク質のマイクロカプセル封入の標準技法を用いて、リポソーム内に封入され得る (例えばAndersonなど., Infect. Immun. 31: 1099 (1981), Andersonなど., Cancer Res. 50: 1853 (1990), and Cobenなど., Biochim. Biophys. Acta 1063:95 (1991), Alving など., “Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies,” in Liposome Technology, 2nd Edition, Vol. III, Gregoriadis (ed.), page 317 (CRC Press 1993), Wassef など., Meth. Enzymol. 149: 124 (1987)を参照のこと)。上記に示されるように、治療的に有用なリポソームは、種々の成分を含むことができる。例えば、リポソームは、ポリ (エチレングリコール) の脂質誘導体を含むことができる (Allenなど., Biochim. Biophys. Acta 1150: 9 (1993))。

10

【0327】

分解性ポリマー微小球が、治療用タンパク質の高い全身レベルを維持するため企画された。微小球は、分解性ポリマー、例えばポリ (ラクチド-コ-グリコリド) (PLG)、ポリ無水物、ポリ (オルトエステル)、モノ生分解性エチルビニルアセテートポリマー (タンパク質がポリマー封入される) から調製されるGombotz and Pettit, Bioconjugate Chem. 6:332 (1995); Ranade, “Role of Polymers in Drug Delivery.” In Drug Delivery Systems, Ranade and Hollinger (eds.), pages 51-93 (CRC Press 1995); Roskos and M askiewicz, “Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery,” in Protein Delivery: Physical Systems, Sanders and Hendren (eds.), pages 45-92 (Plenum Press 1997); Bartus など., Science 281:1161 (1998); Putney and Burke, Nature Biotechnology 16:153 (1998); Putney, Curr. Opin. Chem. Biol. 2:548 (1998)。ポリエチレングリコール (PEG) 被覆された超微小球はまた、治療用タンパク質の静脈内投与のためのキャリアーを提供することができる (例えば、Grefなど., Pharm. Biotechnol. 10:167 (1997) を参照のこと)。

20

【0328】

本発明はまた、上記で論じられたように、ポリペプチドがポリマーにより結合されている、zcytor17lig活性を有する化学的に変性されたポリペプチド、例えばzcytor17ligポリペプチド、zcytor17ligアゴニスト及びzcytor17ligアンタゴニストを企画する。

30

他の用量形は、例えば、Anset and Popovich. Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. 5th Edition (Lea & Febiger 1990), Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical sciences. 19th Edition (Mack Publishing Company 1995) により、及びRanade and Hollinger, Drug Delivery Systems (CRC Press 1996) により示されるように、当業者により考案され得る。

【0329】

例示のように、医薬組成物は、zcytor17ligポリペプチド、又はzcytor17ligアンタゴニスト (例えば、zcytor17ligポリペプチドを結合する抗体又は抗体フラグメント) を含んで成る容器を含んで成るキットとして供給され得る。治療用ポリペプチドは、単一又は複数回の用量のための注射用溶液の形で、又は注射の前、再構成されるであろう無菌粉末として供給され得る。他方では、そのようなキットは、治療用ポリペプチドの投与のための乾燥粉末分散機、液体エーロゾル発生機又はネブライザーを包含することができる。そのようなキットはさらに、医薬組成物の指示及び使用法に対する文書での情報を包含する。さらに、そのような情報は、zcytor17lig組成物が、zcytor17ligに対する既知の過敏性を有する患者に禁忌を示される提示も包含することができる。

40

【0330】

1つの観点においては、本発明は、(a) 配列番号2に示されるような残基38 (Val) ~152 (Leu) により示されるポリペプチド; (b) 配列番号2に示されるような残基27 (Leu) ~164 (Thr) により示されるポリペプチド; (c) 配列番号2に示されるような残

50

基24 (Thr) ~164 (Thr) により示されるポリペプチド；及び (d) 配列番号 2 に示されるような残基 1 (Met) ~164 (Thr) により示されるポリペプチドから成る群からのアミノ酸残基の配列に対して少なくとも90%同一であるアミノ酸残基の配列を含んで成る単離されたポリペプチドを提供する。1つの態様においては、前記単離されたポリペプチドは上記に開示される通りであり、ここでアミノ酸残基73、133及び147はシステインである。

【0331】

もう1つの態様においては、前記単離されたポリペプチドは上記に開示される通りであり、ここで前記ポリペプチドは、配列番号 5 又は71に示されるようなzcytor17受容体を結合する。もう1つの態様においては、前記単離されたポリペプチドは配列番号 2 又は11の少なくとも14個の連続したアミノ酸残基を含んで成る。もう1つの態様においては、前記単離されたポリペプチドは上記に開示される通りであり、ここで前記アミノ酸残基は、(a) 配列番号 2 のアミノ酸残基38~52；(b) 配列番号 2 のアミノ酸残基83~98；(c) 配列番号 2 のアミノ酸残基104~117；及び (d) 配列番号 2 のアミノ酸残基137~152から成る群から選択される。

【0332】

第2の観点においては、本発明は、少なくとも4種のポリペプチドを含んで成る融合タンパク質を提供し、ここでN末端からC-末端の方へのポリペプチドの順序が、配列番号 2 のアミノ酸残基38~52の配列を含んで成る第1ポリペプチド；6~27個のアミノ酸残基の第1スペーサー；(a) 配列番号168のIL-2ヘリックスBアミノ酸残基；(b) 配列番号164のIL-4ヘリックスB残基65~83；(c) 配列番号102のIL-3ヘリックスB残基73~86；(d) 配列番号166のGM-CSFヘリックスB残基72~81；及び (e) 配列番号 2 のアミノ酸残基83~98の群からのアミノ酸残基の配列を含んで成る第2ポリペプチド；5~11個のアミノ酸残基の第2スペーサー；(a) 配列番号162のIL-2ヘリックスC残基102~116；(b) 配列番号164のIL-4ヘリックスC残基94~118；(c) 配列番号102のIL-3ヘリックスC残基91~103；(d) 配列番号166のGM-CSFヘリックスC残基85~103；及び (e) 配列番号 2 のアミノ酸残基104~117の群からのアミノ酸残基の配列を含んで成る第3ポリペプチド；3~29個のアミノ酸残基の第3スペーサー；(a) 配列番号162のIL-2ヘリックスD残基134~149；(b) 配列番号102のIL-3ヘリックスD残基123~141；(c) 配列番号164のIL-4ヘリックスD残基133~151；(d) 配列番号166のGM-CSFヘリックスD残基120~131；及び (e) 配列番号 2 のアミノ酸残基137~152の群からのアミノ酸残基の配列を含んで成る第4ポリペプチドであることを特徴とする。

【0333】

第3の観点においては、本発明は、少なくとも4種のポリペプチドを含んで成る融合タンパク質を提供し、ここでN末端からC-末端の方へのポリペプチドの順序が、(a) 配列番号162のIL-2ヘリックスA残基27~48；(b) 配列番号164のIL-4ヘリックスA残基30~42；(c) 配列番号102のIL-3ヘリックスA残基35~45；(d) 配列番号166のGM-CSFヘリックスA残基30~441；及び (e) 配列番号 2 のアミノ酸残基38~52の群からのアミノ酸残基の配列を含んで成る第1ポリペプチド；6~27個のアミノ酸残基の第1スペーサー；(a) 配列番号168のIL-2ヘリックスB残基；(b) 配列番号164のIL-4ヘリックスB残基65~83；(c) 配列番号102のIL-3ヘリックスB残基73~86；(d) 配列番号166のGM-CSFヘリックスB残基72~81；及び (e) 配列番号 2 のアミノ酸残基83~98の群からのアミノ酸残基の配列を含んで成る第2ポリペプチド；5~11個のアミノ酸残基の第2スペーサー；(a) 配列番号162のIL-2ヘリックスC残基102~116；(b) 配列番号164のIL-4ヘリックスC残基94~118；(c) 配列番号102のIL-3ヘリックスC残基91~103；(d) 配列番号166のGM-CSFヘリックスC残基85~103；及び (e) 配列番号 2 のアミノ酸残基104~117の群からのアミノ酸残基の配列を含んで成る第3ポリペプチド；3~29個のアミノ酸残基の第3スペーサー；及び配列番号 2 のアミノ酸残基137~152の配列を含んで成る第4ポリペプチドであることを特徴とする。もう1つの態様においては、前記融合タンパク質は上記に開示される通りであり、ここで前記第4ポリペプチドが、配列番号 2 のアミノ酸残基137~152を含んで成る。

【0334】

もう1つの観点においては、本発明は、上記に開示されるポリペプチドをコードするヌクレオチドの配列を含んで成る単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。1つの態様においては、単離されたポリヌクレオチドは上記に開示される通りであり、ここで 前記ヌクレオチドが、(a)ヌクレオチド139～ヌクレオチド483の配列番号1に示されるようなポリヌクレオチド；(b)ヌクレオチド106～ヌクレオチド519の配列番号1に示されるようなポリヌクレオチド；(c)ヌクレオチド97～ヌクレオチド519の配列番号1に示されるようなヌクレオチド；及び(d)ヌクレオチド28～ヌクレオチド519の配列番号1に示されるようなヌクレオチドの群から選択される。

【0335】

10

もう1つの観点においては、本発明は、本明細書に開示されるようなポリペプチドをコードするヌクレオチドの配列を含んで成る単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。

もう1つの観点においては、本発明は、次の作用可能に連結された要素：(a)転写プロモーター；(b)(i)配列番号2のアミノ酸残基38～52；(ii)配列番号2のアミノ酸残基83～98；(iii)配列番号2のアミノ酸残基104～117；及び(iv)配列番号2のアミノ酸残基137～152の群からのアミノ酸残基の配列を含んで成るポリペプチドをコードするDNAセグメント；及び(c)転写ターミネーターを含んで成る発現ベクターを提供する。

【0336】

20

もう1つの観点においては、本発明は、次の作用可能に連結された要素：(a)転写プロモーター；(b)配列番号2に示されるような残基38(Val)～152(Leu)に対して少なくとも90%同一であるアミノ酸残基の配列を含んで成るポリペプチドをコードするDNAセグメント；及び(c)転写ターミネーターを含んで成る発現ベクターを提供する。1つの態様においては、次の作用可能に連結された要素：(a)転写プロモーター；(b)配列番号2のアミノ酸残基38(Val)～152(Leu)を含んで成るポリペプチドをコードするDNAセグメント；及び(c)転写ターミネーターを含んで成る発現ベクターは上記に開示される通りである。

【0337】

もう1つの観点においては、本発明は、上記に開示されるような発現ベクターを含んで成る培養された細胞を提供する。

30

もう1つの観点においては、本発明は、上記に開示されるような細胞を、前記DNAセグメントが発現される条件下で培養し；そして前記DNAセグメントによりコードされるタンパク質を回収することを含んで成るタンパク質の生成方法を提供する。

【0338】

もう1つの観点においては、本発明は、(a)9～141個のアミノ酸から成るポリペプチド、ここで前記ポリペプチドはアミノ酸番号24(Ala)～アミノ酸番号164(Thr)の配列番号2におけるアミノ酸の連続配列と同一であり；(b)請求項1記載のポリペプチド；(c)アミノ酸番号38～52の配列番号2のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド；(d)アミノ酸番号83～98の配列番号2のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド；(e)アミノ酸番号104～117の配列番号2のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド；(f)アミノ酸番号137～152の配列番号2のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド；(g)アミノ酸番号38～152の配列番号2のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド；(h)アミノ酸番号24～164の配列番号2のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド；

40

【0339】

(c)アミノ酸番号38～52の配列番号11のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド；(d)アミノ酸番号85～98の配列番号11のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド；(e)アミノ酸番号104～118の配列番号11のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド；(f)アミノ酸番号141～157の配列番号11のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド；(g)アミノ酸番号38～157の配列番号11のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド；(h)アミノ酸番号24～163の配列番号11のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド；(i)配列番号

50

2又は11のHopp/Woods浸水性プロフィールに従って抗原エピートープを含んで成るポリペプチド

【0340】

(ここで、前記プロフィールは、スライディング6-残基窓に基づかれ、隠されたG、S及びT残基及び暴露されたH、Y及びW残基は無視される)の群からのポリペプチドにより動物を接種し、ここで前記ポリペプチドが、抗体を生成するために動物において免疫応答を誘発し；そして前記動物から抗体を単離することを含んで成る、zcytor17ligポリペプチドに対する抗体の生成方法を提供する。

【0341】

もう1つの観点においては、本発明は、上記に開示されるような方法により生成される抗体(中和抗体)を提供し、ここで前記抗体は、配列番号2又は11のポリペプチドに結合する。1つの態様においては、上記に開示される抗体は配列番号2又は11に示されるポリペプチドに対して特異的に結合する。

10

【0342】

もう1つの観点においては、本発明は、(1)前記哺乳類における抗原又は病原体のレベルを、直接的又は間接的に決定し；(2) zcytor17ligポリペプチド、及び医薬的に許容できるキャリアーを含んで成る組成物を投与し；(3) 前記哺乳類における抗原又は病原体のレベルを、直接的又は間接的に決定し；そして(4) 段階(3)における抗原又は病原体のレベルに対して、段階(1)における抗原又は病原体のレベルを比較し、ここで前記レベルの変化が免疫応答の刺激を示すことを特徴とする、抗原又は病原体に対して暴露される哺乳類における免疫応答を刺激するための方法を提供する。

20

【0343】

1つの態様においては、上記に開示される哺乳類における免疫応答を刺激するための方法は、(5) zcytor17ligポリペプチド及び医薬的に許容できるキャリアーを含んで成る組成物を再投与し；(6) 前記哺乳類における抗原又は病原体のレベルを、直接的又は間接的に決定し；そして(7) 段階(6)における抗原又は病原体のレベルに対して、段階(1)における抗原又は病原体のレベルを比較し、ここで前記レベルの変化が免疫応答の刺激を示すことを特徴とする。

【0344】

もう1つの観点においては、本発明は、zcytor17ligの不在下で培養される骨髓又は末梢血液細胞に比較して、骨髓又は末梢血液細胞におけるリンパ細胞の数の上昇を引き起こすために、十分な量のzcytor17ligを含んで成る組成物と共に骨髓又は末梢血液細胞を培養することを含んで成る、哺乳類における造血細胞及び造血前駆体細胞を拡張するための方法を提供する。1つの態様においては、造血細胞及び造血細胞前駆体の拡張方法は上記に開示される通りであり、ここで前記造血細胞及び造血前駆体細胞はリンパ細胞である。もう1つの態様においては、造血細胞及び造血細胞前駆体の拡張方法は上記に開示される通りであり、ここで前記リンパ細胞は、単球細胞、マクロマージ又はT細胞である。

30

【0345】

もう1つの観点においては、本発明は、(1) 抗原-又は病原体-特異的抗体のレベルを決定し；(2) zcytor17ligポリペプチド及び医薬的に許容できるキャリアーを含んで成る組成物を投与し；(3) 抗原-又は病原体-特異的抗体の後-投与レベルを決定し；(4) 段階(3)における抗体のレベルに、段階(1)における抗体のレベルを比較し、ここで抗体のレベルの上昇が免疫応答の刺激を示すことを特徴とする、抗原又は病原体に暴露される哺乳類における免疫応答を刺激するための方法を提供する。

40

【0346】

もう1つの観点においては、本発明は、(a) zcytor17lig核酸プローブと、(i) 生物学的サンプルから単離された試験RNA分子、又は(ii) 単離されたRNA分子から合成された核酸分子のいずれかとを、ハイブリダイゼーション条件下で接触せしめ、ここで前記プローブが請求項10記載の核酸分子のヌクレオチド配列の一部、又はその補体のいずれかを含んで成るヌクレオチド配列を有し、そして(b) 前記核酸プローブ、及び前記試験RNA

50

分子又は前記合成された核酸分子のいずれかのハイブリッドの形成を検出する段階を含んで成り、ここで前記ハイブリッドの存在が生成物学的サンプルにおけるzcytor17lig RNAの存在を示すことを特徴とする、生成物学的サンプルにおけるzcytor17lig RNAの存在を検出するための方法を提供する。

【0347】

もう1つの観点においては、本発明は、(a) 前記生物学的サンプルと、上記に開示される抗体又は抗体フラグメントとを接触せしめ、ここで前記接触は、生物学的サンプルへの抗体又はフラグメントの結合を可能にする条件下で行われ；そして(b) いずれかの結合された抗体又は結合された抗体フラグメントを検出する段階を含んで成る、生物学的サンプルにおけるzcytor17ligの存在を検出するための方法を提供する。

10

【0348】

もう1つの観点においては、本発明は、患者からの癌細胞を含む組織又は生物学的サンプルを、エキスビボで獲得するか、又は癌細胞をインビボで同定し；上記に開示される方法によりポリペプチドを生成し；医薬的に許容できるビークルにおいて、前記ポリペプチドを配合し；そして前記ポリペプチドを前記患者に投与するか、又は前記配合物に癌細胞を暴露することを含んで成り、ここで前記ポリペプチドが前記細胞を殺害することを特徴とする、癌細胞の殺害方法を提供する。1つの態様においては、癌細胞の殺害方法は上記に開示される通りであり、ここで前記ポリペプチドはさらに、トキシンに接合される。1つの態様においては、前記抗体は上記に開示される通りであり、ここで前記抗体は、(a) ポリクローナル抗体、(b) ネズミモノクローナル抗体、(c) ヒト型化抗体(b)、(d) 抗体フラグメント、及び(e) ヒトモノクローナル抗体の群からで選択される。

20

【0349】

もう1つの観点においては、本発明は、(a) 配列番号2に示されるような残基38 (Val) ~152 (Leu) により示されるポリペプチド；(b) 配列番号2に示されるような残基27 (Leu) ~164 (Thr) により示されるポリペプチド；(c) 配列番号2に示されるような残基24 (Thr) ~164 (Thr) により示されるポリペプチド；及び(d) 配列番号2に示されるような残基1 (Met) ~164 (Thr) により示されるポリペプチドの群からのアミノ酸残基の配列を含んで成るポリペプチドに対して特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントを提供する。1つの態様においては、前記抗体は上記に開示される通りであり、ここで前記抗体はさらに、放射性核種、酵素、基質、補因子、蛍光マーカー、化学ルミネッセンスマーカー、ペプチド標識、磁気粒子、薬物又はトキシンを含んで成る。

30

【0350】

もう1つの観点においては、本発明は、可溶性サイトカイン受容体の不在下で培養される骨髓又は抹消血液細胞に比較して、骨髓又は末梢血液細胞における造血細胞の増殖又は分化を低めるのに十分な量の本明細書に開示されるような抗体を含んで成る組成物と共に、骨髓又は末梢血液細胞を培養することを含んで成る、造血細胞及び造血前駆体細胞のzcytor17lig-誘発された増殖又は分化を阻害するための方法を提供する。1つの態様においては、造血細胞及び造血前駆体細胞のzcytor17lig-誘発された増殖又は分化を阻害するための方法は上記に開示される通りであり、ここで前記造血細胞及び造血前駆体細胞はリンパ細胞である。もう1つの態様においては、造血細胞及び造血前駆体細胞のzcytor17lig-誘発された増殖又は分化を阻害するための方法は上記に開示される通りであり、ここで前記リンパ細胞は、マクロマージ又はT細胞である。

40

【0351】

もう1つの観点においては、本発明は、炎症を低めるのに十分な量の配列番号111のアミノ酸残基20~アミノ酸残基227及びクラスIサイトカイン受容体の請求項19記載の抗体の組成物を、炎症を有する哺乳類に投与することを含んで成る、zcytor17lig-誘発された炎症を低めるための方法を提供する。

【0352】

もう1つの観点においては、本発明は、(1) 炎症分子のレベルを決定し；(2) 本明細書に開示される抗体、及びに医薬的に許容できるビークルを含んで成る組成物を投与し

50

、（３）炎症分子の投与後のレベルを決定し；（４）段階（３）における炎症分子のレベルに、段階（１）における炎症分子のレベルを比較することを含んで成り、ここで炎症分子の上昇又は低下の欠失が炎症応答の抑制を示すことを特徴とする、炎症を有する哺乳類における炎症応答を抑制するための方法を提供する。１つの態様においては、前記抗体は上記に開示される通りであり、ここで前記抗体はさらに、放射性核種、酵素、基質、補因子、蛍光マーカー、化学ルミネセンスマーカー、ペプチド標識、磁気粒子、薬物又はトキシンを含んで成る。

【０３５３】

もう１つの観点においては、本発明は、可溶性サイトカイン受容体の不在下で培養される骨髓又は抹消血液細胞に比較して、骨髓又は末梢血液細胞における造血細胞の増殖又は分化を低めるのに十分な量の請求項31記載の抗体を含んで成る組成物と共に、骨髓又は末梢血液細胞を培養することを含んで成る、造血細胞及び造血前駆体細胞のzcytor17lis-誘発された増殖又は分化の阻害方法を提供する。１つの態様においては、造血細胞及び造血前駆体細胞のzcytor17lis-誘発された増殖又は分化の阻害方法は上記に開示される通りであり、ここで前記造血細胞及び造血前駆体細胞はリンパ細胞である。もう１つの態様においては、造血細胞及び造血前駆体細胞のzcytor17lis-誘発された増殖又は分化の阻害方法は上記に開示される通りであり、ここで前記リンパ細胞は、マクロマージ又はT細胞である。

【０３５４】

もう１つの観点においては、本発明は、炎症を低めるのに十分な量の本明細書に開示されるような抗体の組成物を、炎症を有する哺乳類に投与することを含んで成る、zcytor17lig-誘発された炎症を低めるための方法を提供する。

もう１つの観点においては、本発明は、（１）炎症分子のレベルを決定し；（２）本明細書に開示されるような抗体、及び医薬的に許容できるベークルを含んで成る組成物を投与し、（３）炎症分子の投与後のレベルを決定し；（４）段階（３）における炎症分子のレベルに、段階（１）における炎症分子のレベルを比較することを含んで成り、ここで炎症分子の上昇又は低下の欠失が炎症応答の抑制を示すことを特徴とする、炎症を有する哺乳類における炎症応答を抑制するための方法を提供する。

【０３５５】

もう１つの観点においては、本発明は、炎症が低められるよう前記哺乳類にzcytor17ligのアンタゴニストを投与し、ここで前記アンタゴニストは、zcytor17lig（配列番号２）のポリペプチド又はポリペプチドフラグメントを、特異的に結合する抗体又は結合ポリペプチドの群からであることを特徴とする、zcytor17ligが役割を演じる炎症疾患を有する哺乳類の処理方法を提供する。もう１つの態様においては、zcytor17ligが役割を演じる炎症疾患を有する哺乳類の処理方法は上記に開示される通りであり、ここで前記疾患は、慢性炎症疾患である。

【０３５６】

もう１つの態様においては、zcytor17ligが役割を演じる炎症疾患を有する哺乳類の処理方法は上記に開示される通りであり、ここで前記疾患は、（a）炎症性腸疾患；（b）潰瘍性大腸炎；（c）クローン病；（d）関節炎；及び（e）乾癬から成る群からの慢性炎症疾患である。

【０３５７】

もう１つの態様においては、zcytor17ligが役割を演じる炎症疾患を有する哺乳類の処理方法は上記に開示される通りであり、ここで前記疾患は急性炎症性疾患である。もう１つの態様においては、zcytor17ligが役割を演じる炎症疾患を有する哺乳類の処理方法は上記に開示される通りであり、ここで前記疾患は、（a）内毒素血症；（b）敗血症；（c）毒性ショック症候群；及び（d）感染性疾患から成る群からの急性炎症性疾患である。もう１つの態様においては、zcytor17ligが役割を演じる炎症疾患を有する哺乳類の処理方法は上記に開示される通りであり、ここで前記抗体はさらに、放射性核種、酵素、基質、補因子、蛍光マーカー、化学ルミネセンスマーカー、ペプチド標識、磁気粒子、薬物又は

トキシンを含んで成る。

【0358】

もう1つの観点においては、本発明は、患者から組織又は生物学的サンプルを獲得し；前記組織又は生物学的サンプルと、本明細書に開示されるような抗体とを、前記抗体が組織又は生物学的サンプルにおけるその相補的ポリペプチドに結合する条件下でインキュベートし；前記組織又は生物学的サンプルにおいて結合する抗体を可視化し；そして前記患者からの組織又は生物学的サンプルにおける結合される抗体のレベルを、正常な対照の組織又は生物学的サンプルにおけるそのレベルと比較することを含んで成り、ここで、正常な対照組織又は生物学的サンプルと比較して、患者の組織又は生物学的サンプルに結合される抗体のレベルの上昇が患者における炎症を示すことを特徴とする、患者における炎症を検出するための方法を提供する。

10

【0359】

もう1つの観点においては、本発明は、患者から組織又は生物学的サンプルを獲得し；配列番号1又は配列番号1の補体の少なくとも14個の連続したヌクレオチドを含んで成るポリヌクレオチドをラベリングし；前記組織又は生物学的サンプルを、前記ポリヌクレオチドが相補的ポリヌクレオチドにハイブリダイズする条件下でインキュベートし；前記組織又は生物学的サンプルにおけるラベリングされたポリヌクレオチドを可視化し；そして前記患者からの組織又は生物学的サンプルにおけるラベリングされたポリヌクレオチドハイブリダイゼーションのレベルを、正常な対照の組織又は生物学的サンプルにおけるそのレベルと比較することを含んで成り、ここで、正常な対照組織又は生物学的サンプルと比較して、患者の組織又は生物学的サンプルにおけるラベリングされたポリヌクレオチドハイブリダイゼーションの上昇が患者における炎症を示すことを特徴とする、患者における炎症を検出するための方法を提供する。

20

本発明は、次の非一制限的な例によりさらに例示される。

【実施例】

【0360】

例1. MPL— zcytor17ポリペプチドキメラ、すなわちzcytor17細胞内シグナル化ドメインに融合される、MPL細胞外及びTMドメイン

ネズミMPL受容体の5'細胞外ドメインを、1164bpのフラグメントを生成する、EcoRI及びBamHIによる消化により、ネズミMPL受容体を含むプラスミド（PHZ1/MPLプラスミド）から単離した。消化物を、1%アガロースゲル上に負荷し、そしてフラグメントを、Qiaquickゲル抽出キット（Qiagen）を用いて、製造業者の説明書に従って単離した。MPL細胞外ドメイン及びトランスメンブランドメインの残りを、プライマーZC6,673（配列番号13）及びZC29,082（配列番号14）により、PCRを用いて生成した。反応条件は次の通りであった：94℃で1分、55℃で1分、72℃で2分（15サイクル）、続いて72℃で7分；次に4℃でのソーキング。PCR生成物を1%アガロースゲル上に負荷し、そして約400bpのMPL受容体フラグメントを、Qiaquick™ゲル抽出キット（Qiagen）を用いて、製造業者の説明書に従って単離した。

30

【0361】

ヒトzcytor17の細胞内ドメインを、zcytor17受容体cDNA（#23/pCAP）を含むプラスミドから、プライマーZC29,083（配列番号15）及びZC29,145（配列番号16）によるPCRを用いて単離した。zcytor17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5に示さる。反応条件は上記の通りであった。PCR生成物を、1%アガロースゲル上に負荷し、そして約320bpのzcytor17フラグメントを、Qiaquickゲル抽出キットを用いて、製造業者の説明に従って単離した。

40

【0362】

上記の単離されたフラグメントの個々を、1：1の体積比で混合し、そしてZC6673（配列番号13）及びZC29,145（配列番号16）を用いてのPCR反応に使用し、zcytor17キメラの5' MPL部分を創造した。反応条件は次の通りであった；94℃で1分；55℃で1分、72℃で2分（15サイクル）；続いて、72℃で7分；次に4℃でのソーキング。全PCR生成物を、1

50

%アガロースゲル上に負荷し、そして700bpのMPL- zcytor17キメラフラグメントを、Qiaquickゲル抽出キット (Qiagen) を用いて、製造業者の説明書に従って単離した。

【0363】

MPL- zcytor17キメラフラグメントを、BamHI (BRL) 及びXbaI (Boehringer Mannheim) により、製造業者の説明書に従って消化した。全消化物を、1%アガロースゲル上に負荷し、そして分離されたMPL- zcytor17キメラを、Qiaquick™ ゲル抽出キット (Qiagen) を用いて、製造業者の説明書に従って単離した。その得られる分解されたMPL- zcytor17キメラ及び上記5' MPL EcoRI/BamHIフラグメントを、下記のようにして発現ベクター中に挿入し、完全なMPL- zcytor17キメラ受容体を生成した。

【0364】

受容体発現ベクターpZP-7を、EcoRI (BRL) 及びXbaI (BRL) により、製造業者の説明書に従って消化し、そして上記のようにしてゲル精製した。このベクターフラグメントを、上記で単離された、EcoRI及びXbaI切断されたMPL- zcytor17キメラ及び、EcoRI/BamHI 5' MPLフラグメントと共に連結反応において組合した。この連結は、T4 リガーゼ (Epicentre Technologies) を用いて、室温で1時間、行われた。連結のサンプルを、DH10B ElectroMAX™ エレクトロコンピテントE.コリ細胞においてエレクトロポレートした (25 µF, 200 Ω, 1.8V)。形質転換体を、LB+Ampicillinプレート上にプレートし、そして単一のコロニーを、miniprep(Qiagen)によりスクリーンし、そしてEcoRIにより消化し、MPL- zcytor17キメラを調べた。正しいコロニーのEcoRI消化は、約2KBのフラグメントを生成する。MPL-z zcytor17キメラ配列の確認を、配列分析により行った。この挿入体は、3.1 bpであり、そして十分な長さであった。

【0365】

例2. Alamar Blueを用いてのBAF3アッセイにおける、MPL- zcytor17キメラに基づく増殖

A. BAF3細胞発現のMPL- zcytor17キメラの構成：

BaF3、すなわちネズミ骨髄に由来するインターロイキン-3 (IL-3) 依存性プレーリンパ球細胞系 (Palacios and Steinmetz, Cell 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot など, Mol. Cell. Biol. 6:4133-4135, 1986) を、10%熱-不活性化されたウシ胎児血清、1-2 ng/mlのネズミIL-3 (mIL-3) (R&D, Minneapolis, MN)、2mMのL-glutaMax-1™ (Gibco BRL), 1mMのピルビン酸ナトリウム (Gibco BRL) 及びPSN抗生物質 (Gibco BRL) により補充された完全培地 (RPMI培地 (JRH Bioscience Inc., Lenexa, KS)) において維持した。エレクトロポレーションの前、pZP-5N/MPL- zcytor17プラスミドDNA (例4) を調製し、そしてQiagen Maxi Prepキット (Qiagen) を用いて、製造業者の説明書に従って精製した。

【0366】

エレクトロポレーションのためのBaF3細胞を、RPMI培地により2度洗浄し、そして次に、RPMI培地に10⁷個の細胞/mlの細胞密度で再懸濁した。1mlの再懸濁されたBaF3細胞を、30 µgのpZP-7/MPL- zcytor17プラスミドDNAと共に混合し、そして別々の使い捨てエレクトロポレーションチャンバー (GIBCO BRL) に移した。室温で、細胞に、エレクトロポレーション装置 (Cyto-Pulse) により供給される5x2msの連続したショック (600V) を与えた。

【0367】

他方では、細胞を、Cell-Porator(GibcoBRL)エレクトロポレーションにより供給される一連の2回のパルス (800 µFAD/300V; 続いて、1180 µFAD/300V) によりエレクトロポレートした。エレクトロポレートされた細胞を、50mlの完全培地に移し、そしてインキュベーターに、15-24時間 (37°C、5%CO₂) 配置した。次に、Geneticin™ (Gibco) 選択物 (1mg/mlのG418) をT-162フラスコにおける細胞に添加し、G418-耐性プールを単離した。この後、BaF3/MPL- zcytor17細胞と呼ばれる、トランスフェクトされたBaF3細胞のプールを、下記のようにして、シグナル化能力についてアッセイした。

【0368】

B. Alamar Blue増殖アッセイを用いてのBaF3/MPL- zcytor17細胞のシグナル化能力の試験：

BaF3/MPL- zcytor17細胞を、回転沈降し、そして上記のようであるが、しかしIL-3を含まない完全培地（この後“mIL-3フリー培地”と称する）により洗浄した。細胞を回転せしめ、そして3度洗浄し、mIL-3の除去を確かにした。次に、細胞を、血球計により計数した。細胞を、mIL-3フリー培地を用いて、ウェル当たり100 μ lの体積に5000個の細胞を含むような96-ウェル形式でプレートした。

【0369】

BaF3/MPL- zcytor17細胞の増殖を、mIL-3フリー培地により、200ng/ml, 100ng/ml, 50ng/ml, 25ng/ml, 12.5ng/ml, 6.25ng/ml, 3.1ng/ml, 1.5ng/mlの濃度に希釈されたネズミトロンボポエチン (mTPO) を用いて評価した。100 μ lの希釈されたmTPOを、BaF3/MPL- zcytor17細胞に添加した。全アッセイ体積は200 μ lである。負の対照を、mTPOの添加を伴わないで、mIL-3フリー培地のみを用いて同時に実験した。アッセイプレートを、37°Cで、5%CO₂において3日間、インキュベートし、この時点で、Alamar Blue (Accumed, Chicago, IL) を、20 μ l/ウェルで添加した。

【0370】

Alamar Blueは、細胞の代謝活性に基づいて蛍光計読み取りを与え、そして従って、負の対照に比較しての細胞増殖の直接的な測定である。プレートを再び、37°Cで、5%CO₂において、24時間インキュベートした。プレートを、SoftMaxTM Proプログラムを用いて、544 (励起) 及び590 (放射)の波長で、FmaxTM プレートリーダー (Molecular Devices Sunnyvale, CA) 上で、又はWallac Victor 2 プレートリーダー (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA) 上で読み取った。

【0371】

結果は、トロンボポエチンが50ng/ml及びそれ以上のmTPO濃度でバックグラウンドよりも約9-13倍、増殖を誘発するので、zcytor17受容体の細胞内部分のシグナル化能力を確証した。

【0372】

例3. 十分な長さのzcytor17を発現する発現ベクターpZp7px/ zcytor17の構成

A. 発現のための十分な長さのzcytor17 cDNAのクローニング：

十分な長さのzcytor17 cDNAを得るために、5' 及び3' PCR生成物を単離し、そして内部PstI部位を用いて連結した。PCRプライマーを、ヌクレオチド配列（配列番号4）を用いて企画し、そしてそれは、クローニング目的のためのBamHI及びXhoI制限部位を含む。

5' PCRを、鋳型としてWI-38 cDNAライブラリー及びプライマーとしてオリゴヌクレオチドZC29,359（配列番号18）及びZC27,899（配列番号19）を用いて生成した。WI-38は、ヒト胚の肺細胞系（ATCC CRL-2221）から生成された自家cDNAライブラリーである。この5' PCR反応は次の通りに行われた：94°Cで1分、65°Cで1分、72°Cで2分、次に72°Cで7分（30サイクル）；10°Cでのソーキング。

【0373】

PCR反応は、cDNAライブラリーから調製された約3 μ gのプラスミド、20pモルの個々のオリゴヌクレオチド及び5単位のPWO DNAポリメラーゼ (Roche) を使用した。5' PCR生成物の約90%を、エタノール沈殿し、BamHI及びPstIにより消化し、そして1.0%アガロースゲル上でゲル精製した。約600bpのバンドを切除し、そしてBamHI及びPstIにより消化されたクローニングベクターpUC18への連結のために使用した。得られる形質転換体を配列決定し、zcytor17 cDNA配列を確かめた。それらの形質転換体の1つに関して、プラスミドDNAを調製し、そしてBamHI及びPstIにより消化した。得られる約600bpのバンドをゲル精製し、そして下記連結のために使用し、十分な長さのcDNAを形成した。

【0374】

3' PCR生成物を、鋳型としてヒト精巣自家cDNAライブラリー及びプライマーとしてオリゴヌクレオチドZC27,895（配列番号20）及びZC29,122（配列番号21）を用いて生成した。この3' PCR反応は次の通りに行われた：94°Cで45秒、65°Cで45秒、72°Cで2分、次に72°C

で7分(30サイクル) ; 10℃でのソーキング。3' PCR反応物を、1.0%アガロースゲル上でゲル精製し、そして腫瘍1500bpバンドを切除した。このバンドを、ZeroBlunt TOPOキット(Invitrogen)を用いて、PCR Blunt II TOPOベクター中にクローン化した。得られる形質転換体を配列決定し、zcytor17 cDNA配列を確かめた。

【0375】

それらの形質転換体の1つに関して、プラスミドDNAを調製し、そしてPstI及びXhoIにより消化した。その得られる約1500bpのバンドをゲル精製した。3部分連結を、上記5' BamHI~PstIフラグメント、3' PstI~XhoIフラグメント、及びBamHI及びXhoIにより消化された発現ベクターpZp7pXにより行った。これは、pZp7p/zcytor17と称する、zcytor17のための十分な長さのcDNAを含むpZp7pXプラスミド(配列番号4)を生成した。pZp7p/zcytor17における十分な長さのzcytor17 cDNAは、配列番号4の位置1888でTをGに変えるサイレント突然変異を有する(配列番号5の残基464でGly残基をコードする)。

【0376】

この突然変異はサイレントであるので、pZp7p/zcytor17におけるzcytor17 cDNAは、配列番号5に示されるようなポリペプチドをコードする。プラスミドpZp7pXは、CMVプロモーター、イントロンA、コード配列の挿入のための複数の制限部位、及びヒト成長ホルモントerミネーターを有する発現カセットを含む哺乳類発現ベクターである。プラスミドはまた、複製のE. コリ起点、SV40プロモーター、エンハンサー及び複製の起点を有する哺乳類選択マーカー発現単位、ピューロマイシン耐性遺伝子、及びSV40ターミネーターを有する。

【0377】

B. 十分な長さのWSX-1を発現する発現ベクターの構成:

完全なWSX-1受容体(配列番号9)を、WSX-1受容体cDNA(配列番号8)(アメリカ特許第5,925,735号)を含むプラスミドから単離した。hWSX-1/pBluescript SK(+)プラスミドDNA(Stratagene, La Jolla, CA)を、EcoRI及びXhoIにより消化し、1075bpのフラグメントを生成し、そしてまたXhoI及びXbaIにより消化し、900bpのフラグメントを得た。両消化物を1%アガロースゲル上で試験し、そして分離されたWSX-1フラグメントを単離した。

【0378】

受容体発現ベクターpZp7Zを、EcoRI及びXbaIにより消化し、そして上記のようにしてゲル精製した。このベクターフラグメントを、T4リガーゼ(BRL)を用いての連結反応において、上記の単離された2種のzcytor17フラグメントと共に組合した。その連結物を室温で一晩インキュベートした。その連結物のサンプルを、DH10BエレクトロMAXTMエレクトロコンピテントE. コリ細胞にエレクトロポレートした(25 µF, 200 Ω, 2.3V)。6個のコロニーを培養増殖し、そしてミニプレッドDNAを調製し、そして消化し、2.0kbの正しいWSX-1の十分な長さの挿入体を確めた。得られるプラスミドは、pZPZ7Z/WSX-1である。

【0379】

例4. Alamar Blueを用いてのBaF3アッセイにおけるzcytor17に基づく増殖

A. zcytor17受容体、WSX-1受容体及びOSMRを発現するBaF3細胞の構成:

十分な長さのzcytor17受容体を発現するBaF3細胞を、上記例2Aに記載されるzcytor17発現ベクター30 µlを用いて、上記例3Aに従って構成した。1つの例外は、ジェネチン選択の代わりに、2 µg/mlのプロマイシン(Clontech)を、T-162フラスコにおけるトランスフェクトされた細胞に添加し、プロマイシン耐性プールを単離することである。zcytor17受容体mRNAを発現するBaF3細胞を、BaF3/zcytor17として命名した。クローンを得るために、BaF3/zcytor17細胞を血球計数器において計数し、そして1細胞/ウェル、0.5細胞/ウェル、0.1細胞/ウェル及び0.01細胞/ウェルで96ウェル皿に配置した。

【0380】

15個のクローンを、T75皿に一定比率で増大し、そして5個のクローンをzcytor17発現についてアッセイした。全RNAを、細胞ペレットから、S.N.A.PTM全RNA単離キット(Invitrogen)を用いて単離した。第1鎖cDNAを、proSTRTM第1鎖RT-PCRキットを用いて合成

し、そして次に、zcytor17特異的プライマーZC29, 180 (配列番号22)及びZC29,122 (配列番号23)を用いて、PCRを行い、zcytor17の発現についてクローンをスクリーンした。1つのクローンBaF3/zcytor17#15を選択し、拡張し、そしてWSX-1発現ベクターによりトランスフェクトした。

【0381】

zcytor17及び十分な長さWSX-1を発現するBaF3細胞を、上記例2Aに従って、30 µgのWSX-1発現ベクターWSX-1/pZp7Z (例3B)を用いて構成し、BaF3/Zytor17#15細胞をエレクトロポレートした。1つの例外は、ゲネチシン選択の代わりに、200 µg/mlのゼオシン (Invitrogen)を、T-162フラスコにおけるトランスフェクトされた細胞に添加し、ゼオシン耐性プールを単離することである。zcytor17及びWSX-1を発現するBaF3細胞を、BaF3/zcytor17/hWSX-1と命名した。

10

【0382】

クローンを得るために、BaF3/zcytor17/hWSX-1細胞のプールを、96mウェルプレートに制限希釈でプレートした。得られるクローンを拡張し、そして全RNAを、S.N.A.P.TM 全RNA単離キット (Invitrogen)を用いて単離した。第1鎖cDNAを、proSTARTM 第1鎖RT-PCRキットを用いて合成し、そして次に、WSX-1特異的プライマーZC9791 (配列番号24)及びZC9793 (配列番号25)を用いてPCRを行い、WSX-1の発現についてクローンをスクリーンした。1つのクローンBaF3/zcytor17/hWSX-1#5を選択し、さらに拡張し、そしてOSMR β 発現ベクターによりトランスフェクトした。

20

【0383】

zcytor17、WSX-1及び十分な長さのOSMR β を発現するBaF3細胞を、例29に記載されるOSMR β 発現ベクターOSMR/pZp7NX30 µlを用いて、上記例2Aに従って構成した。zcytor17、WSX-1及びOSMR β mRNAを発現するBaF3細胞を、BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMRとして命名した。クローンを得るために、BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR β 細胞のプールを96mウェルプレートに制限希釈でプレートした。個々のクローンを拡張し、そしてRNAを、S.N.A.P.TM 全RNA単離キット (Invitrogen)を用いて単離し、そして次にOSMR β 特異的プライマーZC40109 (配列番号26)及びZC40112 (配列番号27)を用いて、PCRを行い、zcytor17、WSX-1及びOSMR β の発現についてクローンをスクリーンした。1つのクローンBaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR #5を選択し、そしてそれらの細胞を用いて例5及び6に記載のようにしてzcytor17ligについてスクリーンした。

30

【0384】

B. zcytor17受容体及びOSMRを発現するBaF3細胞の構成：

十分な長さのzcytor17受容体を発現するBaF3細胞を、上記例3Aに記載されるzcytor17発現ベクター30 µlを用いて、上記例2Aに従って構成した。1つの例外は、ジェネチシン選択の代わりに、2 µg/mlのプロマイシン (ClonTech)を、T-162フラスコにおけるトランスフェクトされた細胞に添加し、プロマイシン耐性プールを単離することである。zcytor17受容体mRNAを発現するBaF3細胞を、BaF3/zcytor17として命名した。クローンを得るために、BaF3/zcytor17細胞のプールを、96mウェルプレートに制限希釈でプレートした。得られるクローンを培養において拡張し、そして全RNAを、S.N.A.P.TM 全RNA単離キット (Invitrogen)を用いて単離した。第1鎖cDNAを、proSTARTM 第1鎖RT-PCRキットを用いて合成し、そして次に、PCRを用いて、zcytor17の発現についてクローンをスクリーンした。1つのクローンBaF3/zcytor17#5を選択し、拡張し、そしてOSMR β 発現ベクターによりトランスフェクトした。

40

【0385】

zcytor17及び十分な長さOSMR β を発現するBaF3細胞を、上記例2Aに従って、30 µgのOSMR β 発現ベクターOSMR β /pZp7NX (例29)を用いて構成し、BaF3/zcytor17#15細胞をエレクトロポレートした。zcytor17及びOSMR β mRNAを発現するBaF3細胞を、BaF3/zcytor17/OSMR β と命名した。それらの細胞を用いて、例5に記載されるようにして、zcytor17ligについてスクリーンした。

【0386】

50

例 5. Almar Blue増殖アッセイによるBaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR β 細胞を用いてのzcytor17ligについてのスクリーニング

A. zcytor17ligの存在について試験するためのCCRF-CEM及びCCRF-CEM及びCCRF-HSB2細胞の活性化：

CCRF-CEM及びCCRF-HSB2細胞をATCCから得、そして培養において刺激し、下記に記載されるようにzcytor17lig活性の存在について試験するためにならし培地を生成した。その懸濁細胞を、10%FBS、2mMのL-グルタミン (GibcoBRL)、 $1 \times \text{PSN}$ (GibcoBRL) により補充されたRPMI-1640培地に、 2×10^5 個の細胞/ml又は 5×10^5 個の細胞/mlで接種し、100ng/mlのホルボール-12-ミリスレート-13-アセテート (PMA) (Calbiochem, San Diego, CA) 及び0.5 $\mu\text{g/ml}$ のイノマイシンTM (Calbiochem) により24又は48時間、活性化した。前記刺激された細胞からの上清液を用いて、下記に記載されるようにして、BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR β 細胞又はBaF3/zcytor17/OSMR β 細胞の増殖についてアッセイした。

【0387】

B. Almar Blue 増殖アッセイによる、BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR β 細胞又はBaF3/zcytor17/OSMR β 細胞を用いてのzcytor17ligについてのスクリーニング：

BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR β 細胞又はBaF3/zcytor17/OSMR β 細胞を回転沈降し、そしてmIL-3フリー培地により洗浄した。細胞を回転せしめ、そして3度洗浄し、mIL-3の除去を確保した。次に、細胞を血球計により計数した。細胞を、mIL-3フリー培地を用いて、ウェル当たり100 μl の体積に5000個の細胞を含むような96-ウェル形式でプレートした。

【0388】

BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR β 細胞又はBaF3/zcytor17/OSMR β 細胞の増殖を、活性化されたCCRF-CEM及びCCRF-HSB2細胞 (例 5 A) からのならし培地を用いて評価した。ならし培地は、mIL-3フリー培地により、50%、25%、12.5%、6.2%、3.12%、1.5%、0.75%及び0.375%の濃度に希釈した。希釈されたならし培地100 μl を、BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR β 細胞又はBaF3/zcytor17/OSMR β 細胞に添加した。合計アッセイ体積は200 μl である。アッセイプレートを37°Cで、5%CO₂下で3日間インキュベートし、この時点で、Almar Blue (Accumed, Chicago, IL) を、20 μl /ウェルで添加した。プレートを再び、37°Cで、5%CO₂下で24時間インキュベートした。プレートを、上記 (例 2) のようにして、FmaxTM プレートリーダー (Molecular Devices) 上で読み取った。

【0389】

結果は、活性化されたCCRF-CEM及びCCRF-HSB2細胞ならし培地に存在する因子に対するBaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR β 細胞又はBaF3/zcytor17/OSMR β 細胞の増殖応答を確かめた。その応答は、測定される場合、25%の濃度でバックグラウンドの約10倍であった。トランスフェクトされていないBaF3細胞は、この因子に対する応答において増殖せず、zcytor17及びWSX-1によりトランスフェクトされたBaF3細胞 (BaF3/zcytor17/WSX-1) はこの因子に対する応答において増殖せず、このことは、この因子がzcytor17/OSMR β 又はzcytor17/OSMR β /WSX-1受容体に対して特異的であることを示す。さらに、可溶性zcytor17受容体は、BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR β 細胞においてzcytor17ligのこの増殖活性低めた (例11を参照のこと)。類似する結果がBaF3/zcytor17/OSMR β 細胞において予測される。

【0390】

C. zcytor17ligを単離するために使用されるヒト一次源：

100mlの血液を、6人のドナーの個々から採血した。血液を、ヘパリンを含む10 $\times$ 10mlのバキュティナー (vacutainer) を用いて採集した。血液を、6人のドナーからプールL (600ml)、PBSにより1:1に希釈し、そしてFicoll-Paque (商標) PLUS (Pharmacia Biotech) を用いて、分離した。単離された一次ヒト細胞収量は、Ficollグラジエント上での分離の後、 1.2×10^4 個の細胞であった。

【0391】

細胞を、9.6mlのMACS緩衝液 (PBS、0.5%EDTA、2mMのEDTA) に懸濁した。細胞懸濁液1.6mlを除き、そして0.4mlのCD3微小ビーズ (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) を添加した。その混合物を4°Cで15時間インキュベートした。CD3ビーズによりラベルされたそれらの細胞

胞を、30mlのMACS緩衝液により洗浄し、そして次に、2mlのMACS緩衝液に懸濁した。

【0392】

VS+カラム (Miltenyi) を、製造業者の説明書に従って調製した。次に、VS+カラムを、VarioMACSTM 磁場 (Miltenyi) に配置した。カラムを、5mlのMACS緩衝液により平衡化した。次に、単離された一次ヒト細胞を、カラムに適用した。CD3陰性細胞を通過した。カラム9ml (3×3ml) のMACS緩衝液によりすすいだ。次に、カラムを磁石から除去し、そして15mlのファルコン管上に配置した。CD3+細胞を、カラムに5mlのMACS緩衝液を添加することにより溶出し、そして結合された細胞を、製造業者により提供されるプランジャーを用いて、フラッシュした。細胞とCD3磁気ビーズとのインキュベーション、洗浄、及び上記VS+カラム段階 (インキュベーション～溶出) を、さらに5度、反復した。6種の

10

【0393】

プールされたCD3+選択されたヒト細胞のサンプルを、それらの純度を評価するために、蛍光抗体細胞ソーター (FACS) に基づいて、染色し、そして分類するために除去した。ヒトCD3+選択された細胞は、91%のCD3+細胞であった。

ヒトCD3+選択された細胞を、RPMI+5%FBS+10ng/mlのPMA及び0.5µg/mlのIonomycin (Calbiochem) において37°Cで13時間インキュベートすることにより活性化した。それらの活性化されたCD3+選択されたヒト細胞からの上清液を、下記のようにして、zalpha11リガンド活性について試験した。さらに、前記活性化されたCD3+選択されたヒト細胞を、

20

【0394】

D. BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR β 細胞及びAlamar Blue 増殖アッセイを用いてのzcytor17ligについての活性化されたCD3+選択されたヒト細胞からの上清液：

BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR β 細胞又はBaF3/zcytor17/OSMR β 細胞を回転沈降し、そしてmIL-3フリー培地により洗浄した。細胞を回転せしめ、そして3度洗浄し、mIL-3の除去を確保した。次に、細胞を血球計により計数した。細胞を、mIL-3フリー培地を用いて、ウェル当たり100µlの体積に5000個の細胞を含むような96-ウェル形式でプレートした。

【0395】

BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR β 細胞又はBaF3/zcytor17/OSMR β 細胞の増殖を、mIL-3フリー培地により25%、12.5%、6.25%、3.125%、1.5%、0.75%、0.375%及び0.187%濃度に希釈された、活性化されたCD3+選択されたヒト細胞 (例5Cを参照のこと) からのならし培地を用いて評価した。希釈されたならし培地100µlを、BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR β 細胞又はBaF3/zcytor17/OSMR β 細胞に添加した。合計のアッセイ体積は200µlである。アッセイプレートを、例5Bに記載のようにしてインキュベートし、そしてアッセイした。

30

【0396】

結果は、活性化されたCD3+選択されたヒト細胞ならし培地に存在する因子に対するBaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR β 細胞又はBaF3/zcytor17/OSMR β 細胞の増殖応答を確かめた。前記応答は、測定される場合、25%濃度で、バックグラウンドよりも約15倍、高かった。トランスフェクトされていないBaF3細胞は、この因子に対する応答において増殖せず、zcytor17及びWSX-1によりトランスフェクトされたBaF3細胞 (BaF3/zcytor17/WSX-1細胞) はこの因子に対する応答において増殖せず、このことは、この因子がzcytor17/OSMR β 又はzcytor17/OSMR β / WSX-1受容体に対して特異的であることを示す。

40

【0397】

例6. ヒトCD3+選択された細胞ライブラリーからの連結されるヒトzcytor17ligのクローニング

一次ヒト活性化された、CD3+選択された細胞cDNAライブラリーのスクリーニングは、4-ヘリックス束サイトカインファミリーの新規メンバーである単離されたcDNAを示した。このcDNAは、zalpha11リガンドをコードした。このcDNAは、zcytor17/WSX-1/OSMR β 受容体を用いてzcytor17ligの活性についてスクリーニングすることにより同定された。

50

【0398】

A. CD3+選択されたライブラリー構成のためのベクター：

CD3+選択されたライブラリー構成のためのベクターは、pZP7NXであった。前記pZP7NXベクターを次の通りにして構成した：ベクターpZP7におけるDHFR選択マーカースのコード領域を、NcoI及びPstI制限酵素（Boehringer Mannheim）によるDNA消化により除去した。消化されたDNAを、1%アガロースゲル上に負荷し、切断し、そしてQiagenゲル抽出キット（Qiagen）を用いて、製造業者の説明書に従ってゲル精製した。Zeocin選択マーカースのコード領域を表すDNAフラグメントを、鋳型として、プライマーZC13,946（配列番号28）及びZC13,945（配列番号29）、及びpZcoSV2(+)を用いてのPCR方法により増殖した。

10

【0399】

プライマーZC13,946（配列番号28）に追加のPstI及びBclI制限部位、及びプライマーZC13,945（配列番号29）に追加のNcoI及びSfuI部位が存在する。PCRフラグメントを、PstI及びNcoI制限酵素により切断し、そして同じ2種の酵素により分離し、そして続いてゲル精製することによって調製されたpZP7ベクター中にクローン化した。このベクターをpZP7Zと命名した。次に、Zeocinコード領域を、BclI及びSfuI制限酵素によるベクターpZP7ZのDNA消化により除去した。消化されたDNAを、1%アガロース上に負荷し、切断し、そしてゲル精製し、そして次に、同じ酵素（BclI及びSfuI）によりpZem228ベクター（American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VAに寄託されている；ATCC寄託番号69446号）から切断されたネオマイシンコード領域のDNAフラグメントにより連結した。

20

【0400】

この新規ベクターをpZP7Nと命名し、ここでDHFR選択マーカースのためのコード領域を、ベクターpZem228からのネオマイシン選択マーカースのためのコード領域により置換した。XhoI部位を包含するスタッファフラグメントを、cDNAの高い効率の方向づけクローニングのために適切なベクターを創造するためにpZP7Nに付加し；この新規ベクターをpZP7NXと命名した。

【0401】

cDNAのためのベクターを調製するために、20 µgのpZP7NXを、20単位のEcoRI（Life Technologies Gaithersburg, MD）及び20単位のXhoI（Boehringer Mannheim Indianapolis, IN）により、37°Cで5時間、次に68°Cで15分間、消化した。次に、その消化物を、0.8%低融点アガロースIXTAEゲル上に負荷し、ベクターから前記スタッファを分離した。ベクターバンドを切出し、そして“β-アガラーゼ”（New England Biolabs, Beverly, MA）により、製造業者の推薦に従って消化した。エタノール沈殿の後、消化されたベクターを、下記のCD3+選択されたcDNAライブラリーの連結のための調製において、水に再懸濁し、45ng/mlの濃度にした。

30

【0402】

B. 一次ヒト活性化されたCD3+選択された細胞cDNAライブラリーの調製：

イノマイシン/PMAにおいて刺激された、約 1.5×10^8 個の一次ヒトCD3+選択された細胞を、37°Cで13時間の培養（例5C）の後、遠心分離により単離した。全RNAを、Qiagen, Inc. (Valencia, CA)からの“NNeasy Midi”キットを用いて、細胞ペレットから単離した。mRNAを、CPG Inc. (Lincoln Park, NJ)からの“MPG mRNA精製キット”を用いて、全RNA 225 µgから単離した。3.4 µgのmRNAを単離し、そして次の方法を用いて、二本鎖cDNAに転換した。

40

【0403】

刺激されたヒトCD3+選択された細胞からの第1鎖cDNAを、次の通りに合成した。0.34 µg/µlの濃度での9 µlのOligo d(T)-選択されたポリ(A) CD3+ RNA、及びXhoI制限部位を含む1 µg/µlの第1プライマーZC18,698（配列番号30）1.0 µlを、混合し、そして65°Cで4分間、加熱し、そして氷上での急冷により冷却した。第1鎖cDNA合成を、RNA-プライマー混合物への9 µlの第1鎖緩衝液（5×SUPERScript（商標）緩衝液；Life Technologies）、4 µlの100mMジチオトレイトール、及びそれぞれ10mMのdATP, dGTP, dTTP及

50

び5-メチル-dCTPを含むデオキシヌクレオチドミリン酸溶液 (Pharmacia Biotech Inc.) 2 μ lの添加により開始した。反応混合物を、45°Cで4分間インキュベートし、続いて、200U/ μ lのSuperscript II (商標), RNアーゼII-逆転写酵素 (Life Technologies) 8 μ lを添加した。

【0404】

反応を45°Cで45分間インキュベートし、続いて、50°Cまで2分ごとに1°Cのインキュベーション傾斜を伴ない、ここで反応は10分間、維持された。いずれかの二次構造を変性し、そしてcDNAの追加の延長を可能にするために、反応を70°Cに2分間加熱し、次に55°Cに4分間、下げ、この後、2 μ lのSuperscript II (商標) RTを添加し、そしてさらに15分間インキュベートし、続いて、70°Cまで1分/1°Cの傾斜を伴なった。組み込まれなかったヌクレオチドを、2 μ gのグリコーゲンキャリアー、2.0Mの酢酸アンモニウム及び2.5体積のエタノールの存在下で2度、沈殿せしめ、続いて70%エタノールにより洗浄することにより、cDNAから除去した。cDNAを、第2鎖合成への使用のために、98 μ lの水に再懸濁した。

10

【0405】

第2鎖合成を、DNAヘパリン形成をもたらず第2鎖合成の第1鎖プライミングを促進する条件下で、第1鎖cDNAに対して行った。第2鎖反応は、98 μ lの前記第1鎖cDNA、30 μ lの5×ポリメラーゼI緩衝液 (100mMのトリス-HCl, pH7.5, 500mMのKCl, 25mMのMgCl₂, 50mMの(NH₄)₂ SO₄)、2 μ lの100Mジチオトレイトール、それぞれ10mMのデオキシヌクレオチド三リン酸を含む溶液6 μ l、5mMのb-NAD5 μ l、30/ μ lのE. コリDNAリガーゼ (New England Biolabs Inc.) 1 μ l、及び10U/ μ lのE. コリDNAポリメラーゼI (New England Biolabs Inc.) 4 μ lを含んだ。

20

【0406】

反応を、室温でアッセムブリーし、そして室温で2分間インキュベートし、続いて、3.8U/ μ lのRNアーゼH (Life Technologies) 4 μ lを添加した。反応を、15°Cで2時間、続いて室温で15分間インキュベートした。1MのTRIS (pH7.4) 10 μ lを反応に添加し、そしてフェノール/クロロホルムにより2度及びクロロホルムにより1度、抽出し、次に有機相を50 μ lのTE (10mMのTRIS 1, pH7.4, 1mMのEDTA) により戻し抽出し、他の水性物と共にプールし、そして0.3Mの酢酸ナトリウムの存在下でエタノール沈殿した。ペレットを、70%エタノール100 μ lにより洗浄し、空気乾燥し、そして水40 μ lに懸濁した。

30

【0407】

ヘアピン構造の1本鎖のDNAを、ヤエナリヌクレアーゼを用いて切断した。反応混合物は、40 μ lの第2鎖cDNA、5 μ lの10×ヤエナリヌクレアーゼ緩衝液 (Life Technologies)、1×ヤエナリヌクレアーゼ緩衝液により1U/ μ lに希釈されたヤエナリヌクレアーゼ (Pharmacia Biotech Corp.) 5 μ lを含んだ。反応を37°Cで45分間インキュベートした。反応を、1Mのトリス-HCl (pH7.4) 10 μ lの添加により停止し、続いて、上記のように、連続的フェノール/クロロホルム及びクロロホルム抽出を行った。抽出に続いて、cDNAを、0.3Mの酢酸ナトリウムの存在下でエタノール沈殿した。ペレットを、70%エタノール100 μ lにより洗浄し、空気乾燥し、そして38 μ lの水に再懸濁した。

40

【0408】

前記再懸濁されたcDNAを、T4 DNAポリメラーゼによりフラグメント末端化した。水38 μ lに再懸濁されたcDNAを、12 μ lの5×T4 DNAポリメラーゼ懸濁液 (250mMのトリス-HCl, pH8.0, 250mMのKCl, 25mMのMgCl₂)、2 μ lの0.1Mジチオトレイトール、それぞれ10mMのデオキシヌクレオチド三リン酸を含む溶液6 μ l、及び1U/ μ lのT4 DNAポリメラーゼ (Boehringer Mannheim Corp.) 2 μ lと共に混合した。15°Cで45分間のインキュベーションの後、反応を、30 μ lのTEの添加により停止し、続いて、連続的フェノール/クロロホルム及びクロロホルム抽出を行い、そして上記のように、20 μ lのTEにより戻し抽出を行った。DNAを、2 μ lのPellet Paint™ (Novagen) キャリヤー及び0.2Mの酢酸ナトリウムの存在下でエタノール沈殿し、そして水11 μ lに再懸濁した。

【0409】

50

EcoRIアダプターを、発現ベクター中へのクローニングを可能にするために、上記cDNAの5'末端上に連結した。11 μ lのcDNA及び65pモル/ μ lのEcoRIヘミリン酸化されたアダプター (Pharmacia Biotech Corp.) 4 μ lを、5 μ lの5×リガーゼ緩衝液 (Life Technologies)、10mMのATP 2 μ l及び1U/ μ lのT4 DNAリガーゼ (Life Technologies) 3 μ l、1 μ lの10×連結緩衝液 (Promega Corp)、9 μ lの水と共に混合した。1×緩衝液による特別な希釈は、ペレットポイントの沈殿を妨げることであった。反応を、10℃～22℃の水浴温度傾斜を伴って、9時間、続いて25℃で45分間インキュベートした。反応を、68℃で15分間のインキュベーションにより停止した。

【0410】

発現ベクター中へのcDNAの方向づけクローニングを促進するために、cDNAをXhoIにより消化し、5'側EcoRI付着端及び3'側XhoI付着端を有するcDNAをもたらしした。cDNAの3'末端でのXhoI制限部位を、ZC18698 (配列番号30) プライマーを用いて、前もって導入した。制限酵素消化を、上記連結混合物35 μ l、10×H緩衝液 (Boehringer Mannheim Corp.) 6 μ l、2mg/mlのBSA (Biolabs Corp.) 1 μ l、水17 μ l及び40U/ μ lのXhoI (Boehringer Mannheim) 10 μ lを含む反応混合物において行った。消化は、37℃で1時間、行われた。反応を、68℃での15分間のインキュベーションにより停止し、続いてエタノール沈殿し、上記のようにして洗浄乾燥し、そして水30 μ lに再懸濁した。

【0411】

再懸濁されたcDNAを、65℃に5分間、加熱し、そして氷上で冷却し、4 μ lの5×ゲル負荷色素 (Research Genetics Cor.) を添加し、cDNAを0.8%低溶融アガロース 1×TAEゲル (SEA PLAQUE GTG™ 低溶融アガロース; FMC Corp.) 上に負荷し、そして電気泳動した。汚染性アダプター及び長さ0.6kb以下のcDNAをゲルから切除した。電極を逆にし、溶融されたアガロースを添加し、ウェルを満たし、緩衝液を変え、そしてcDNAを、レーン起点近くで濃縮されるまで、電気泳動した。濃縮されたcDNAを含むゲルの部分を切除し、そして微小遠心分離管に配置し、そしてアガロースを、65℃に15分間、加熱することにより溶解した。

【0412】

45℃にサンプルを平衡化した後、2 μ lの1U/ μ lの β -アガロースI (Biolabs, Inc.) を添加し、そしてその混合物を45℃で90分間インキュベートし、アガロースを消化した。インキュベーションの後、1/10体積の3Mの酢酸ナトリウムをサンプルに添加し、そしてその混合物を15分間、氷上でインキュベートした。サンプルを、室温で14,000×gで15分間、遠心分離し、消化されなかったアガロースを除去し、cDNAをエタノール沈殿し、70%エタノールにより洗浄し、空気乾燥し、そして水40 μ lにおいて再懸濁した。

【0413】

ベクターに対するcDNAの最適比を決定するために、いくつかの連結をアセンブルし、そしてエレクトロポレートした。手短に言及すると、2 μ lの5×T4リガーゼ緩衝液 (Life Technologies)、10mMのATP 1 μ l、EcoRI-XhoIにより消化されたpZP7NX、0.25 μ g/ μ lに希釈されたT4 DNAリガーゼ (Life Technologies) 1 μ l、10 μ lまでの水、及び0.5、1.2又は3 μ lのcDNAを、4回の別々の連結において混合し、22℃で4時間、68℃で20分間インキュベートし、酢酸ナトリウム-エタノール沈殿し、洗浄し、乾燥せしめ、そして再懸濁した。

【0414】

1 μ lの個々の連結物を、0.1cmのキュベット (Biorad) 及び2.5KV, 251F, 200 Ω に設定されたGenepulser, Pulse Controller™ (Biorad) を用いて、40 μ lのDH10b ElectroMax™ エレクトロコンピテント細菌 (Life Technologies) 中にエレクトロポレートした。これらの細胞をすぐに、1mlのSOCブイヨン (Manniatiss, など. 前記) に再懸濁し、続いて、保存剤としての50%グリセロール-SOS500を添加した。それらの“グリセロール原液”を、いくつかのアリコートに分け、-70℃で凍結した。個々のアリコートを融解し、そして100 μ g/mlでのアンピシリンにより補充されたLB-寒天プレート上に連続的にプレートした。コロニー数は、pZP7NXベクターに対するCD3+cDNAの最適割合が1 μ l～45ngである

ことを示し；その連結は4.5百万の一次クローンを生成した。

【0415】

上記からのBaF3に基づく増殖アッセイ（例5）を用いてこのライブラリーのスクリーニングのために、上記からのグリセロール原液を、深いウェルのマイクロタイタープレートにおいてプレート当たり100又は250個のクローンの液体培養物中に希釈し、振盪しながら37℃で24時間、増殖し、そしてプラスミドを、Qiagenキットを用いて、製造業者の説明書に従って単離した。続いて、そのようなDNAを、BHK細胞中にトランスフェクトし、培地を72時間、条件づけ、収穫し、そして-80℃で貯蔵し、そしてつづいて、5K BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR β細胞又はBaF3/zcytor17/OSMR β細胞上に72時間、配置し、その後、増殖を、“Alamar ブルー” 蛍光アッセイ（例5B及び例2B）を用いて評価した。

10

【0416】

例7. ヒトzcytor17ligの発現クローニング

活性化されたヒトCD3+選択された細胞ライブラリー（例6）からのグリセロール原液を、800 μl当たり250個の細胞の濃度で、Super Broth IITM (Becton Dickinson, Cockeysville, MD) +0.1mg/mlのアンプシリン（amp）に添加した。E. コリ細胞を、室温で24時間、平衡化した。接種の時点で、100 μlを、LB+ampプレートにプレートし、接種の実際の力価を決定した。24時間後、プレートを計数し、そして次に、SuperBrothIITM +E. コリの最終濃度を、その最終濃度が1.2ml当たり250個の細胞になるよう調節した。3 × 2 lが接種された（合計6 l）。

【0417】

20

次に、培地を、96-ウェルの深いウェルブロック（Qiagen）中にプレートした。プレート化は、8-チャンネルQ-Fill2TM ディスペンサー（Genetic, Christchurch, Dorset, UK）上で行われた。E. コリを、New Brunswick Scientific Innova 4900複数列振盪機上で、250回転/分で振盪しながら、37℃で一晩、増殖した。E. コリを、Beckman GS-6KR 遠心分離機を用いて、3000rpmで溶液から回転沈殿せしめた。それらのE. コリペレットを、-20℃で凍結し、又はプラスミドDNAをミニ調製する前、新たに使用した。個々のペレットは、ヒトCD3+選択された細胞ライブラリーからの約250個のcDNAクローンを含む。

【0418】

次に、250個のcDNAクローンのそれらのプールを、QIAprepTM 96Turbo Miniprep キット（Qiagen）を用いてミニ調製した。プラスミドDNAを、125 μlのTE（10mMのトリス、pH8, 1mMのEDTA）を用いて溶出した。次に、このプラスミドDNAを用いて、BHK細胞をトランスフェクトした。

30

【0419】

BHKトランスフェクション；

BHK細胞を、ウェル当たり100 μlの体積において、ウェル当たり12,000個の細胞の密度で96-ウェル組織培養プレートにプレートした。培養培地は、DMEM（GibcoBRL）、5%の熱不活性化されたウシ胎児血清、2mMのL-グルタミン（GibcoBRL）、1 × PSN（Gibco BRL）、1mMのNaPyruvate（GibcoBRL）を含んだ。

次の日、BHK細胞を、100 μlのSFAにより1度、洗浄した。SFAは、DMEM/F12（Gibco/BRL）、2mMのGlutaMaXTM（Gibco/BRL）、1mMのNaPyruvate、10 μg/mlのトランスフェリン、5 μg/mlのインスリン、10 μg/mlフェチュイン、2 μg/mlのセレンウム、25mMのHEPES（Gibco/BRL）、100 μMの非必須アミノ酸（Gibco/BRL）を含む血清フリー培地である。

40

【0420】

DNA/LipofectamineTM 混合物を次の通りにして製造した：22 μlのLipofectamineTM 試薬（Gibco/BRL）を、102.8 μlのSFAと共に室温で組合し；次に、約μlのプラスミドDNA（200ng/μl）を、LipofectamineTM/SFAに添加し、DNA/LipofectamineTM 混合物を形成し、これを室温で30分間インキュベートした。SFAをBHK細胞から除去し、そして細胞を50 μlのDNA/LipofectamineTM 混合物と共に37℃で、5%CO₂下で5時間、インキュベートした。50 μlのDNA/LipofectamineTM 混合物を、BHK細胞の2つのウェルの個々に添加し、その結果、トランスフェクションを二重反復して行った。

50

【0421】

BHK細胞をDNA/LipofectamineTM 混合と共に5時間インキュベートした後、DNA/LipofectamineTM 混合物を除去し、そして100 μ lの培養培地を添加した。細胞を一晩インキュベートし、培地を除去し、そして100 μ lの培養培地により置換した。細胞を48-72時間、培養した後、ならし培地を除去し、-80°Cで最少20分間、凍結し、融解し、そして次に、その50 μ lを、例5に記載されるBaF3増殖アッセイによりアッセイし、リガンド活性を有する250個のクローンのプールを同定した。

【0422】

20個の96ウェルプレートを、単一のアッセイにおいてスクリーンした。これは、約250個のcDNA/ウェル又は合計480,000個のcDNAを表した。それらのうち、60個のウェル（ウェル当たり250個のcDNAを表す）からのならし培地が、増殖アッセイにおいて陽性であることを試験した。それらの陽性プールの1つを選択し、分解し、そしてzcytor17ligをコードする単一のcDNAを単離した。これは、プール62A12であった。

10

【0423】

プール62A12に関しては、1 μ gのDNAを使用して、エレクトロポレーションによりElectroMaxTM DH10B細胞（Gibco/BRL）を形質転換した。形質転換体を、LB+amp（100 μ g/ml）プレート上にプレートし、単一のコロニーを得た。エレクトロポレートされたプールから、672個の個々のコロニーを、ウェル当たり1.2mlのSuperBrothIITM を含む96-ウェルプレート中につま楊枝により入れた。それらのプレートを、#62.1-#62.7の番号を付けられた。それらを一晩、培養し、そしてプラスミドDNAを上記のようにしてミニプレブドした。すべての7種のプレートに関しては、前記分解プレートからのプラスミドDNAを、上記のようにして、BHK細胞中にトランスフェクトし、そして増殖によりアッセイし、但しトランスフェクションは二重反復して行わなかった。

20

【0424】

2種の陽性クローン62.6C7及び62.6E9を、合計672個のクローンから活性により同定した。クローン62.6E9からミニプレブドされたプラスミドDNAを配列決定し、そして仮に同定し、但し混合された配列は、この陽性クローンから得られた。zcytor17lig cDNAを単一のクローンにさらに単離するために、プール62.6E9からのDNA1 μ lを用いて、DH10B細胞をエレクトロポレートし、そして形質転換体を、LB+amp（100 μ g/ml）プレート上にプレートし、単一コロニーを得た。7個のコロニーからミニプレブドされたプラスミドDNAを配列決定し、正確なDNA配列を得た。zcytor17ligのポリヌクレオチド配列は、十分な長さであり（配列番号1）、そしてそのような対応するアミノ酸配列が示される（配列番号2）。

30

【0425】

例8. 次のzcytor17可溶性受容体を発現する哺乳類発現ベクターの構成：zcytor17 CEE, zcytor17 CFLG, zcytor17 CHIS及びzcytor17-Fc4

A. zcytor17 CEE, zcytor17 CFLG及びzcytor17 CHISを含むzcytor17哺乳類発現ベクターの構成：

発現ベクター、すなわちpZp9zcytor17CEEを、zcytor17ポリペプチドの可溶性、細胞外ドメインの発現のために調製し、ここで前記構造体は、予測される開始メチオニンから成り、そして予測されるトランスメンブランドメインに隣接して切断され、そしてC-末端Glu-Glu標識（配列番号32）を有するzcytor17ポリペプチドを発現するよう企画されている。

40

【0426】

約1500bpのPCR生成物を、EcoRI及びBamHI制限部位を付加するためにPCRプライマーとしてZC29,451（配列番号33）及びZC29,124（配列番号34）を用いて生成した。ヒトHPVS自家cDNAライブラリーを鋳型として使用し、そしてPCR増幅を次の通りに行った：94°Cで1分、65°Cで1分、72°Cで1.5分、次に72°Cで7分（30サイクル）；10°Cでのソーキング。PCR反応をエタノール沈殿し、そしてEcoRI及びBamHI制限酵素により消化した。消化されたPCR生成物を1.0%アガロースゲル上でゲル精製し、そして約1500bpのバンドを切除した。次にこのバンドを、次のサイクリングにより、同一のプライマーを用いて再増幅した：94°C

50

で1分、65℃で1分、72℃で3分、次に72℃7分；10℃でのソーキング。PCR反応をエタノール沈殿し、そしてEcoRI及びBamHI制限酵素により消化した。消化されたPCR生成物を1.0%アガロースゲル上でゲル精製し、そして約1500bpのバンドを切除した。

【0427】

この切除されたDNAを、EcoRI及びBamHIにより切断されたプラスミドCEEpZp9中にサブクローン化し、zcytor17のGLU-GLU C-末端標識された可溶性受容体、すなわちzcytor17CEEpZp9を生成した。zcytor17CEEpZp9におけるzcytor17CEE cDNA中の細胞外ドメインは、配列番号4の位置1705でのTをCに変更するサイレント突然変異（配列番号5の残基403でのPro残基をコードする）を有する。この突然変異はサイレントであるので、zcytor17CEEpZp9におけるzcytor17 cDNAは、配列番号5に示されるようなポリペプチドをコードする。さらに、使用される構造体のために、Gly-Ser残基対を、zcytor17の可溶性細胞外ドメインのC-末端側に及びそのC-末端Glu-Glu標識（配列番号32）の前に挿入する。zcytor17細胞外ドメインのC-末端での標識は、配列番号17に示されるようなGlu-Glu標識であった。プラスミドCEEpZp9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複数の制限部位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類発現ベクターである。

【0428】

プラスミドはまた、複数のE. コリ起点、SV40プロモーター、エンハンサー及び複製の起点を有する哺乳類選択マーカー発現単位、DHFR遺伝子及びSV40ターミネーターを有する。標準の分子生物学技法を用いて、zcytor17CEEpZp9を、DH10Bコンピテント細胞（GIBCO BRL, Gaithersburg, MD）中に、その製造業者の説明書に従ってエレクトロポレートし、そして100 µg/mlのアンピシリンを含むLBプレート上にプレートし、そして一晩インキュベートした。コロニーを、制限分析によりスクリーンし、又はDNAからのPCRを個々のコロニーから調製した。陽性クローンの挿入体配列を、配列分析により確かめた。大規模プラスミド調製を、QIAGEN（商標）Maxi prepキット（Qiagen）を用いて、製造業者の説明書に従って行った。

【0429】

同じ方法を用いて、一列に並んでの6個のHis残基から成るC-末端his標識及びC-末端フラッグ（配列番号36）標識、すなわちzcytor17 CF1.AGを有するzcytor17可溶性受容体を調製した。それらの構造体を調製するためには、前記ベクターは、glu-glu標識（配列番号17、32又は35）の変わりにHIS又はFLAG（商標）標識のいずれかを有する。

【0430】

B. 可溶性ヒトzcytor17受容体、すなわちzcytor17-Fc4の哺乳類発現構成：

発現ベクター、pEZE-2hzcytor17/Fc4を調製し、PF CHO細胞においてhzcytor17のC末端Fc4標識された可溶性型（ヒトzcytor17-Fc4）を発現した。PF CHO細胞は、タンパク質フリーの培地（ExCell325PF培地；JRH Biociences）において増殖のために適合された自家CHO細胞系である。

【0431】

前記自家CHO細胞系は、本来、CHO DG44細胞に起因した（G. Urlaub, J. Mitchell, E. Kas, L.A. Chasin, V.L., Funanage, T.T. Myoda and J.L. Hamlin, “The Effect of Gamma Rays at the Dihydrofolate Reductase Locus: Deletions and Inversions”, Somatic cell and Molec. Genet., 12: 555-566 (1986)）。zcytor17受容体の細胞外ドメインからのポリヌクレオチド配列を含む、zcytor17 cDNAのフラグメントを、Fc4ポリヌクレオチド配列（配列番号37）に整合して融合し、zcytor17-Fc4融合体（配列番号38及び39）を生成した。pEZE-2ベクターは、Fc4ポリヌクレオチド配列、及び標準の分子生物学技法を用いてC-末端Fc4融合体の急速な構成を可能にするクローニング部位を含む哺乳類発現ベクターである。

【0432】

ヒトzcytor17の細胞外ドメイン、及びそれぞれ、5'及び3'末端上にコードされるFseI及びBglII部位と共に、Fc4の最初の2個のアミノ酸（Glu及びPro）を含む、1566塩基対の

フラグメントをPCRにより生成した。このPCRフラグメントを、ヒトzcytor17の細胞外ドメインを含むプラスミド (pZp9zcytor17CEE) (例 8) からの増幅により、プライマー-ZC29,157 (配列番号40) 及びZC29,150 (配列番号41) を用いて生成した。PCR反応条件は次の通りであった: 95°Cで1分、60°Cで1分及び72°Cで2分 (25サイクル) ; 72°Cで10分 (サイクル) ; 続いて4°Cでのソーキング。フラグメントを、FseI及びBglII制限エンドヌクレアーゼにより消化し、そして続いて、1 %ゲル電気泳動、及びQiaQuickゲル抽出キット (Qiagen) を用いてのバンド精製により精製した。得られる精製されたDNAを、FseI及びBglII部位のFc4 3' を含む、FseI及びBglIIにより前もって消化されたpEZE-2ベクター中に、室温で5時間、連結した。

【0433】

20 µlの連結混合物を、37 µlのDH10BエレクトロコンピテントE. コリ (Gibco) において、製造業者の説明書に従ってエレクトロポレートした。形質転換された細胞を、400 µlのLB培地に希釈し、そして100 µg/mlのアンピシリンを含むLBプレート上にプレートした。クローンを制限消化により分析し、そして陽性クローンをDNA配列決定のために送り、融合構造体の配列を確かめた。1 µlの陽性クローンを用いて、37 µlのDH10BエレクトロコンピテントE. コリを形質転換し、そしてLB/ampプレート上に画線培養した。単一のコロニーを、この画線培養されたプレートから、250mlのLB/amp培地に採取し、次に、250rpmで振盪しながら、37°Cで一晩、増殖せしめた。この培養物を、QiagenプラスミドMaxiキット (Qiagen) を用いて、750 µgの精製されたDNAを生成するために使用した。

【0434】

例 9. zcytor17可溶性受容体ポリペプチドのトランスフェクション及び発現

BHK 570細胞 (ATCC No. CRL-10314) , DG44 CHO, 又は他の哺乳類細胞を、800 µlの適切な血清フリー (SF) 培地 (例えば、DMEM、Gibco/BRL High Glucose) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) において、約 1.2×10^6 個の細胞/ウェル (6-ウェルプレート) でプレートする。細胞を、血清フリー (SF) 培地において、Lipofectin™ (Gibco BRL) を用いて、製造業者の説明書に従って、zcytor17 CEE, zcytor17 CFLG, zcytor17 CHIS又はzcytor17-Fc4 (例 8) を含む発現プラスミドによりトランスフェクトする。可溶性受容体を発現する単一のクローンを単離し、スクリーンし、そして細胞培養培地において増殖せしめ、そして標準の方法を用いて精製する。

【0435】

A. 可溶性ヒトzcytor17 CEE受容体の哺乳類発現:

BHK570細胞 (ATCC No: CRL-10314) を、T-75組織培養フラスコにプレートし、そしてDMEM/FBS培地 (DMEM、Gibco/BRL High Glucose, (Gibco BRL, Gaithersburg, MD)、5 %ウシ胎児血清、1mMのL-グルタミン (JRH Biosciences, Lenoex, KS) 、1mMのピルビン酸ナトリウム (Gibco BRL)) において、37°Cで5 %CO₂において、約50~70%の集密性まで増殖した。次に、細胞を、血清フリー (SF) 培地配合物 (DMEM、10mg/mlのトランスフェリン、5mg/mlのインスリン、2mg/mlのフェチン、1 %のL-グルタミン及び1 %のピルビン酸ナトリウム) において、Lipofectamine™ (Gibco BRL) を用いて、zcytor17CEE (例 8A) を含むプラスミドによりトランスフェクトした。

【0436】

10 µgのプラスミドDNA pZp9zcytor17CEE (例 8A) を、15mlの管中に希釈し、SF培地により500 µlの最終合計体積にした。50 µlのLipofectamineを、450 µlのSF培地と共に混合した。そのLipofectamine混合物を、DNA混合物に添加し、そして室温で約30分間インキュベートした。4mlのSF培地を、DNA : Lipofectamine混合物に添加した。細胞を5mlのSF培地により1度すすぎ、吸引し、そしてDNA : Lipofectamine混合物を添加した。細胞を37°Cで5時間インキュベートし、そして次に、5mlのDMEM/10%FBS培地を添加した。

【0437】

フラスコを37°Cで一晩インキュベートし、この後、細胞を、1 : 2、1 : 10及び1 : 50で、150mmのプレートに1 µMのメトトレキサート又は10 µMのメトトレキサート (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) を含む上記からの選択培地 (DMEM/PBS培地) 中に分けた。

トランスフェクションの約10日後、1 μ Mのメトトレキセート耐性コロニーの1つの150mmプレートを、トリプシン処理し、細胞をプールし、そして細胞の半分を10 μ Mのメトトレキセートに再プレートし、zcytor17CEEタンパク質の発現をさらに増殖した。この増幅された細胞のプールからのならし培地サンプルを、SDS-PAGE及びウェスタン分析を用いて、発現レベルについて試験した。

【0438】

B. 可溶性ヒトzcytor17-Fc4受容体の哺乳類発現：

20 μ gのpEZE-2hzcytor17Fc4プラスミドDNA（例8）の5個の複製体を、ベクター内を1度切断し、そして発現のために必要な遺伝子を妨げない制限酵素であるFspIによる制限消化により線状化した。200 μ gのCHO細胞ゲノムDNAを、キャリアーDNAとして個々の複製体に添加し、そして次に、DNAを、0.1体積の3Mの酢酸ナトリウム（pH5.2）及び2.2体積のエタノールの添加により沈殿せしめ、続いて4°Cでの15分間の氷インキュベーション及びマイクロ遠心分離を行った。得られるDNAペレットを、70%エタノールにより洗浄し、そして空気乾燥し、その後、100 μ lのタンパク質フリー（PF）CHO非選択増殖培地（21g/lのPF CHO Ex細胞325/200mMのL-グルタミン（Gibco）/100mMのピルビン酸ナトリウム（Gibco）/1 $\times$ HT Supplement（Gibco））に再懸濁した。

【0439】

1 $\times 10^7$ 個のPF CHO継代61細胞を、600 μ lのPF CHO非選択増殖培地におけるDNAに添加し、そして次に、0.4cmギャップGene Pulser（BioRad）エレクトロポレーションキュベットを用いて、950 μ Fのキャパシタンス及び300Kvを用いてのGene Pulser II Electroporation system（BioRad）においてエレクトロポレートした。エレクトロポレートされた細胞のすべての複製体を、プールし、そして、-HT培地（21g/lのPF CHO Ex細胞325/200mMのL-グルタミン（Gibco）/100mMのピルビン酸ナトリウム（Gibco））において直接的に選択した。

【0440】

細胞を-HT培地において5日間、選択し、その後、50nmのMTX選択のために4 $\times 10^5$ /mlで継代した。8日後、細胞を、200mMのMTX選択のために3.5 $\times 10^5$ 個の細胞/mlで接種した。1週間後、細胞を、1 μ MのMTX選択のために4 $\times 10^5$ /mlで接種した。1 μ MのMTXでの2週間後、細胞を、1 $\times 10^6$ 個の細胞/mlで50mlに接種し、ならし培地を生成した。得られる72時間のならし培地を、ヒトIgに対して生成された抗体によりウェスタンブロットをプローブすることによって分析した。細胞は、約1mg/lでhzcytor17/Fc4タンパク質を生成した。

【0441】

C. 可溶性ヒトzcytor17-Fc4受容体の大規模哺乳類発現：

200 μ gのpEZE-2hzcytor17Fc4プラスミドDNA（例8B）を、pEZE-2ベクター内を1度切断し、そして発現のために必要な遺伝子を妨げない制限酵素であるFspIによる制限消化により線状化した。200 μ gのCHOゲノムDNA（自家調製された）を、キャリアーDNAとして添加し、そして次に、DNAを、0.1体積の3Mの酢酸ナトリウム（pH5.2）及び2.5体積のエタノールの添加により沈殿せしめ、続いて室温でのマイクロ遠心分離を行った。5複製DNAペレットを製造し、そして形質転換した。得られるDNAペレットを、70%エタノールにより洗浄し、そして空気乾燥し、その後、100 μ lのPF CHO非選択増殖培地（21g/lのPF CHO Ex細胞325/200mMのL-グルタミン（Gibco）/100mMのピルビン酸ナトリウム（Gibco）/1 $\times$ HT Supplement（Gibco））に再懸濁した。

【0442】

10 $\times 10^6$ 個のPF CHO細胞を、600 μ lのPF CHO非選択増殖培地におけるDNAに添加し、そして次に、0.4cmギャップGene Pulser（BioRad）エレクトロポレーションキュベットを用いて、950 μ Fのキャパシタンス及び380Vを用いてのGene Pulser II Electroporationにおいてエレクトロポレートした。エレクトロポレートされた細胞を、プールし、そして-HT培地（21g/lのPF CHO Ex細胞325/200mMのL-グルタミン（Gibco）/100mMのピルビン酸ナトリウム（Gibco））において選択した。細胞を-HT培地において14日間、選択し、その後

、50nmのMTX選択のために 4×10^5 /mlで継代した。細胞を200nMのMTXで、及び次に $1 \mu\text{M}$ のMTXで増殖した。－HT, 50nM及び $1 \mu\text{M}$ のプールを、48時間、 1×10^6 /mlの接種し、そしてその得られるならし培地を、ヒトIgに対して生成された抗体によりウェスタンブロットをプローブすることによって分析した。

【0443】

例10. BHK570及びCHO細胞からのzcytor17可溶性受容体の精製

A. 可溶性ヒトzcytor17-Fc4受容体の過渡的哺乳類発現及び精製：

pEZE-2hzcytor17/Fc4プラスミドDNA（例11B）を、Lipofectamine（Gibco BRL）を用いて、本明細書に記載のようにして、及び製造業者の説明書に従って、BHK細胞の40maxiプレート中に導入した。細胞を一晩、回収し、すすぎ、そして血清フリー培地（自家製造されたSL7V4）を再供給した。72時間後、培地を集め、そして濾過し、そして細胞を血清フリー培地に再供給した。72時間後、培地を再び集め、そして濾過した。

10

【0444】

過渡的にトランスフェクトされたBHK細胞からの血清フリーならし培地（ $2 \times 1.5\text{L}$ のバッチ）を、20mMのトリス（pH7.5）、0.5MのNaClの溶液中、1.5mlのプロテインA-アガロースカラム上に供給した。カラムをこの緩衝液により集中的に洗浄し、そして次に、結合されたタンパク質を、1mlの0.2Mのグリシン（pH2.5）、0.5MのNaCl溶液により溶出した。溶出されたタンパク質を、0.1mlの2Mのトリス（pH8.5）中に集めた。

アリコートを、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のために集め、そして多量のzcytor17-Fcを、PBSに対して一晩、透析した。可溶性受容体を無菌濾過し、そして -80°C でアリコートで配置した。

20

【0445】

B. zcytor17-Fc4の精製：

組換えカルボキシル末端Fc4標識されたzcytor17（例8及び9）を、トランスフェクトされたCHO細胞から生成した。CHOトランスフェクションを、当業界において知られている方法を用いて行った。約5Lのならし培地を収穫し、そしてNalgene（ $0.2 \mu\text{m}$ ）フィルターを用いて無菌濾過した。

【0446】

タンパク質を、前記濾過された培地から、Poros50プロテインA親和性クロマトグラフィー（PerSeptive Biosystems, 1-5559-01, Framingham, MA）及びSuperdex200ゲル排除クロマトグラフィーカラム（Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ）の組合せにより精製した。培養培地を、約3～10ml/分の流速で、 $10 \times 70\text{mm}$ （5.5mlの層体積）のプロテインA親和性カラム上に直接的に負荷した。10カラム体積のPBSによるカラムの洗浄の後、結合されたタンパク質を、5カラム体積の0.1Mのグリシン（pH3.0）により、10ml/分で溶出した。それぞれ2mlの画分を、溶出されたタンパク質を中和するために、 $100 \mu\text{l}$ の2.0Mのトリス（pH8.0）を含む管中に集めた。

30

【0447】

親和性カラムからのサンプルを、クーマシー染色によるSDS-PAGE、及びウェスタンブロットにより、ヒトIg-HRPを用いて、zcytor17-Fc4の存在について分析した。zcytor17-Fc4含有画分をプールし、そしてBiomax-30濃縮機（Millipore）を用いて、1～2mlに濃縮し、そして $20 \times 580\text{mm}$ のSuperdex200ゲル濾過カラム上に負荷した。精製されたzcytor17-Fc4を含む画分をプールし、 $0.2 \mu\text{m}$ のフィルターを通して濾過し、それぞれ $100 \mu\text{l}$ にアリコートし、そして -80°C で凍結した。最終の精製されたタンパク質の濃度を、BCAアッセイ（Pierce, Rockford, IL）により決定した。

40

【0448】

C. zcytor17/Fc4のSDS-PAGE及びウェスタンブロット：

組換えzcytor17-Fc4を、クーマシー染色方法を用いてのSDS-PAGE（Nupage4-12%, invitrogen, Carlsbad, CA）及びヒトIg-HRPを用いてのウェスタンブロットにより分析した。ならし培地又は精製されたタンパク質のいずれかを、Invitrogen Novex's Xcell II mini-cellを用いて電気泳動し、そして装置のマニュアルに提供される指針に従って、Nov

50

ex's Xcell IIプロットモデルを用いて室温でニトロセルロース (0.2mm; Invitrogen, Carlsbad, CA) に、攪拌しながらトランスファーした。トランスファーを、25mMのトリス塩基、200mMのグリシン及び20%メタノールを含む緩衝液において、500mAで1時間、行った。次に、フィルターを、PBS中、10%脱脂粉乳により、室温で10分間、ブロックした。

【0449】

ニトロセルロースをすばやくすすぎ、次にヒトIg-HRP抗体 (1:2000) を、2.5%の脱脂粉乳を含むPBSに添加した。プロットを、軽く振盪しながら、室温で2時間、又は4℃で一晩インキュベートした。インキュベーションに続いて、プロットを、それぞれPBSにより10分間、3度、洗浄し、次に水により、すばやくすすいだ。プロットを、市販の化学ルミネセント基質試薬 (1:1で混合されたSuperSignal (商標) ULTRA試薬1及び2; Pierce, Rockford, ILから得られた試薬) を用いて進行せしめ、そしてシグナルを、Lumi-Imager's Lumi Analyst 3.0ソフトウェア (Boehringer Mannheim GmbH, Germany) を用いて、10秒~5分の範囲の暴露時間又は必要な時間、捕獲した。

【0450】

精製されたzcytor17-Fc4は、非還元条件下で約220kDaで、及び還元条件下で約120kDaで、クーマシー又は銀染色のいずれかにより単一バンドとして出現し、このことは、予測されるように、非還元条件下でzcytor17-Fc4の二量体形を示す。

【0451】

例11. 競争阻害アッセイにおけるzcytor17可溶性受容体zcytor17-Fc4可溶性受容体を用いてのアッセイ

BaF3/zcytor17/WSX-1/OSMR β 細胞又はBaF3/zcytor17/OSMR β 細胞を、回転沈降せしめ、そしてmIL-3フリー培地により洗浄した。細胞回転せしめ、そして3度、洗浄し、mIL-3の除去を確保した。次に、細胞を、血球計により計数した。細胞を、mIL-3フリー培地を用いて、ウェル当たり100 μ lの体積で、ウェル当たり5000個の細胞での96-ウェル形式プレートした。

【0452】

例5に記載される、CCRF-CEM及びCCRF-HSB2細胞活性化及びヒトCD3+選択された細胞からの両ならし培地を、1~10 μ g/mlでzcytor17可溶性受容体 (zcytor17-Fc4; 例9及び10を参照のこと) と共に又はそれを伴わないで、25%、12.5%、6.25%、3.125%、1.5%、0.75%、0.375%及び0.187%濃度で、別々の実験において添加した。合計のアッセイ体積は200 μ lであった。

【0453】

アッセイプレートを、37℃、5%CO₂で3~5日間インキュベートし、この時点でAlamar Blue (Accumed) を20 μ l/ウェルで添加した。プレートを再び、37℃、5%CO₂で16~24時間インキュベートした。プレートを、例2に記載のようにして、FmaxTM プレートリーダー (Molecular Devices) 上で読み取った、結果は、10 μ g/mlでのzcytor17-Fc4可溶性受容体による細胞増殖の部分的阻害を示し、このことは、個々のサンプルにおける因子がzcytor17受容体に対して特異的であることを確めた。

【0454】

可溶性受容体、又はzcytor17/OSMR β 及びzcytor17/WSX-1を含んで成る可溶性受容体ヘテロダイマーを希釈する滴定曲線はまた、zcytor17受容体が例えば低いか又は生理学的濃度で、増殖を完全に阻害することができるかどうかを決定するために、上記で言及されたアッセイを用いて実施される。

類似する競争阻害アッセイを、ルシフェラーゼアッセイ (例20) において精製されたヒトzcytor17lig (例35) 及び可溶性受容体を用いて、実施した。その結果は、ホモダイマーzcytor17及びヘテロダイマーzcytor17/OSMR β の両者がzcytor17ligの活性を阻害できることを示す。

【0455】

例12. 分泌トラップアッセイ

分泌トラップアッセイを用いて、zcytor17受容体を含んで成る受容体、例えばzcytor17

10

20

30

40

50

受容体、又はzcytor17/ OSMR β 及びzcytor17/ WSX-1を含んで成る受容体ヘテロダイマーへのzcytor17ligの結合を試験する。zcyor17ligプラスミドDNAを、COS細胞中にトランスフェクトし、そして下記のようにして、分泌トラップにより、zcytor17受容体を含んで成る受容体へのzcytor17ligの結合を評価するために使用する。

【0456】

A. COS細胞トランスフェクション：

COS細胞トランスフェクションを次の通りに行った： 800ngのzcytor17lig DNA及び4 μ lのリポフェクタミンTMを、80 μ lの血清フリーDMEM培地（500mlのDMEM中、55mgのピルビン酸ナトリウム、146mgのL-グルタミン、5mgのトランスフェリン、2.5mgのインスリン、1 μ gのセレンウム及び5mgのフェテュイン）において、混合し、そして室温で30分間インキュベートした。次に、320 μ lの血清フリーDMEM培地を添加した。この500 μ lの混合物を、 2×10^5 個の細胞/ウェルで12-ウェル組織培養プレート上にプレートし、そして37°Cで5時間インキュベートした。追加の500 μ lの20%FBS DMEM培地（500mlのDMEM中、100mlのFBS、55mgのピルビン酸ナトリウム及び146mgのL-グルタミン）を添加し、そしてプレートを一晩インキュベートした。

【0457】

B. 分泌トラップアッセイ：

分泌トラップを次の通りに行なった：培地を、PBSによりすすぎ、細胞を除き、そしてPBS中、1.8%ホルムアルデヒドにより15分間、固定した。次に、細胞を、PBS/ 1%BSAにより洗浄し、そしてPBS中、0.1%Triton-Xにより15分間、透過せしめ、そして再び、PBS/ 1%BSAにより洗浄した。細胞を、PBS/ 1%BSAにより1時間、阻止した。可溶性受容体の使用に依存して、細胞を、次のものと共に、TNBにおいて1時間インキュベートする：（A）1～3 μ g/mlのzcytor17可溶性受容体zcytor17-Fc4融合タンパク質（例10）；又は（B）1～3 μ g/mlのzcytor17/OSMR β 可溶性受容体タンパク質。

【0458】

次に細胞をTNTにより洗浄する。可溶性受容体の使用に依存して（例えば、Fc4標識（配列番号37）、C-末端FLAG標識（配列番号36）又はCEE標識（配列番号32；35）によりラベルされる場合）、細胞を、TNB中、次のものと共にさらに1時間インキュベートする：（A）1：200に希釈された抗-Glu Glu抗体-HRP；又は（D）1：300に希釈されたストレプトビジン-HRP（NENキット）。再び細胞をTNTにより洗浄する。

【0459】

陽性結合フルオレセインを検出するために、チラミド試薬を、希釈緩衝液（NENキット）において1：50に希釈し、そして4～6分間インキュベートし、そしてTNTにより洗浄する。細胞を、TNTにより1：5に希釈されたVectashield Mounting Media（Vector Labs Burlingame, CA）により保存する。細胞を、蛍光顕微鏡上で、FITCフィルターを用いて可視化する。このアッセイの結果は、ヒトzcytor17ligがいずれの可溶性受容体に結合しないことを示した。それらのデータは、zcytor17ligの構造が、それは明確に、細胞表面受容体に結合できるので、このプロトコールにおける固定化段階に対して敏感であることを示す（例えば、下記例39に提供される流動細胞計測データを参照のこと）。

【0460】

例13. zcytor17ligについての遺伝子配列の染色体割り当て及び配置

zcytor17lig遺伝子配列を、市販のStanford G3 Radiation Hybrid Mapping Panel（Research Genetics, Inc. Huntsville, AL）を用いて、染色体12にマッピングした。そのStanford G3 RH Panelは、完全なヒトゲノムの83の放射線ハイブリッドクローンの個々からのDNA、及び2種の対照DNA（RM ドナー及びA3受容体）を含む。公開されているWWWサーバー（例えば、Stanford University）は、マーカー及び遺伝子の染色体局在化を可能にする。

【0461】

Stanford G3 RH Panelによるzcytor17ligのマッピングのために、20 μ lの反応体をPCRのために適合する96-ウェルマイクロタイタープレート（Stratagene, La Jolla, CA）に

提供し、そして”RoboCycler Gradien 96” 熱サイクラー (Stratagene) において使用した。個々の95のPCR反応体は、2 μ lの10 $\times$ PCR反応緩衝液 (Qiagen, Inc., Valencia, CA)、1.6 μ lのdNTP混合物 (それぞれ2.5mM、PERKIN-ELMER, Foster City, CA)、1 μ lのセンスプライマー、ZC41,458 (配列番号42)、11 μ lのアンチセンスプライマー、ZC41,457 (配列番号43)、2 μ lのRediLoad (Research Genetics, Inc. Huntsville, AL)、0.4 μ lのQiagen HotStarTaq DNA ポリメラーゼ混合物 (5単位/ μ l)、25ng の個々のハイブリッドクローン又は対照からのDNA、及び20 μ lの合計体積のための蒸留水から構成された。反応を同量の鉱油により被覆し、そして密封した。

【0462】

PCRサイクラー条件は次の通りであった：95 $^{\circ}$ Cで15分間の変性、初期の1サイクル、95 $^{\circ}$ Cで45秒間の変性、53 $^{\circ}$ Cで1分間のアニーリング及び72 $^{\circ}$ Cで1分間の延長、35サイクル、続いて72 $^{\circ}$ Cで7分間の延長、最終の1サイクル。反応を、2%アガロースゲル上で電気泳動により分離し (EM Science, Gibbstown, NJ)、そして臭化エチジウムによる染色により可視化した。

【0463】

結果は、11以上のKOD評点を伴って、及びマーカーから17cR_1000の距離で、染色体2マーカーSHGC-83339へのzcytor17lig遺伝子配列の連鎖を示した。このマーカーは、12q24.31染色体領域におけるzcytor17lig遺伝子を位置決定する。

【0464】

例14. ネズミzcytor17ligの同定及びクローニング

A. 十分な長さのネズミzcytor17ligの同定：

社内DNAデータベースへの質問のためにヒトzcytor17ligペプチド配列 (配列番号12) を用いて、Genbank受託番号AK005939号のネズミcDNAを、ネズミzcytor17ligのための可能性ある部分配列として同定した。AK005939号のcDNA配列を用いて、ネズミゲノムフラグメントを含むデータベースを調べた。ネズミzcytor17ligのゲノムコンチグ (contig) をアセンブルした (配列番号76)。プログラムGenscanによるゲノムフラグメントに対するコード能力の予測は、ヒトzcytor17ligと同じ遺伝子構造を有する有力なcDNA配列を示したネズミcDNA配列は、配列番号10で示され、そして対応するポリペプチド配列は配列番号11で示される。

【0465】

B. マウス精巣cDNAライブラリーからのマウスzcytor17ligのPCRによるクローニング：

ゲノム配列 (配列番号76) に基づいて、2種のPCRプライマーを企画し、そしてPCRによりマウスzcytor17ligのcDNA源を同定するために使用した。それらのプライマーZC41498 (配列番号86) 及びZC41496 (配列番号87) を、マウス配列の推定上の5' 及び3' 未翻訳領域 (配列番号76及び10) に対して企画した。いくつかのcDNA源、例えばMarathon-ready cDNA (Clontech) 及び局所的に製造されたcDNAライブラリーのアリコート、PCRによりスクリーンした。生成物を、1%アガロースゲル上で可視化した。

【0466】

予測されるサイズのコンドが、マウス精巣cDNAライブラリー鋳型を用いての反応において観察された。それらのPCR反応は、製造業者の推薦に従って、pfu turboポリメラーゼ (Stratagene) を用いて、10%DMSOを伴って又は伴わないで約50 μ lの体積で、及びほとと開始50sを用いてワックスホットスタート (Molecular Bioproducts, Inc. San Diego, CA) の追加の適用を伴って、都合よく行われた。PCRサーモサイクリングを次のように行った：94 $^{\circ}$ Cで4分 (1サイクル)；続いて94 $^{\circ}$ Cで30秒、48 $^{\circ}$ Cで30秒、72 $^{\circ}$ Cで50秒 (40サイクル)；72 $^{\circ}$ Cで7分の追加の最終拡張。2種のPCR反応をプールし、そして低溶融アガロース及びGelaseアガロース消化酵素 (Epicenter, Inc. Madison, WI) を用いて、その製造業者の推薦に従って精製した。

【0467】

それらのPCR生成物のDNA配列決定は、配列番号10と同一のORFを含んで成るネズミzcytor17 cDNA配列 (配列番号90) を表し、これは、配列番号10がマウスzcytor17ligポリペプ

10

20

30

40

50

チドをコードすることを確めた。次に、PCRプライマーZC41583（配列番号88）及びZC41584（配列番号89）を用いて、mcytor17lig読み取り枠及び終結コドン（配列番号92）に、FseI及びAscI制限部位及び部分Kozak配列を付加した。Robocycler40サーモサイクラー（Stratagene）を用いて、次の通りに、アニーリング温度及びサイクリングの温度グラジエントを行った。Pfuターボポリメラーゼ（Stratagene）を、上記のようにして、但し10%DMSOにおいてのみ適用した。

【0468】

サイクリングを、次のように行った：94℃で4分（1サイクル）；続いて94℃で30秒、65℃～51℃でのグラジエント、30秒、72℃で1分（20サイクル）；及び72℃で7分の1回の拡張。この第2のサーモサイクリング反応のための鋳型は、上記の1 µlの初期ゲル精製されたmcytor17lig PCR生成物であった。3種の最低温度反応からの得られるPCR生成物をプールし、そして上記のGelase（Epicenter）方法を用いて精製した。この精製されたmcytor17ligを、FseI及びAscIにより消化し、そしてそのクローニング部位にFseI及びAscI部位を有するよう修飾されたpZP7Xベクターに連結した。

【0469】

プラスミドpZP7Xは、マウスメタロチオネイン-1（MT-1）プロモーター、コード配列の挿入のため複数制限部位、及びヒト成長ホルモントerミネーターを有する発現カセットを含む哺乳類発現ベクターである。プラスミドはまた、複数のE.コリ起点、SV40プロモーター、エンハンサー及び複製の起点を有する哺乳類選択マーカー発現単位、DHFR遺伝子、及びSV40ターミネーターを有する。クローン化されたネズミcDNA配列は、配列番号90で表され、そしてその反応するポリペプチド配列は、配列番号91（配列番号11と同一である）で示される。

【0470】

例15. 活性化されたマウス脾臓ライブラリーからのマウスzcytor17lig cDNAクローンの単離

A. マウスzcytor17ligを単離するために使用されるネズミ一次源：

Balb/Cマウスからのマウス脾臓を集め、そして細胞懸濁液を創造するために、フロスト仕上げの末端スライド間で押しつぶす。単離された一次マウス細胞収量は、下記選択の前、約 6.4×10^8 個の細胞であることが予測される。

脾臓細胞を、9.6mlのMACS緩衝液（PBS, 05%EDTA, 2mMのEDTA）に懸濁する。1.6mlの細胞懸濁液を除き、そして0.4mlのCD90（Thy1.2）マイクロビーズ（Miltenyi Biotec）を添加する。この混合物を、4℃で15分間インキュベートする。CD90ビーズによりラベルされたそれらの細胞を、30mのMAGS緩衝液により洗浄し、そして次に、2mlのMACS緩衝液に再懸濁する。

【0471】

VS+カラム（Miltenyi）を、その製造業者の説明書に従って調製する。次に、VS+カラム、VrioMACS™ 磁気場（Miltenyi）に配置する。カラムを、5mのMACS緩衝液により平衡化する。次に単離された一次マウス細胞をカラムに適用する。CD90陰性細胞を通す。カラムを、9ml（3×3ml）のMACS緩衝液によりすすぎ、次に、カラムを磁気から除去し、そして15mlのファルコン管上に配置する。CD90+細胞を、カラムに5mlのMACS緩衝液を添加することにより溶出し、そして結合された細胞を、製造業者により提供されるプランジャーを用いてフラッシュする。CD90磁気ビーズと共に細胞のインキュベーション、洗浄及びVS+カラム段階（溶出を通してのインキュベーション）を、さらにもう1度、反復する。2カラム分離からの得られるCD90+画分をプールする。CD90+選択されたマウス脾臓細胞の収量は、合計的 1×10^8 個の細胞であることが予測される。

【0472】

プールされたCD90+選択されたマウス細胞のサンプルを、それらの純度を評価するために、染色及び蛍光抗体細胞ソーター（FACS）上での分類のために除去する。PE-接合されたハムスター抗マウスCD3ε抗体（PharMingen）を、CD90+選択された細胞の染色及び分類のために使用する。マウスCD90+選択された細胞は約93%のCD3+細胞であり、細胞が

92%のT-細胞であることを示唆する。

【0473】

ネズミCD90+選択された細胞を、RPMI+5%FBS+PMA10ng/ml及びイノマイシン0.5 µg/ml (Calbiochem)において、 3×10^6 個の細胞/mlを、37°Cで一晩インキュベートすることにより活性化する。それらの活性化されたCD90+選択されたマウス細胞からの上清液を、下記のようにしてzcytor17lig活性について試験する。さらに、その活性化されたCD90+選択されたマウスを用いて、下記例16に記載のようにして、cDNAライブラリーを調製する。

【0474】

例16. マウスCD90+選択された細胞ライブラリーからのマウスzcytor17ligのクローニング

10

一次マウス活性化されたCD90+選択された細胞cDNAライブラリーのスクリーニングは、ヒトzcytor17ligのマウスオルト体をコードする4-ヘリックス束のサイトカインファミリーの新規メンバーである単離されたcDNAを示すことができる。cDNAは、ハイブリダイゼーションスクリーニングにより同定される。

【0475】

A. CD90+選択されたライブラリー構成のためのベクター：

ベクターpZP7Nを、CD3+選択されたライブラリー構成のために使用する（例6Aを参照のこと）。

【0476】

20

B. 一次マウス活性化されたCD90+選択された細胞cDNAライブラリーの調製：

イノマイシン/PMAにおいて刺激された、約 1.5×10^8 個の一次マウスCD90+選択された細胞（例15）を、遠心分離により単離する。全RNAを細胞ペレットから単離し、そして例6Bに記載のようにして、二本鎖cDNAに転換する。続いて、このDNAを、例6Bに記載のようにして、BHK細胞中にトランスフェクトし、そして増殖を、“Alamar blue” 蛍光アッセイ（例2B）を用いて評価する。

【0477】

分泌トラップクローニングによるライブラリーのスクリーニングのためには、ライブラリーの複雑な増幅された形が、COS-7細胞をトランスフェクトするために必要とされる。 4.8×10^6 個のクローンを、100 µg/mlのアンプシリン、10 µg/mlのメチシリンにより補充された110の15cm LB寒天プレート上にプレートする。37°Cで一晩、プレートを増殖した後、細菌を削り取ることで回収し、そしてペレット化する。プラスミドDNAを、Nucleobond-gigaTM (Clontech)を用いて、その製造業者の説明書に従って、ペレット化された細菌から抽出する。次に、このプラスミドを用いて、スライド上にCOS-7細胞をトランスフェクトし、そして下記分泌技法（例17）を用いてスクリーンする。

30

【0478】

C. 活性化されたマウスcDNAライブラリーのスクリーニング：

約 5×10^5 個のクローンを、10のLB/Amp Maxiプレート上にプレートする。コロニーを、持ち上げ、変性し、中和し、そして標準の方法（Sambrook, J. など., 前記）を用いて架橋する。50ngの300bpの5' RACE PCRフラグメント（例14）を、Prime-Itr RmTランダムプライマーラベリングキット（Stratagene）を用いて、³²Pによりラベルする。10のフィルターを、このラベルされたプローブにより、ExpressHybTM ハイブリダイゼーション溶液（Clontech）を用いて、65°Cで一晩ハイブリダイズする。

40

【0479】

次に、フィルターを、0.2×SSC（30mMのNaCl, 3mMのクエン酸ナトリウム、pH7.0）0.1% SDSにより60°Cで1時間、3度；及び65°Cで1時間、連続的に洗浄する。フィルターを、80°Cで一晩、暴露し、そしてX-線フィルムを現像する。陽性コロニーを含む寒天プラグを引き寄せ、そしてクローンを10-cmのLB/Ampプレート上にプレートする。次に、コロニーを、フィルター上に持ち上げ、そして再び、上記と同じ方法に従ってハイブリダイズする。単一のDNAクローンを単離し、そして標準の方法を用いて配列決定し、マウスcDNA

50

を同定する。

【0480】

例17. マウスzcytor17ligは、分泌トラップアッセイにおいてヒトzcytor17可溶性受容体に結合しない

マウスクローンmzcytor17lig/pZP7を、COS細胞中にトランスフェクトし、そしてzcytor17含有可溶性受容体（ヒトzcytor17可溶性受容体zcytor17-Fc4）（例10）又は可溶性受容体ヘテロダイマー（zcytor17/WSX-1又はBaF3/zcytor17/OSMR β ）の前記トランスフェクトされたCOS細胞への結合を、分泌トラップアッセイ（例12）により試験した。このアッセイは、マウスzcytor17ligがヒトzcytor17可溶性受容体に結合しないことを確めた。

COS細胞トランスフェクションを、約0.7 μ gのマウスzcytor17lig cDNA（例16）を用いて、例12に従って行った。

10

【0481】

分泌トラップを、例えばTNB中、1 μ g/mlのzcytor17可溶性受容体Fc4融合タンパク質（例10）（又は、本明細書に記載されるようなzcytor17含有可溶性受容体ヘテロダイマー）、及び検出可能な抗のための、TNB中、1：200に希釈されたヤギー抗-ヒトIg-HRP（Fc特異的）を用いて、例12に従って行った。調製され、固定された細胞への可溶性ヒトzcytor17受容体の陽性結合は、例12に従って、フルオレセインチラミド試薬により検出されなかった。細胞を、例12に従って、保存し、そして可視化した。

結果は、マウスzcytor17ligがヒトzcytor17可溶性受容体（又は本明細書に記載されるようなzcytor17含有可溶性受容体ヘテロダイマー）に結合しないことを示した。

20

【0482】

例18. 哺乳類細胞におけるマウスzcytor17ligの発現

マウスzcytor17ligの哺乳類発現：

BHK570細胞（ATCC No. CRL-10314）を、10cmの組織培養皿にプレートし、そして37°C、5%CO₂で一晩、DMEM/FBS培地[（DMEM, Gibco/BRL High Glucose 培地；Gibco BRL, Gaithersburg, MD）、5%ウシ胎児血清（Hyclone, Logan, Ut）、1mMのL-グルタミン（JRH Biosciences, Lenexa, KS）、1mMのピルビン酸ナトリウム（GibcoBRL）]において、約20%の集密性まで増殖した。次に、細胞を、哺乳類安定性リポフェクタミン（GibcoBRL）トランスフェクションキットを用いて、その製造業者の説明書に従って、プラスミドmzcytor17lig/pZP7X（例14）によりトランスフェクトした。

30

【0483】

トランスフェクトの1日後、細胞を、150mmのプレートにおける選択培地（1 μ Mのメトトレキセートを含むDMEM/FBS（Sigma Chemical Co., St. Louis, MO））中に、1：10及び1：20で分離した。細胞上の培地を、トランスフェクションの5日後、新鮮な選択培地により交換した。トランスフェクションの約10日後、メトトレキセート耐性コロニーを、トリプシン処理し、そして細胞をプールし、そして大規模培養フラスコ中にプレートした。細胞が約90%の集密性に増殖されるとすぐに、それらをPBSにより3度すすぎ、そして血清フリーのESTEP2培地（DMEM（GibcoBRL）、0.11g/Lのピルビン酸ナトリウム、3.7g/Lの炭酸水素ナトリウム、2.5mg/Lのインスリン、5mg/Lのトランスフェリン、pH7.0）により培養した。ならし培地を、3日後に集め、そして下記例19に記載される、Alamar Blueを用いてBaF3増殖アッセイ中に導入した。

40

【0484】

例19. マウスzcytor17ligはAlamar Blueを用いてのBaF3アッセイにおけるヒトzcytor17受容体を活性化しない

BaF3/zcytor17, BaF3/zcytor17/OSMR β 及びBaF3/zcytor17/WSX-1細胞（例4及び5B）の増殖を、マウスzcytor17ligを発現するBHK細胞（例18）からの血清フリーならし培地を用いて評価した。

【0485】

BaF3/zcytor17, BaF3/zcytor17/OSMR β 及びBaF3/zcytor17/WSX-1細胞を、例5Bに記載のようにして、回転沈降し、洗浄し、そしてmIL-3フリー培地にプレートした。マウスzcyto

50

r17ligを発現するBHK細胞（例18）からのならし培地を、mIL-3フリー培地により、50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%, 1.5%, 0.75%及び0.375%濃度に希釈した。増幅アッセイを、例5Bに従って行った。このアッセイの結果は陰性であり、このことはマウスzcytor17ligがヒトzcytor17, zcytor17/OSMR β 又はzcytor17/WSX-1受容体複合体を活性化しないことを示唆する。

【0486】

例20. ヒトzcytor17ligはルシフェラーゼアッセイにおいてヒトzcytor17/OSMR β 受容体を活性化する

A. BaF3/KZ134/ zcytor17細胞系の構成：

KZ134プラスミドは、次の4種の遺伝子からのSTAT転写因子結合要素を含む相補的オリゴヌクレオチドZC12,749配列番号44)及びZC12,748(配列番号45)により構成されたKZ134プラスミドから構成され：修飾されたc-fos Sis誘発性要素(m67SIE又はhSIE)(Sadowski, H. など., Science 261: 1739-1744, 1993)、p21 WAF1遺伝子からのp21 SIE1(Chin, Y. など., Science 272: 719-722, 1996)、 β -カゼイン遺伝子の乳腺応答要素(Schmitt-Ney, M. など., Mol. Cell. Biol. 11: 3745-3755, 1991)、及びFc γ RI遺伝子のSTAT誘発性要素(Seidel, H. など., Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 3041-3045, 1995)。

【0487】

それらのオリゴヌクレオチドは、Asp718-XhoI適合性末端を含み、そして同じ酵素により消化されたc-Fosプロモーター(Poulsen, L.K. など., J. Biol. Chem. 273: 6229-6232, 1998)を有し、そしてネオマイシン選択マーカを含む受容体ホタルルシフェラーゼレポーターベクター中に、標準の方法を用いて連結された。KZ134プラスミドを用いて、BHK又はBaF3細胞を標準のトランスフェクション及び選択方法により安定してトランスフェクトし、BaF3/KZ134細胞系を製造する。

【0488】

十分な長さのzcytor17又はzcytor17/OSMR β 受容体を発現する安定したBaF3/KZ134インジェクター細胞系を、例4に従って構成した。クローンを希釈し、プレートし、そして標準の技法を用いて選択した。クローンを、ヒトzcytor17ligならし培地インジェクターとしての精製されたzcytor17ligタンパク質(下記例35を参照のこと)を用いて、ルシフェラーゼアッセイ(下記例20Bを参照のこと)によりスクリーンした。最高のルシフェラーゼ応答(STATルシフェラーゼを通して)及び最低のバックグラウンドを有するクローンを選択した。安定したトランスフェクト細胞系を選択した。それらの細胞系は、それらの細胞系中にトランスフェクトされた受容体に依存して、BaF3/ KZ134/zcytor17又はBaF3/ KZ134/zcytor17/OSMR β と呼ばれた。

【0489】

同様に、BHK細胞系をまた、本明細書に記載される方法を用いて構成し、そして本明細書に記載されるルシフェラーゼアッセイに使用した。それらの細胞系を、それらの細胞系中にトランスフェクトされた受容体に依存して、BHK/ KZ134/ zcytor17又はBHK/ KZ134/zcytor17/ OSMR β と呼ばれた。

【0490】

B. ヒトzcytor17ligはBaF3/ KZ134/zcytor17/OSMR β 又はBHK/ KZ134/ zcytor17/ OSMR β ルシフェラーゼアッセイにおいてヒトzcytor17受容体を活性化する：

BHK/ KZ134/ zcytor17又はBaF3/ KZ134/zcytor17/OSMR β 細胞を、回転沈降し、そしてmIL-3フリー培地により洗浄した。細胞を回転せしめ、そして3度、洗浄し、mIL-3の除去を確認した。次に、細胞を血球計により計数した。細胞を、mIL-3フリー培地を用いてウェル当たり100 μ lの体積で、約30,000個の細胞/ウェルで96-ウェル形にプレートした。同じ方法を、続くアッセイにおいて対照として使用するために、トランスフェクトされていないBaF3/KZ134細胞に関して使用した。BHK/ KZ134/ zcytor17又はBHK/ KZ134/ zcytor17/ OSMR β 細胞を、100 μ lの培地において15,000個の細胞/ウェルで96ウェル形にプレートした。親BHK/KZ134細胞を対照として使用した。

【0491】

BaF3/ KZ134/zcytor17、BHK/ KZ134/ zcytor17/ OSMR β 、BHK/ KZ134/ zcytor17又はBHK/ KZ134/ zcytor17/ OSMR β 細胞のSTAT活性化を、次のものを用いて評価した：（１）ヒトzcytor17ligによりトランスフェクトされたBHK570細胞からのならし培地（例 7）、（２）マウスzcytor17ligによりトランスフェクトされたBHK570細胞からのならし培地（例 7）、（３）精製されたヒトzcytor17lig（例35）、又は（４）培地のみの対照応答を測定するためのmIL-3フリーの培地。ならし培地を、RPMI mIL-3フリー培地により、50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%, 1.5%, 0.75%及び0.375%の濃度に希釈した。精製されたヒトzcytor17ligを、1200, 600, 300, 150, 75, 37.5, 18.75又は9.4pMの濃度に希釈した。

【0492】

100 μ lの希釈されたならし培地又はタンパク質を、BaF3/ KZ134/zcytor17、BaF3/ KZ134/zcytor17/OSMR β 、BHK/ KZ134/ zcytor17又はBHK/ KZ134/ zcytor17/ OSMR β 細胞に添加した。ならし培地を用いてのアッセイを、対照としてのトランスフェクトされていないBaF3/KZ134又はBHK/KZ134細胞に対して同時に行った。合計のアッセイ体積は200 μ lであった。アッセイプレートを、37°C、5%CO₂で24時間インキュベートし、この時点、BaF3細胞を、2000rpmでの10分間の遠心分離によりペレット化し、そして培地を吸引し、そして25 μ lの溶解緩衝液（Promega）を添加した。BHK細胞系に関しては、遠心分離段階は、細胞が付着性であるので、必要でない。室温での10分後、プレートは、40 μ lのルシフェラーゼアッセイ基質（Promega）を、5秒の組込みで添加された発光計（Labsystems Luminoskan, モデルRS）上でそれらを読み取ることによって、STATレポーター構造体の活性化について測定された。

【0493】

このアッセイの結果は、BaF3/ KZ134/zcytor17細胞、BaF3/ KZ134/zcytor17細胞又はトランスフェクトされないBaF3/KZ134又はBHK/KZ134対照細胞のいずれかに比較して、ヒトzcytor17ligに対するBaF3/ KZ134/zcytor17/OSMR β 及びBaF3/ KZ134/zcytor17/ OSMR β 細胞のSTATレポーター応答が、その応答がzcytor17/OSMR β 受容体を通して介在されることを示したことを確認した。この結果はまた、マウスzcytor17ligがヒト受容体複合体を通してSTATレポーターアッセイを活性化しないことを示した。

【0494】

例21. マウスzcytor17ligはマウス骨髄アッセイにおいて活性的である

A. 非付着性低密度骨髄細胞の同定：

新鮮なマウス大腿骨吸引物（骨髄）を、生後6～10週の雄Balb/C又はC57BL/6マウスから得る。次に、骨髄を、RPMI+10%FBS（JRH, Lenexa KS; Hyclone, Logan UT）により洗浄し、そして完全な骨髄細胞を懸濁液としてRPMI+10%FBSに懸濁する。次に、完全な骨髄細胞懸濁液を、密度グラジエント（Nycoprep, 1.077, Animal; Gibco BRL）にゆだね、次のようにして、低密度の、ほとんど単核の細胞のために富化する：完全な骨髄細胞懸濁液（約8ml）を、15mlの円錐形管における約5mlのNycoprepグラジエント溶液の上部にピペットにより注意して取り、そして次に、600×gで20分間、遠心分離する。

【0495】

次に、低密度単核細胞を含む界面層を除き、過剰のRPMI+10%FBSにより洗浄し、そして400Xgでの5～10分間の遠心分離によりペレット化する。このペレットを、RPMI+10%FBSに再懸濁し、そして約10⁶個の細胞/mlでT-75フラスコにプレートし、そして37°C、5%CO₂で約2時間インキュベートする。懸濁液におけるその細胞は、非付着性低密度（NALD）骨髄細胞である。

【0496】

B. 96-ウェルアッセイ：

NALDマウス骨髄細胞を、RPMI+10%FBS+1ng/mlのマウス幹細胞因子（mSCF）（R&D Systems, Minneapolis, MN）+次の1つからの5%ならし培地を含む96ウェル組織培養プレートに、25,000～45,000個の細胞/ウェルでプレートする：（１）マウスzcytor17ligを発現するBHK 570細胞（例18）、（２）ヒトzcytor17ligを発現するBHK 570細胞（例 7）、又は（３）ベクターを含み、そしていずれのリガンドも発現しない対照BHK 570細胞。

【0497】

次に、それらの細胞を、種々のサイトカイン処理にゆだね、骨髓からの造血細胞の拡張又は分化について試験する。試験に関しては、プレートされたNALDマウス骨髓細胞を、ヒトインターロイキン-15 (hIL-15) (R&D Systems), 又は他のサイトカインのパネルの1つ (R&D Systems) にゆだねる。hIL-15又は他のサイトカインの一連の希釈溶液、すなわち約50ng/ml～約0.5ng/mlの濃度の一連の二倍希釈溶液を試験する。8～12日後、96-ウェルアッセイを、例5Bに記載されるようにAlamar Blueアッセイにより、細胞増殖について評点を付ける。

【0498】

C. 96-ウェルNALDマウス骨髓アッセイからの結果：

マウス及びヒトzcytor17ligを発現するBHK細胞からのならし培地は、対照のBHKならし培地に比較して、単独で、又はNALDマウス骨髓における他のサイトカインと共に、相乗的に、造血細胞集団の拡張を促進することができる。他のサイトカインを伴って、又はそれを伴わないでマウスzcytor17ligにより拡張された造血細胞集団、及び他のサイトカインを伴って、又はそれを伴わないでヒトzcytor17ligにより拡張されたそれらの造血細胞はさらに、細胞培養において増殖される。それらの造血細胞を、フィコエリトリンによりラベルされた抗-Pan NK細胞抗体 (RharMingen) により染色し、そして流動細胞計測分析にゆだね、これは、拡張された細胞がこの天然のキラー (NK) 細胞マーカーを、陽性的に染色したことを示した。同様に、他の特異的造血細胞マーカーは、例えばCD4+又はCD8+ T細胞集団、B細胞及び他の免疫細胞マーカーの拡張を決定するために使用され得る。

【0499】

同じ96-ウェルアッセイを、Poietic Technologies, Gaithersburg, MDから購入された新鮮なヒト骨髓細胞を用いて行う。再び、陽性結果は、zcytor17ligが単独で、又は他のサイトカイン、すなわちマウス及びヒトzcytor17ligと共に相乗的に、上記に開示されるように、特異的細胞マーカーに対して陽性的に染色される造血細胞集団を拡張できることを示す。

【0500】

例22. zcytor17ligトランスジェニックマウスを生成するための構造体

A. MT-1プロモーターからヒトzcytor17ligを発現するための構造体：

コンセンサスKozak配列及びヒトzcytor17ligコード領域を含むPCRフラグメントを生成するようオリゴヌクレオチドを企画する。それらのオリゴヌクレオチドを、(a) pMT12-8 (本発明者の標準のトランスジェニックベクター、又は(b) pKF051 (リンパ特異的トランスジェニックベクター (例22B) 中へのクローニングを促進するために、5'末端でのFseI部位及び3'末端でのAscI部位を有するよう企画する。

【0501】

PCR反応を、200ngのヒトzcytor17lig鋳型 (配列番号1)、及び十分な長さ又は活性部分のzcytor17ligを増幅するよう企画されたオリゴヌクレオチドにより行う。PCR反応条件を、当業界において知られている方法を用いて決定する。PCR生成物を、アガロースゲル電気泳動により分離し、そしてQiaQuickTM (Qiagen) ゲル抽出キットを用いて精製する。単離された、正しいサイズのDNAフラグメントを、FseI及びAscI (Boehringer-Mannheim) により消化し、エタノール沈殿し、そしてFseI及びAscIにより前もって消化されたpMT12-8中に連結する。トランスジェニックマウスにおける肝臓及び他の組織における興味ある遺伝子を発現するよう企画されたpMT12-8プラスミドは、10kbのMT-1 5' DNA及び7kbのMT-1 3' DNAを両端に有する発現カセットを含む。発現カセットは、MT-1プロモーター、ラットインスリンIIイントロン、所望するクローンの挿入のためのポリリンカー及びヒト成長ホルモン (hGH) ポリA配列を含んで成る。

【0502】

約1 µlの個々の連結反応を、DH10B ElectroMaxTM コンピテント細胞 (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) 中に、その製造業者の説明書に従ってエレクトロポレートし、そして100 µg/mlのアンピシリンを含むLBプレート上にプレートし、そして一晩インキュベートする

。コロニーを採取し、そして100 µg/mlのアンピシリンを含むLB培地において増殖する。ミニプレブDNAを、前記採取されたクローンから調製し、そしてEcoRIのみ、又は組み合わされたFseI及びAscIによる制限消化及び続くアガロースゲル電気泳動によりヒトzcytor17lig挿入体についてスクリーンする。

【0503】

正しいpMT-ヒトzcytor17ligの最大調製を行う。5'及び3'フランキング配列、MT-1プロモーター、ラットインスリンIIイントロン、ヒトzcytor17lig cDNA及びhGHポリA配列を含むSalIフラグメントを、受精されたネズミ卵母細胞中へのマイクロインジェクションのために使用されるよう調製する。トランスジェニックマウスのマイクロインジェクション及び生成は、Hogan, B. など. Manipulationg the Mouse Embryo, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1994に記載のように行われる。

10

【0504】

B. リンパー特異的EµLCKプロモーターからのヒトzcytor17ligを発現するための構造体：

コンセンサスKozak配列及びヒトzcytor17ligコード領域を含むPCRフラグメントを生成するようオリゴヌクレオチドを企画する。それらのオリゴヌクレオチドを、pKF051（リンパ特異的トランスジェニックベクター）中へのクローニングを促進するために、5'末端でのFseI部位及び3'末端でのAscI部位を有するよう企画する。

【0505】

PCR反応を、200ngのヒトzcytor17lig鋳型（配列番号1）、及び十分な長さ又は活性部分のzcytor17ligを増幅するよう企画されたオリゴヌクレオチドにより行う。PCR反応を、当業界において知られている方法を用いて行う。単離された、正しいサイズのDNAフラグメントを、FseI及びAscI（Boehringer-Mannheim）により消化し、エタノール沈殿し、そしてFseI及びAscIにより前もって消化されたpKF051中に連結する。pKF051トランスジェニックベクターは、p1026X（Iritani, B. M., など., EMBO J. 16: 7019-31, 1997）に起因し、そしてT細胞—特異的lck近位プロモーター、B/T細胞—特異的免疫グロブリンµH鎖エンハンサー、所望するクローンの挿入のためのポリリンカー、及び不活性成長ホルモンタンパク質（3'イントロン及びポリアデニル化シグナルを供給する）をコードする、突然変異誘発されたhGH遺伝子を含む。

20

【0506】

約1 µlの個々の連結反応を、エレクトロポレートし、プレートし、クローンを採取し、上記のようにして、制限消化によりヒトzcytor17lig挿入体についてスクリーンする。pKF051-zcytor17ligの正しいクローンを、配列決定により確め、そしてこのクローンの最大調製を行う。lck近位プロモーター及び免疫グロブリンµエンハンサー（EµLCK）、zcytor17lig cDNA及び突然変異誘発されたhGH遺伝子を含むNotフラグメントを、受精されたネズミ卵母細胞中へのマイクロインジェクションのために使用されるよう調製する。

30

【0507】

C. EF1αプロモーターからのマウスzcytor17ligを発現するための構造体：

プライマーZC41,498（配列番号86）及びZC41,496（配列番号87）を用いて、マウス精巣cDNAライブラリー鋳型のPCRを行う。それらのPCR反応を、pfuターボポリメラーゼ（Stratagene）を用いて、その製造業者の推薦に従って、10%DMSOを伴って又はそれを伴わないで、約50 µlの体積において都合よく行う；そしてホットスタート50s（Molecular Bioproducts, Inc. San Diego, CA）を用いるワックスホットスタートの追加の適用も伴う。PCRサーモサイクリングを次の条件下で行う：94℃で4分（1サイクル）；続いて94℃で30秒、48℃で30秒、72℃で50秒（40サイクル）；72℃で7分の追加の最終拡張。2種のPCR反応をプールし、そして低溶融アガロース及びGelaseアガロース消化酵素（Epicenter, Inc. Madison, WI）を用いて、その製造業者の推薦に従って精製する。

40

【0508】

DNA配列決定されたPCR生成物は、配列番号10と同一のORFを含んで成るネズミzcytor17 cDNA配列（配列番号90）を示し、これは、配列番号10がネズミzcytor17ligポリペプチド

50

コードしたことを確認する。次に、PCRプライマーZC41583（配列番号88）及びZC41584（配列番号89）を用いて、mcytor17lig読み取り枠及び最終コドン（配列番号92）に、FseI及びAscI制限部位及び部分Kozak配列を付加した。Robocycler 40サーモサイクラー（Stratagene）を用いて、次の通りに、アニーリング温度グラジエント及びサイクリングを行う。Pfuターボポリメラーゼ（Stratagene）を上記のように適用したが、但し10%DNSOにおいてのみであった。サイクリングを、次の通りに行った：94℃で4分（1サイクル）；続いて94℃で30秒、65℃～51℃のグラジエント、30秒、72℃で1分（20サイクル）；及び72℃で7分の1回の拡張。

【0509】

この第2サーモサイクリング反応のための鋳型は、上記の1 µlの初期ゲル精製されたmcytor17lig PCR生成物であった。3種の最低温度反応からの得られるPCR生成物をプールし、そして上記Gelase（Epicenter）方法を用いて精製した。次に、この精製されたフラグメントを、FseI及びAscIにより消化し、そしてそのクローニング部位にFseI及びAscI部位を有するよう修飾されたpZP7Xベクター中に連結した。これを、配列決定に送り、正しい配列を確かめた。クローン化されたネズミcDNA配列は、配列番号90で示された、そして対応するポリペプチド配列は配列番号91（配列番号11と同一である）で示される。

【0510】

FseI及びAscI（Boehringer-Mannheim）により消化された、単離された正しいサイズのDNAフラグメントを、FseI及びAscIにより前もって消化されたEF1αプロモーターを含むプラスミド中にサブクローン化した。正しいEF1αマウスzcytor17ligの最少調製を行った。発現カセットは、EF1αプロモーター（欠失されたFseI部を有する）、EF1αイントロン、発現を促進するためのSUR IRES様部位、所望するクロンの挿入のためのFseI PmeI AscI部位を付加する5'末端上にラットインスリンII部位を端に有するポリリンカー、及びヒト成長ホルモン（hGH）ポリA配列を含む。EF1αプロモーター発現カセット及びマウスzcytor17ligを含む、7.5kbのNotIフラグメントを調製し、受精されたネズミ卵母細胞中へのマイクロインジェクションのために使用した。EF1αプラスミドを、Taboit-Dameronなど、1999, Transgenic research 8: 223-235に記載のようにして、Louis-Marie of the Laboratoire de Differentiation Differentiation Cellulaireから入手した。

【0511】

D. リンパー特異的EμLCKプロモーターからマウスzcytor17ligを発現するための構造体

コンセンサスKozak配列及びマウスzcytor17ligコード領域を含むPCRフラグメントを生成するようオリゴヌクレオチドを企画する。それらのオリゴヌクレオチドを、pKF051（上記例22Bを参照のこと）中へのクローニングを促進するために、5'末端でのFseI部位及び3'末端でのAscI部位を有するよう企画する。

【0512】

FseI及びAscI（Boehringer-Mannheim）により消化された、EF1α構造体を使用される、単離された正しいサイズのzcytor17lig DNAフラグメントを、pKF051、すなわちリンパー特異的トランスジェニックベクターを含むプラスミド中にサブクローン化した。pKF051トランスジェニックベクターは、p1026X（Iritani, B.M., など., EMBO J. 16: 7019-31, 1997）に起因し、そしてT細胞—特異的lck近位プロモーター、B/T細胞—特異的免疫グロブリンμH鎖エンハンサー、所望するクロンの挿入するためのポリリンカー、及び不活性成長ホルモントタンパク質（3'イントロ及びポリアデニル化シグナルを供給する）をコードする、突然変異誘発されたGH遺伝子を含む。lck近位プロモーター及び免疫グロブリンμエンハンサー（EμLCK）、マウスzcytor17lig cDNA及び突然変異誘発されたhGH遺伝子を含む、6.5kbのNotIフラグメントを調製し、受精されたネズミ卵母細胞中へのマイクロインジェクションのために使用した（例41）。

【0513】

例23. zcytor17lig-CEEを発現する哺乳類発現ベクターの構成

A. zCyt17lig-CEE/pZMP21の構成：

10

20

30

40

50

ヒトzCytol17ligをコードするポリヌクレオチドのすべて又は一部を含む発現プラスミドを、相同組換えにより構成した。プラスミドは、zCytol17lig-CEE/pZMP21と呼ばれた。

zCytol17lig-CEE/pZMP21の構成を、PCR増幅を用いて、zCytol17Lig-CEEフラグメント（配列番号95）（その対応するアミノ酸配列は配列番号96で示される）を生成することによって達成した。zCytol17Lig-CEEフラグメントの生成のために使用されるDNA鋳型は、zCytol17Lig/pZP7nxであった。

【0514】

zCytol17Lig-CEEフラグメントの生成のために使用されるプライマーは、次のものであった：（１）5'から3'末端側に、28bpのベクターフランキンング配列（挿入体の5'側）及びzCytol17Ligの5'配列に対応する21bpを含むZC41607（配列番号97）（センス配列）；及び5'から3'末端側に、37bpのベクターフランキンング配列（挿入体3'側）、3bpの停止コドン、C-末端EE標識をコードする21bp、及びzCytol17Lig配列3'末端に対応する21bpを含むZC41605（配列番号98）（アンチセンス配列）。上記PCR増殖に起因するフラグメントは、C末端EE標識の追加を有する鋳型zCytol17Ligのコピーであり、zCytol17Lig-CEEの最終生成物を生成する。

【0515】

PCR反応を次の通りに行なった：100 μ lの最終体積に、次のものを添加した：15mMのMgClを有する10 $\times$ Taqポリメラーゼ反応緩衝液10 μ l、1 μ lのTaq DNAポリメラーゼ（5単位/ μ l、Gibco）、3 μ lの10mMのdNTP、78 μ lの蒸留水、プライマーZC41607（配列番号97）の20pモル/ μ lストック3 μ l、プライマーZC41605（配列番号98）の20pモル/ μ lストック3 μ l、及びzCytol17lig鋳型DNAの0.13 μ g/ μ lストック2 μ l。50 μ lに等しい体積の鉱油を、前記混合物に添加した。反応を、94 $^{\circ}$ Cへの5分間の加熱；続いて94 $^{\circ}$ Cで1分；55 $^{\circ}$ Cで2分；72 $^{\circ}$ Cで3分（35サイクル）；続いて、72 $^{\circ}$ Cでの10分の拡張、及び反応を集めるまで、4 $^{\circ}$ Cでの維持。

【0516】

プラスミドpZMP21を、BglII酵素により制限消化し、超遠心分離プロトコルを用いて、QiaQuick PCR精製キット（Qiagen）により清浄し、そしてPCRフラグメントによる組換えのために使用した。プラスミドpZMP21を、pRS316（American Type Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209に寄託され、そしてNo. 77145として受託される）から取られた酵母遺伝子要素、ポリオウィルスからのIRES要素、及びトランスメンブランドメインのカルボキシル末端で切断された、CD8の細胞外ドメインから構成されたpZMP20から構成した。pZMP21は、MPSVプロモーター、免疫グロブリンシグナルペプチドイントロン、コード配列の挿入のための複数の制限部位、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類発現ベクターである。プラスミドはまた、複製のE. コリ起点、SV40プロモーター、エンハンサー及び複製の起点を有する哺乳類選択マーカー発現単位、SV40ターミネーター、及びS. セレビシアエにおける選択及び複製のために必要とされるURA3及びCEN-ARS配列を有する。

【0517】

50 μ lのコンピテント酵母細胞（S.セレビシアエ）を、それぞれ約100ngの切断されたプラスミド、5 μ lの前記PCR混合物と共に組合し、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” Ω 、25 μ Fで、電気パルスした。個々のキュベットに、1.2Mのソルビトール600 μ lを添加し、そして酵母を、2種のURA-Dプレート上の1つの100 μ lのアリコート及び1つの300 μ lアリコートにプレートし、そして30 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。約72時間後、単一のプレートからのUra+酵母形質転換体を、1mlの水に再懸濁し、そして短時間、回転せしめ、酵母細胞をペレット化した。

【0518】

その細胞ペレットを、500 μ lの溶融緩衝液（2%Triton X-100, 1%SDS, 100mMのNaCl、10mMのトリス、pH8.0, 1mMのEDTA）に再懸濁した。この溶融混合物500 μ lを、300 μ lの酸

10

20

30

40

50

洗浄されたガラスビーズ及び300 μ lのフェノールクロロホルムを含むEppendorf管に添加し、1分間、2又は3度、かき混ぜ、続いて5分間、最大速度で、Eppendorf遠心分離機において回転せしめた。300 μ lの水性相を、新しい管に移し、そしてDNAを600 μ lの100%エタノール(EtOH)により沈殿せしめ、続いて、4℃で10分間、遠心分離した。次に、DNAペレットを、500 μ lの70%エタノールにより洗浄し、続いて4℃で1分間、遠心分離した。DNAペレットを30 μ lの水に再懸濁した。

【0519】

エレクトロコンピテントE.コリ細胞(MC1061)の形質転換を、5 μ lの酵母DNA調製物及び50 μ lのMC1061細胞により行った。細胞を、2.0kV、25mF及び400オームで電気パルスした。エレクトロポレーションの後、600 μ lのSOC(2%BuctoTM Trypton (Difco, Detroit, MI), 0.5%酵母抽出物(Difco)、10mMのNaCl、2.5mMのKCl、10mMのMgCl₂、10mMのMgSO₄、20mMのグルコース)を、添加した。エレクトロポレートされたE.コリ細胞を、250 μ l及び50 μ lのアリコートで、2個のLB AMPプレート(LBブイオン(Lennox)、1.8%Bato Agar (Difco)、100mg/Lのアmpiシリン)上にプレートした。プレートを、37℃で約24時間、逆にしてインキュベートした。3個のアmpiシリン耐性コロニーを、ランダムに選択し、そして挿入体の配列分析のために提出した。大規模プラスミドDNAを、Qiagen Maxiキット(Qiagen)を用いて、その製造業者の説明書に従って、配列確認されたクローンから単離した。

【0520】

B. ヒトzcytor17ligの哺乳類発現：

十分な長さのzCyt17ligタンパク質を、zCyt17Lig-CEE /pZMP21(例23A)によりトランスフェクトされたBHK細胞において生成した。BHK細胞(ATCC CRL-10314)を、T75組織培養皿にプレートし、そして増殖培地(SL7V4、5%FBS、1%ペニシリン/ストレptomycin)において、37℃で一晩、5%CO₂下で、約50~70%の集密性まで増殖する。次に、細胞を、血清フリー(SF)培地(SL7V4)において、リポソーム介在性トランスフェクション(LipofectamineTM; Life Technologiesを用いて)に従って、zCyt17Lig-CEE /pZMP21によりトランスフェクトした。プラスミド(16 μ g)を、1.5mlの管においてSF培地に希釈し、640 μ lの合計最終体積にした。脂質混合物35 μ lを、SF培地605 μ lと共に混合し、そしてその得られる混合物を、室温で約15分間インキュベートした。

【0521】

次に、5mlのSF培地を、DNA：脂質混合物に添加した。細胞を10mlのSF培地により1度すぎ、PBSをデカンとし、そしてDNA：脂質混合物を添加した。細胞を、37℃で5時間インキュベートし、次に15mlの培地(SL7V4、5%のFBS、1%のpen/strep)を個々のプレートに添加した。プレートを37℃で一晩インキュベートし、そしてDNA：脂質混合物を、次の日、選択培地(SL7V4、5%のFBS、1%のpen/strep、1 μ MのMTX)により交換した。トランスフェクションの約10日後、T75トランスフェクションフラスコからのメトトレキセート耐性コロニーを、トリプシン処理し、そして細胞をプールし、そしてT-162フラスコ中にプレートし、そして大規模培養に移した。

【0522】

例24. E.コリにおけるzcytor17可溶性受容体の発現

A. huzcytor17/MBP-6H融合ポリペプチドを発現する発現ベクターpCMH01の構成：

マルトース結合タンパク質(MBP)にC-末端で融合されるzcytor17可溶性受容体をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを、相同組換えにより構成する。融合ポリペプチドは、本明細書に記載されるzcytor17可溶性受容体のいずれかに融合される約388個のN-末端アミノ酸MBP部分を含む。zcytor17 cDNAのフラグメント(配列番号4)を、本明細書に記載のようなPCRを用いて単離する。

【0523】

次の2種のプライマーを、標準のPCR反応におけるzcytor17フラグメントの生成に使用する：(1) 1つは、約40bpのベクターフランキンク配列及び約25bpのアミノ末端に対する配列を含み、及び(2) もう1つは、前記フランキンクベクター配列に対応する3'末

端約40bp及びzcytor17のカルボキシル末端に応答する配列約25bpを含む。100 μ lのPCR反応物2 μ lを、分析するために、1 $\times$ TBE緩衝液中、1.0%アガロースゲル上で試験し、そして予測されるおおよそのフラグメントが見られる。残るPCR反応物を、第2のPCR管において組合し、そして無水エタノール400 μ lにより沈殿せしめる。沈殿されたDNAを、下記のようにして、SmaI切断された受容体ベクターpTAP170中への組換えのために使用し、MBP-zcytor17融合体をコードする構造体を生成する。

【0524】

プラスミドpTAP170は、プラスミドpRS316及びpMAL-c2に由来する。プラスミドpRS316は、サッカロミセス・セレビシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*) シャトルベクターである (Hieter P. and Sikorski, R., *Genetics* 122: 19-27, 1989)。pMAL-C2 (NEB)は、E. コリ発現プラスミドである。それは、tacプロモーター駆動MalE (MBPコードの遺伝子)、続いて、His標識、トロンピン切断部位、クローニング部位及びrrnBターミネーターを担持する。ベクターpTAP170を、酵母相同組換えを用いて構成する。

10

【0525】

100ngのEcoRI切断された、pMAL-c2を、1 μ gのPvuI切断されたpRS316、1 μ gのリンカーと共に組合し、そして1 μ gのScaI/EcoRI切断されたpRS316を、PCR反応において再組合す。オリゴヌクレオチドzc19,372 (配列番号157) (100pモル)、zc19,351 (配列番号158) (1pモル)、zc19,352 (配列番号159) (1pモル) 及びzc19,371 (配列番号160) (100pモル) から成るリンカーを、PCR反応において組合した。条件は次の通りであった：94°Cで30秒、50°Cで30秒及び72°Cで30秒 (10サイクル)；続いて4°Cでのソーキング。PCR生成物を、100%エタノール沈殿により濃縮した。

20

【0526】

100 μ lのコンピテント酵母細胞 (*S. セレビシアエ*) を、約1 μ gのヒトzcytor17挿入体及び100ngのSmaI消化されたpTAP170ベクターを含む混合物数10 μ Lと共に組合し、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)、無限オーム、25 μ Fで電気パルスした。個々のキュベットに、1.2Mのソルビトール600 μ lを添加した。次に、酵母を、2つのURADプレート上に、2つの300 μ lのアリコートでプレートし、そして30°Cでインキュベートした。

【0527】

約48時間後、単一プレートからUra⁺酵母形質転換体を採取し、DNAを単離し、そしてエレクトロコンピテントE. コリ細胞 (例えば、MC1061, Casadabanなど., *J. Mol. Biol.* 138, 179-207) を形質転換し、そして標準方法を用いて、MM/CA+AMP 100mg/lプレート (Pryor and Leitinger, *Protein Expression and Purification*. 10:309-319, 1997) 上にプレートする。細胞を、25 μ g/mlのカナマイシンと共に、MM/CAにおいて、2時間、37°Cで、振盪しながら増殖する。

30

【0528】

その培養物1mlを、1mMのIPTGにより誘発する。2~4時間後、個々の培養物250 μ lを、酸により洗浄されたガラスビーズ250 μ 、及び5% β ME及び色素を含むThomer緩衝液 (8Mの尿酸、100mMトリス、pH7.0, 10%グリセロール、2mMのEDTA, 5%SDS) 250 μ lと共に混合する。サンプルを1分間、振盪し、そして65°Cに10分間、加熱する。その20 μ lを、4%~12%PAGEゲル (NOVEX) 上のラインあたりに負荷する。ゲルを、1 $\times$ MES緩衝液において試験する。陽性クローンを、pCZR225と命名し、そして配列決定分析にゆだねる。

40

【0529】

1 μ lの配列決定DNAを用いて、BL21株を形質転換する。細胞を、2.0kV, 25 μ F及び400オームで電気パルスする。エレクトロポレーションに続いて、25 μ g/mlのカナマイシンを含むMM/CA溶液0.6ml上にプレートする。細胞を、MM/CAにおいて増殖し、そして上記のようにして、IPTGにより誘発する。陽性クローンを用いて、Huzcytor 17/MBP-6H融合タンパク質のタンパク質精製のために、標準技法により増殖する。

【0530】

B. E. コリ発酵からのhuzcytor17/MBP-6H可溶性受容体の精製：

50

特にことわらない限り、すべての操作は4℃で行われた。次の方法を、組換えhuzcytor17/MBP-6H可溶性受容体ポリペプチドを精製するために使用した。pCMH01構造体を含み、そしてhuzcytor17/MBP-6H可溶性受容体ポリペプチドを発現するE. コリ細胞を、標準の分子生物学的方法を用いて構成し、そしてSuperBroth II (12g/lのカゼイン、24g/lの酵母抽出物、11.4g/lのリン酸二カリウム、1.7g/lのリン酸一カリウム; Becton Dickenson, Cockeysville, MD) において培養した。得られる細胞を収穫し、そして0.5%グリセロールにおいて凍結した。20gの凍結細胞を、タンパク質精製のために使用した。

【0531】

融解された細胞を、500mlのアミロース平衡化緩衝液(20mMのトリス、100mMのNaCl, pH 8.0)に再懸濁した。-7℃~-10℃の温度設定及び30K PSIを有するFrench Press細胞分解システム(Constant Systems Ltd., Warwick, UK)を用いて、細胞を溶解した。再懸濁された細胞を、French Pressを用いてのサイクリングの前及び後、A₆₀₀読み取りにより破壊について調べた。上清液を、タンパク質精製のために、残核ペレットから収穫した。

【0532】

アミロース樹脂の25mlカラム(New England Biolabs, Beverly, MA)(下記のようにして調製された)を、Bio-Rad, 2.5cm D×10cm Hのガラスカラムに入れた。カラムを充填し、そして10カラム体積(CV)のアミロース平衡化緩衝液(20mMのトリス、100mMのNaCl、pH8.0)により平衡化した。収穫された細胞上清液を、一晚、揺り動かしながら、アミロース樹脂にバッチ負荷した。

【0533】

負荷された樹脂を、ガラスカラムに戻し、10CVのアミロース平衡化緩衝液により洗浄し、そして約2CVのアミロース溶出緩衝液(アミロース平衡化緩衝液、10mMのマルトース、Fluka Biochemical, Switzerland)により重力により溶出した。10の5mlの画分を、溶出プロフィールにわたって集め、そして280及び320nmで吸光度についてアッセイした。アミロース樹脂を、1CVの蒸留水、5CVの0.1%(w/v)のSDS(Sigma)、5CVの蒸留水、5CVのアミロース平衡化緩衝液、及び最終的に1CVのアミロース貯蔵緩衝液(アミロース平衡化緩衝液、0.02%(w/v)のアジ化ナトリウム)により再生した。再生された樹脂を4℃で貯蔵した。

【0534】

興味ある溶出プロフィール画分をプールし、そして4LのPBS(pH7.4)(Sigma)(4回の交換を伴って)に対して、8時間にわたって、10K透析チャンバー(Slide-A-Lyzer, Pierce Immunochemical)において透析した。透析に続いて、収穫された材料は、精製されたhuzcytor17/MBP-6Hポリペプチドを表した。精製されたhuzcytor17/MBP-6Hポリペプチドをフィルター殺菌し、そして適切な分子量の生成物について、SDS-PAGEクーマシー染色により分析した。huzcytor17/MBP-6Hポリペプチドの濃度を、BCA分析により、0.76mg/mlであるものとして決定した。

精製されたhuzcytor17/MBP-6Hポリペプチドを、ウサギの免疫化のために適切に配合した。そしてポリクローナル抗体生成のために、R&R Research and Development (Stanwoud, WA)に送った。

【0535】

例25. ヒトzcytor17可溶性受容体ポリクローナル抗体

A. 調製及び精製:

ポリクローナル抗体を、精製された組換えhuzcytor17/MBP-6Hポリペプチド(例24)により、2匹の雌New zealand 白色ウサギを免疫化することによって、調製する。ウサギは、完全フロイントアジュバント中、精製されたタンパク質200mgの初期腹腔内(IP)注射、続いて、不完全フロイントアジュバント中、精製されたタンパク質100µgの追加免疫IP注射を、3週ごとに与えられる。第2の追加免疫注射(合計3回の注射)の投与後7~10日で、動物は放血され、そして血清が集められる。次に、動物を、追加免疫し、そして3週ごとに放血する。

【0536】

huzcytor17/MBP-6H特異的ウサギ血清を、CNBr-SEPHAROSE 1g当たり約10mgの非特異的精製された組換えMBP-融合タンパク質を用いて調製されるCNBr-SEPHAROSE 4Bタンパク質カラム (Pharmacia LKB) を用いて、抗-MBP抗体を予備吸着した。huzcytor17/MBP-6H-特異的ポリクローナル抗体を、10mgの特異的抗原精製された組換えタンパク質huzcytor17/MBP-6Hを用いて調製されたCNBr-SEPHAROSE 4Bタンパク質カラム (Pharmacia LKB) を用いて、予備吸着されたウサギ血清から親和性精製した。精製に続いて、ポリクローナル抗体を、少なくとも8時間にわたって、抗体体積のPBSにより20回 (4回の交換を伴って)、透析した。ヒトzcytor17-特異的抗体を、抗体標的物として、500ng/mlの精製された組換えタンパク質huzcytor17/MBP-6Hを用いて、ELISAにより特徴づけた。ウサギ抗-huzcytor17/MBP-6H親和性精製された抗体の検出の下限 (LLD) は、その特異的精製された組換え組換え抗原huzcytor17/MBP-6Hに基づいて500pg/mlである。

10

【0537】

B. ウサギ抗-ヒトZcytoR17 MBP-6H抗体のSDS-PAGE及びウェスタンブロット：

ウサギ抗-ヒトZcytoR17 MBP-6H抗体を、クーマシー染色方法を用いてのSDS-PAGE (Nupage4-12%, invitrogen, Carlsbad, CA) 及びヤギ抗-IgG-HRPを用いてのウェスタンブロットにより試験した。精製されたタンパク質 (200~25ng) 又はzcytor17を含むならし培地のいずれかを、Invitrogen Novex's Xcell II mini-cellを用いて電気泳動し、そして装置のマニュアルに提供される指針に従って、Novex's Xcell IIブロットモデルを用いて室温でニトロセルロース (0.2mm; Invitrogen, Carlsbad, CA) に、攪拌しながらトランスファーした。トランスファーを、25mMのトリス塩基、200mMのグリシン及び20%メタノールを含む緩衝液において、300mAで1時間、行った。

20

【0538】

次に、フィルターを、Western A緩衝液 (50mMのトリス、pH7.4、5mMのEDTA、pH8.0、0.05%のIgepal CA-630、150mMのNaCl及び0.25%のゼラチン) により、4℃で一晩、軽く揺り動かしながらブロッックした。ニトロセルロースをすばやくすすぎ、次にウサギ抗-ヒトzcytoR17 MBP-6H (1:1000) を、Western A緩衝液に添加した。ブロットを、軽く振盪しながら、室温で1.5時間、室温でインキュベートした。

【0539】

ブロットを、Western Aによりそれぞれ5分間、3度すすぎ、次に、ヤギ抗-ウサギIgG HRP抗体 (1:1000) を、Western A緩衝液に添加した。ブロットを、軽く揺り動かしながら、室温で1.25時間インキュベートした。ブロットを、Western Aによりそれぞれ5分間、3度すすぎ、次に水によりすばやく、すすいだ。ブロットを市販の化学ルミネセント基質試薬 (1:1に混合されたECL Westernブロット検出試薬1及び2:Amersham Pharmacia Biotech Buckinghamshire, Englandから得られた試薬) を用いて展開し、そしてブロットをX-線フィルムに15分までの間、照射した。

30

ウサギ抗-ヒトzcytoR17 MBP-6Hは、ならし培地に存在するヒトzcytor17、及び還元条件下で120 kDaでのバンドとしてのzcytoR17精製されたタンパク質を検出した。

【0540】

例26. PCRを用いての組織パネルにおけるマウスzcytor17の組織分布

ヒト組織からのcDNAのパネルを、PCRを用いて、zcytor17発現についてスクリーンした。パネルは自家製造され、そして種々の正常及び癌性ネズミ組織からの94種のマラソンcDNA及びcDNAサンプルを包含し、そして細胞系は下記表6に示される。前記cDNAは自家ライブラリーからであり、又はマラソンcDNAは自家RNA調製物、すなわちClontech RNA又はInvitrogen RNAからであった。マウスマラソンcDNAは、マラソン-ReadyTM キット (Clontech, Palo Alto, CA) を用いて製造され、そしてマウストランスフェリンプライマー-ZC10,651 (配列番号46) 及びZC10,655 (配列番号47) によりQC試験し、そして次に、トランスフェリンバンドの強さに基づいて希釈された。

40

【0541】

パネルサンプルにおける増幅されたライブラリーサンプルの性質を評価するために、品質管理 (QC) についての次の3種の試験を行った：(1) ライブラリーのために使用され

50

るRNA品質を評価するために、自家cDNAを、個々のcDNAライブラリーについてのベクター配列に対して特異的であるベクターオリゴによるPCRにより、平均挿入体について試験し；（２）パネルサンプルにおけるcDNAの濃度の標準化を、5'ベクターオリゴZC14,063（配列番号48）及び3'α-チューブリン特異的オリゴプライマーZC17,574（配列番号49）又は3'G3PDH特異的オリゴプライマーZC17,600（配列番号50）を用いて、十分な長さのαチューブリン又はG3PDH cDNAを増幅するために、標準のPCR方法を用いて達成し；そして（３）サンプルを、可能なリボソーム又はミトコンドリアDNA汚染について調べるために配列決定に送った。

【0542】

パネルを、ヒトゲノムのDNA（Clontech, Palo, Alto, CA）陽性対照サンプルを含む96ウェル形式において組み立てた。個々のウェルは約0.2~100pg/μlのcDNAを含んだ。PCR反応を、オリゴZC38,065（配列番号51）及びZC38,068（配列番号52）、Takara Ex TaqTM（TAKARA Shuzo Co. LTD, Biomedicals Group, Japan）、及びRadiload 色素（Research Genetics, Inc., Huntsville, AL）を用いて組み立てた。増幅を次の通りに行った：94℃で5分（1サイクル）；94℃で30秒（5サイクル）；94℃で30秒、56℃で30秒及び72℃で30秒（35サイクル）、続いて72℃で5分（1サイクル）。約10μlのPCR反応生成物を、4%アガロースゲルを用いての標準のアガロースゲル電気泳動にゆだねた。

【0543】

正しい推定されるDNAフラグメントサイズを、脳、CD90+細胞、樹状突起、胚、MEWt #2、Tuvak-前立腺細胞系、唾液腺、皮膚及び精巣において観察した。

皮膚及び精巣についてのDNAフラグメントを切除し、そしてGel Extractionキット（Qia gen, Chatsworth, CA）を用いて、製造業者の説明書に従って精製した。フラグメントを、それらが実際、zcytor17であることを示すために、配列決定により確かめた。

【0544】

10

20

【表 6】

表 6 :

組織/細胞系	#サンプル	組織/細胞系	#サンプル
229	1		
7F2	1		
脂肪細胞—増幅された	1		
ATC1.9	1		
脳	4		
CCC4	1		
CD90+増幅された	1		
OC10B	1		
樹状突起	1		
胚	1		
心臓	2		
腎臓	3		
肝臓	2		
肺	2		
MEWt#2	1		
P388D1	1		
膵臓	1		
胎盤	2		
Jakotay-前立腺細胞系	1		
NeLix-前立腺細胞系	1		
Paris-前立腺細胞系	1		
Torres-前立腺細胞系	1		
Tuvak-前立腺細胞系	1		
唾液腺	2		
骨格筋	1		
皮膚	2		
小腸	1		
平滑筋	2		
脾臓	2		
胃	1		
精巣	3		
胸腺	1		

【0545】

例27. 同時定量的RT/PCRを用いての種々の組織におけるヒトZcytor17発現

A. 従来の及び定量的RT-PCRのためのヒトZcytor17、OSMR β 及びZcytor17ligのためのプライマー及びプローブ:

ABI PRISM7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) を用いて同時定量的RT-PCRは、これまでに記載されている (Heid, C.A. など., Genome Research 6: 986-994, 1996; Gibson, U.E.M. など., Genome Research 6:995-1001; Sundaresan, S. など., Endocrinology 139: 4756-4764, 1998を参照のこと)。この方法は、レポーター及び消光剤蛍光色素の両者を含む遺伝子特異的プローブの使用を組み込む。プローブが損なわれていない場合、レポーター色素発光は、消光色素の密接した

10

20

30

40

50

接近性のために無効にされる。追加の遺伝子—特異的前方向及び逆方向プライマーを用いてのPCR延長の間、プローブは、プローブからレポーター色素を開放するTaqポリメラーゼの5'ヌクレアーゼ活性により分解され、蛍光発光の上昇がもたらされる。

【0546】

ヒトZcytor17、OSMR β 及びZcytor17lig発現の同時定量化RT-PCR分析のために使用されるプライマー及びプローブを、プライマー企画ソフトウェアPrimer Express™ (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて企画した。ヒトZcytor17のためのプライマーを、ゲノムDNAの増幅を排除するためにイントロン—エキソン連結に及ぶよう企画した。前方向プライマー、ZC37,877 (配列番号53) 及び逆方向プライマー、ZC37,876 (配列番号54) を、73bpの生成物を合成するために約300nMの濃度でPCR反応 (下記) に使用した。ZG37,776 (配列番号55) と称する、その対応するZcytor17 TaqMa (商標) プローブを合成し、そしてPE Applied Biosystemsによりラベルした。ZG37,776 (配列番号55) プローブを、レポーター蛍光色素 (6-カルボキシフルオレセイン) (FAM) (PE Applied Biosystems) により5'末端で、及び消光剤蛍光色素 (6-カルボキシテトラメチルローダミン) (TAMRA) (Epoch Biosciences, Bothell, WA) により3'末端でラベルした。

10

【0547】

ヒトOSMR β のためのプライマーを、ゲノムDNAの増幅を排除するためにイントロン—エキソン連結に及ぶよう企画した。前方向プライマー、ZC43,891 (配列番号122) 及び逆方向プライマー、ZC43,900 (配列番号123) を、73bpの生成物を合成するために約300nMの濃度でPCR反応 (下記) に使用した。ZG43,896 (配列番号124) と称する、その対応するOSMR β TaqMa (商標) プローブを合成し、そしてPE Applied Biosystemsによりラベルした。ZG43,896 (配列番号124) プローブを、レポーター蛍光色素 (6-カルボキシフルオレセイン) (FAM) (PE Applied Biosystems) により5'末端で、及び非—蛍光消光剤色素 (ECLIPSE) (Epoch Biosciences) により3'末端でラベルした。

20

【0548】

ヒトZcytor17ligのためのプライマーを、ゲノムDNAの増幅を排除するためにイントロン—エキソン連結に及ぶよう企画した。前方向プライマー、ZC43,280 (配列番号125) 及び逆方向プライマー、ZC43,281 (配列番号126) を、73bpの生成物を合成するために約200nMの濃度でPCR反応 (下記) に使用した。ZG43,275 (配列番号127) と称する、その対応するZcytor17lig TaqMa (商標) プローブを合成し、そしてPE Applied Biosystemsによりラベルした。ZG43,275 (配列番号127) プローブを、レポーター蛍光色素 (6-カルボキシフルオレセイン) (FAM) (PE Applied Biosystems) により5'末端で、及び非—蛍光消光剤色素 (ECLIPSE) (Epoch Biosciences) により3'末端でラベルした。

30

【0549】

試験されるRNAサンプルの統合性及び性質を試験するための対照として、すべてのRNAサンプルを、PE Applied Biosystems (rRNAキット) から指図された、又は社内 (GUS) と命名されたプライマー及びプローブ組を用いて、rRNA又はGUSについてスクリーンした。rRNAキットは、前方向プライマー (配列番号56)、rRNA逆方向プライマー (配列番号57)、及びrRNA TaqMan (商標) プローブ (配列番号58) を含む。rRNAプローブを、レポーター蛍光色素VIC (PE Applied Biosystems) によりその5'末端で、及び消光剤蛍光色素TAMRA (PE Applied Biosystems) によりその3'末端でラベルした。

40

【0550】

GUSプライマー及びプローブを、社内生成し、そしてそれぞれ200nM及び100nMで個々のPCR反応に用いて使用した。前方向プライマーはZC40,573 (配列番号128) であり、そして逆方向プライマーはZC40,575 (配列番号129) であった。GUSプローブZG43,017 (配列番号130) プローブを、レポーター蛍光色素 (Yakima-Yellow) (Epoch Biosciences) により5'末端で、及び非—蛍光消光剤色素 (ECLIPSE) (Epoch Biosciences) により3'末端でラベルした。そのrRNA及びGUS結果はまた、内因性対照としても作用し、そして試験サンプルに見られるZcytor17 mRNA発現結果の標準化を可能にする。

【0551】

50

従来の非定量的RT-PCRのために、プライマーを、プライマー企画ソフトウェアPrimer Express™ (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて企画した。ヒトzcytor17プライマーは、約1000塩基対の生成物を生成し、そして次の通りである：前方向プライマー-ZC28,917 (配列番号83)及び逆方向プライマー-ZC28,480 (配列番号131)。ヒトOSMRβプライマーは、202塩基対の生成物を生成し、そして次の通りである：前方向プライマー-ZC41,653 (配列番号132)及び逆方向プライマー-ZC41,655 (配列番号133)。ヒトZcytor17リガンドプライマーは305塩基対の生成物を生成し、そして次の通りである：前方向プライマー-ZC41,703 (配列番号134) 及び逆方向プライマー-ZC41,704 (配列番号135)。

【0552】

B. 従来の及び定量的RT-PCRのためのネズミZcytor17、OSMRβ及びZcytor17リガンドのためのプライマー及びプローブ：

ネズミZcytor17、OSMRβ及びZcytor17lig発現の同時定量化RT-PCR分析のために使用されるプライマー及びプローブを、プライマー企画ソフトウェアPrimer Express™ (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて企画した。ネズミZcytor17のためのプライマーを、ゲノムDNAの増幅を排除するためにイントロン-エキソン連結に及ぶよう企画した。前方向プライマー、ZC43,272 (配列番号136) 及び逆方向プライマー、ZC43,273 (配列番号137) を、73bpの生成物を合成するために約300nMの濃度でPCR反応 (下記) に使用した。

【0553】

ZG43,478 (配列番号138) と称する、その対応するZcytor17 TaqMa (商標) プローブを合成し、そしてPE Applied Biosystemsによりラベルした。ZG43,478 (配列番号138) プローブを、レポーター蛍光色素 (6-カルボキシフルオレセイン) (FAM) (PE Applied Biosystems) により5'末端で、及び消光剤蛍光色素 (6-カルボキシテトラメチルローダミン) (TAMRA) (Epoch Biosciences, Bothell, WA) により3'末端でラベルした。ZG43,478 (配列番号138) プローブを、100nMの濃度でPCR反応に使用した。

【0554】

ネズミZcytor17リガンドのためのプライマーを、ゲノムDNAの増幅を排除するためにイントロン-エキソン連結に及ぶよう企画した。前方向プライマー、ZC43,278 (配列番号139) 及び逆方向プライマー、ZC43,279 (配列番号140) を、500nMの濃度でPCR反応に使用した。ZG43,276 (配列番号141) と称する、その対応するZcytor17リガンド TaqMa (商標) プローブを合成し、そしてPE Applied Biosystemsによりラベルした。ZG43,478 (配列番号138) プローブを、レポーター蛍光色素 (6-カルボキシフルオレセイン) (FAM) (PE Applied Biosystems) により5'末端で、及び非-蛍光消光剤色素 (ECLIPSE) (Epoch Biosciences) により3'末端でラベルした。ZG43,276 (配列番号141) プローブを、200nMの濃度でPCR反応 (下記) に使用した。

【0555】

ネズミOSMRβのためのプライマーを、ゲノムDNAの増幅を排除するためにイントロン-エキソン連結に及ぶよう企画した。前方向プライマー、ZC43,045 (配列番号142) 及び逆方向プライマー、ZC43,046 (配列番号143) を、300nMの濃度でPCR反応に使用した。ZG43,141 (配列番号144) と称する、その対応するOSMRβ TaqMa (商標) プローブを合成し、そしてPE Applied Biosystemsによりラベルした。ZG43,141 (配列番号144) プローブを、レポーター蛍光色素 (6-カルボキシフルオレセイン) (FAM) (PE Applied Biosystems) により5'末端で、及び非-蛍光消光剤色素 (ECLIPSE) (Epoch Biosciences) により3'末端でラベルした。ZG43,141 (配列番号144) プローブを、100nMの濃度でPCR反応 (下記) に使用した。

【0556】

試験されるRNAサンプルの統合性及び性質を試験するための対照として、すべてのRNAサンプルを、プライマー企画ソフトウェアPrimer Express™ (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて企画されたプライマー及びプローブを用いて、ネズミGUS又はトランスフェリン受容体のいずれかについてスクリーンした。ネズミGUSプライマーは

10

20

30

40

50

、次の通りである：前方向プライマー、ZC43,004（配列番号145）、逆方向プライマー、ZC43,005（配列番号146）、及びTaqMan（商標）プローブZC43,018（配列番号147）。ネズミGUSプローブZC43,018（配列番号147）を、レポーター蛍光色素（Yakima-Yellow）（Epoch Biosciences）により5'末端で、及び非-蛍光消光剤色素（ECLIPSE）（Epoch Biosciences）により3'末端でラベルした。

【0557】

ネズミGUSプライマーを、300nMの濃度でPCR反応に使用し、そしてプローブ、ZC43,018（配列番号147）を100nMの濃度で使用した。多くの場合、ネズミトランスフェリン受容体を、内因性対照として、GUSの代わりに使用した。トランスフェリン受容体前方向プライマー、ZC40,269（配列番号148）、及び逆方向プライマー、ZC40,268（配列番号149）を、300nMの濃度で使用した。トランスフェリン受容体プローブ、ZC40,298（配列番号150）を、100nMの濃度でPCR反応に使用し、そしてレポーター蛍光色素VIC（PE Applied Biosystems）によりその5'末端で、及び消光剤蛍光色素TAMRA（PE Applied Biosystems）によりその3'末端でラベルした。ネズミGUS及びトランスフェリン受容体結果はまた、内因性対照としても作用し、そして試験サンプルに見られるZcytor17、OSMR β 及びZcytor17リガンドmRNA発現の標準化を可能にする。

【0558】

従来の半一定量のRT-PCRのために、プライマーを、プライマー企画ソフトウェアPrimer ExpressTM（PE Applied Biosystems, Foster City, CA）を用いて企画した。ネズミZcytor17プライマーは、約276塩基対の生成物を生成し、そして次の通りである：前方向プライマーZC43,140（配列番号151）及び逆方向プライマーZC43,139（配列番号152）。ネズミOSMR β プライマーは、575塩基対の生成物を生成し、そして次の通りである：前方向プライマーZC41,608（配列番号153）及び逆方向プライマーZC41,609（配列番号154）。ネズミZcytor17リガンドプライマーは657塩基対の生成物を生成し、そして次の通りである：前方向プライマーZC41,502（配列番号155）及び逆方向プライマーZC41,500（配列番号156）。

【0559】

C. 同時定量的RT-PCR及び従来の半一定量のRT-PCRのたqめのプロトコール：

Zcytor17、OSMR β 及びZcytor17リガンド mRNAの相対的レベルを、1段階RT-PCR方法（PE Applied Biosystems）を用いて、全RNAサンプルを分析することによって決定した。Zcytor17-、及びOSMR β ートランスフェクトされたBAF細胞（ヒト）又はBHK細胞（ネズミ）からの全RNAを、標準方法により単離し、そしてZcytor17、及びOSMR β の定量化のために使用される標準曲線を生成するために使用した。曲線は、100~0.01ng/ μ lの一連の10倍希釈から成り、そして個々の標準曲線点は、三重反復して分析された。同様に、Zcytor17リガンドに関しては、活性化されたCD4+T細胞RNA(Zcytor17リガンドを製造するために前で示された)を用いて、同じ100~0.01ng/ μ lでの標準曲線を生成した。

【0560】

ヒト又はネズミ細胞からの全RNAを、ヒト又はネズミZcytor17、OSMR β 及びZcytor17リガンド転写体レベル及び次の内因性対照遺伝子の1つについて、三重反復して分析した：rRNA、GUS 又はトランスフェリン受容体。10 μ lの合計体積においては、個々のRNAサンプルを、次のものを含む1段階RT-PCR反応にゆだねた：内部対照色素（ROX）（カルボキシー-x-ローダミン）及びThermo-Start（商標）DNAポリメラーゼ（Abgene, Surrey, UK）を服務予備配合された2Xマスター混合物中、約50-100ngの全RNA；興味ある遺伝子のための適切なプライマー（この例のA及びB部分を参照のこと）；適切なプローブ（濃度冠するA及びB部分を参照のこと）；Superscript（商標）逆転写酵素（50U/ μ l）（PE Applied Biosystems）；及び適切な体積のRNアーゼフリーに水。PCR熱サイクリング条件は次の通りであった：48℃で30分間の1つのサイクルの初期逆転写（RT）段階；続いて、95℃で10分間のThermo-Start（商標）酵素活性化段階；続いて、95℃で15秒間及び60℃で1分間の40サイクルの増幅。

【0561】

相対的Zcytor17、OSMR β 及びZcytor17リガンド RNAレベルを、製造業者PE Biosystems (User Bulletin #2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Relative Quantitation of Gene Expression, December 11, 1997) により記載されるような標準曲線方法を用いて決定した。rRNA、GUS又はトランスフェリン受容体の測定を用いて、興味ある遺伝子のレベルを標準化した。

【0562】

半一定量のRT-PCR反応は、“Superscript One-Step Rt-PCR System with Platinum Taq” (Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用した。個々の25 μ lの反応は、次のものから構成された：12.5 μ lの2 $\times$ 反応緩衝液、0.5 μ l (20pモル/ μ l) の前方向プライマー、0.5 μ l (20pモル/ μ l) の逆方向プライマー、0.4 μ lのRT/Taqポリメラーゼ混合物、5.0 μ lのRed iload Gel Loadin 緩衝液 (Invitrogen)、5.1 μ lのRNアーゼフリーの水、及び1.0 μ lの合計のRMA (100ng/ μ l)。増幅を次の通りに行った：45°Cで30分 (1サイクル)、続いて、94°Cで20秒、種々のクリーニング温度 (下記表7を参照のこと) で20秒、72°Cで45秒 (35~38サイクル)、次に、72°Cで5分の最終拡張。8~10 μ lのPCR反応生成物を、2%アガロースゲルを用いて、標準のアガロース電気泳動にゆだねた。

【0563】

【表7】

表7：

ネズミZcytor17	58°Cのアニーリング温度
ネズミOSMR β	60°Cのアニーリング温度
ネズミZcytor17リガンド	52°Cのアニーリング温度
ヒトZcytor17	55°Cのアニーリング温度
ヒトOSMR β	59°Cのアニーリング温度
ヒトZcytor17リガンド	59°Cのアニーリング温度

【0564】

D. ヒト及びネズミPBMCサブセット及び細胞系からのRNAの単離：

血液は、いくつかの匿名のドナーから採血され、そして標準のFicollグラジエント方法を用いて単離された抹消血液単核細胞 (PBMC) であった。次に、単球を、Monocyte Isolationキット及びMagnetic Cell Separation System (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) を用いて単離した。次に単球を、超一低付着性24-ウェルプレート中の内毒素フリーの培地上にプレートした。それらを、刺激しないか、又は組換えヒトIFN γ (R&D Systems Inc.) により10ng/mlで刺激した。細胞を、24及び48時間で集めた。類似する態様で、CD4+及びCD8+ T細胞を、Miltenyi Biotecからの抗-CD4又は抗-CD8磁気ビーズを用いて、PBMCから単離した。

【0565】

次に、細胞を、5 μ g/mlの抗-CD28抗体を含む培地を含む、0.5 μ g/mlの抗-CD3抗体により被覆された組織培養プレートにおいて、4又は16時間、活性化した。NK細胞をまた、Miltenyiの抗-CD56被覆された磁気ビーズを用いて、PBMCから単離した。NK細胞のいくらかをRNAのためにゼロ時点で集め、そして他のNK細胞を、ホルボールミリステートアセテート (PMA) (5ng/ml) 及びイノマイシン (0.5 μ g/ml) を含む培地に24時間プレートした。さらに、いくつかのヒト単球様細胞、すなわちU937、THP-1及びHL-60を、それらの休止又は活性化された状態で集めた。

【0566】

U937細胞を、PMA (10ng/ml) により一晩、活性化した。HL-60を、PMA (10ng/ml) により一晩、又はIFN γ (10ng/ml) により72及び96時間、活性化し、それらを単球経路に追いやった。THP-1細胞を、LPS (10ng/ml) 及びIFN γ (10ng/ml) の組合せにより一晩、活性

化した。RNAを、Rneasy MidiprepTM キット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて、その製造業者の説明書に従って、すべての一次細胞から調製した。担持するDNAを、DNA-FreeTM キット (Ambion, Inc., Austin, Tx) を用いて除去した。RNA濃度を、標準の分光計を用いて決定し、そしてRNA品質をBioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) を用いて決定した。

【0567】

ネズミT細胞RNAを、当業界において良く知られている種々の方法を用いて集めた。一次脾臓細胞CD4+及びCD8+T細胞を、抗体被覆された磁気ビーズ、及びMiltengi Biotecからの磁気細胞分離システムを用いて、C57B1/6の脾臓から単離した。次にCD4+及びCD8+ T細胞を、5 µg/mlで抗-CD28抗体を含む培地を含む、抗-CD3抗体 (500ng/ml) により被覆された24-ウェルプレートにおいて細胞を培養することによって活性化した。細胞を、0, 4及び16時間で、RNAについて収穫した。

10

【0568】

同時に、CD4+ T細胞を単離し、そして次に、次のプロトコルを用いて、Th1又はTh2表現型に対してスキュー (Skew) した。C57B1/6 T細胞はTh1方向においてすでにスキューされているので、必要とされるすべては、0.5 µg/mlのPMA及び10ng/mlのイノマイシンにより6時間、活性化されるべきであった。“Th2”スキューは、0.5 µg/mlの抗-CD3により被覆されたプレートに、生来のCD4+ T細胞を、2.5 µg/mlの抗-CD28、10ng/mlのmIL-2 (R&D Systems Inc.) と共にプレートすることによって得た。培養での2日後、細胞を、10ng/mlのmIL-2 (R&D Systems) 及び25ng/mlのmIL-4を含む培地に再懸濁した。細胞を、さらに3日間、培養し、次にPMA及びイノマイシンにより6時間、活性化した。

20

【0569】

1つの追加の組のTh1及びTh2スキューされたT細胞を、T細胞受容体トランスジェニックD011.10T細胞系を用いて誘導した。すべての細胞を、抗-CD3及び抗-CD28被覆されたプレートにプレートした。“Th1”細胞を、mTL-12 (1ng/ml) 及び抗-IL-4 (10 µg/ml) を含む培地にプレートした。“Th2”細胞を、mTL-4 (10ng/ml) 及び抗-IFNγ (10 µg/ml) を含む培地にプレートした。24時間後、すべての培養物は、mIL-2 (10ng/ml) を与えられた。さらに2日後、細胞上の培地を交換し、そして前述のサイトカインを含む新しい培地を添加し、そして細胞を、収穫の前、さらに4日間、培養した。

ネズミT細胞RNAのすべては、Rneasy MidiprepTM キット (Qiagen) を用いて調製し、そして汚染性DNAを、AmbionからのDNA-FreeTM キットを用いて除去した。

30

【0570】

E. 膵炎及び刺激性腸疾患のネズミモデルからのRNAの単離:

ヒト刺激性腸疾患 (IBD) に類似する状態を誘発するために、ハイブリッドマウス株C57B16/129S6F1を使用した。マウスを、グループ当たり6匹のマウスの平均サイズを有する4つのグループに分けた。グループ1は、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を与えられず、そして14日目に殺害された。グループ2は、殺害する前、2日間、2 %DSSを受けた。グループ3は、殺害する前、7日間、2 %DSSを受けた、グループ4は、7日間、2 %DSSを受け、次に7日間、回復せしめ、そして14日目に殺害された。殺害の日、遠位結腸断片を除き、そしてRNALaterTM (Ambion) に配置した。その結腸断片を、標準技法を用いて均質化し、そしてRNAを、Rneasy MidiprepTM キット (Qiagen) を用いて単離した。汚染性DNAを、DNA-freeTM (Ambion) 処理により、製造業者の説明書に従って除去した。

40

【0571】

異なった研究においては、急性膵炎を、雄CD-1マウスにおいて、カエルレイン (Caerulein) 注射により誘発した。マウスを3種のグループ (n = 8匹のマウス/グループ) に分けた。グループ1動物は、ビークル (塩溶液) による7回のi.p. 注射 (1つの注射/時) を与えられ、そして次に、最初の注射に続いて及び24時間で殺害した。グループ2及び3は、50 µg/kg/時の用量で6時間 (1注射/時)、カエルレイン (Sigma) (カタログ番号C-9026) の7回のi.p. 注射を与えられた。グループ2は、最初の注射の12時間後に殺害され、そしてグループ3は、最初の注射に続いて24時間で殺害された。膵炎を、殺害の時点

50

で除き、そしてRNA単離のために即座に凍結した。組織を均質化し、そしてRnAを、Qiagen Rneasy MidiprepTM キットを用いて単離した。

【0572】

さらにもう1つの研究においては、ネズミZcytor17リガンドトランスジェニックマウスを生成し、そして表現型変化について観察した（例41を参照のこと）。起毛及び脱毛が、トランスジェニックマウスの多くに観察された。4匹のトランスジェニックマウスを殺害し、そして正常及び無毛領域からの皮膚サンプルを除き、そして後でのRNA単離のために即座に凍結した。2匹の非トランスフェニック対照マウスからの皮膚断片を単離のために即座に凍結した。そして次に、プロティナーゼK (Qiagen) (カタログ番号19133) により、60°Cで20分間、消化した。次に、RNAを、Qiagen Rneasy MidiprepTM キットを用いて、製造業者の説明書に従って単離した。担持するDNAを、AmbionからのDNA-freeTM キットを除去した。

10

【0573】

F. ヒトZcytor17, OSMR β 及びZcytor17リガンドについての定量的及び半定量的RT-PCRの結果：

Zcytor17及びOSMR β 発現を、それらの休止状態で存在するか又はIFN γ により24又は48時間、活性化された4組の一次ヒト単球における定量的RT-PCRにより試験した。Zcytor17発現は、刺激されていない細胞において検出されたが、しかしIFN γ による24時間の活性化の後、劇的に上昇し、そして48時間の活性化の後、最高であった。すべての場合、OSMR β は検出されなかった。Zcytor17リガンドは、それらのサンプルにおいて試験されなかった。

20

【0574】

一次T細胞においては、Zcytor17は、休止のCD4+及びCD8+サブセットの両者において検出されなかった。しかしながら、zcytor17の発現は、両サブセットにおいて上昇し、そして16時間の点で、わずかに低いレベルに低下した。OSMR β はそれらのサンプルにおいて検出されなかった。Zcytor17リガンド発現を、半一定量のRT-PCRを用いて試験した。発現は、刺激されなかったCD4+及びCD8+ T細胞において検出されなかった。しかしながら、4時間の活性化の後、高レベルのZcytor17リガンドが検出された。このレベルは、16時間の点で幾分低下した。

【0575】

30

Zcytor17の発現は、NK細胞においては試験されなかった。OSMR β はそれらのサンプルにおいては、検出されなかった。Zcytor17リガンド発現は休止のNK細胞においては検出されなかったが、しかしながら、活性化されたNK細胞により生成されるわずかなシグナルは、それらの細胞がある条件下でZcytor17リガンドを製造できることを示唆する。

【0576】

ヒト単球様細胞系、すなわちU937, THP-1及びHL-60においては、OSMR β 発現は、休止の及び活性化されたサンプルのすべてにおいて検出されなかったが、但しわずかなシグナルが検出される、活性化されたTHP-1サンプルにおいてはそうではなかった。Zcytor17発現はU937及びTHP-1の休止の細胞系において高く、そして活性化に続いて強いアップレギュレーションを示した。U937における発現は、いずれの細胞型の最高であった。HL-60においては、Zcytor17は、刺激されたいない細胞において中位のレベルで発現され、そしてPMAによる刺激に基づいて低下した。しかしながら、Zcytor17の発現は、IFN γ により72及び96時間、刺激される場合、HL-60において劇的にアップレギュレートされた。ヒト発現データのすべては、下記表8に要約されている。

40

【0577】

【表 8】

表 8 :

一次ヒト単球	活性化状態	Zcytor17	OSMR β	Zcytor17 リガンド
ヒト単球	刺激されていない	-	-	
ヒト単球	IFN γ による24時間の活性化	+	-	
ヒト単球	IFN γ による48時間の活性化	++	-	
ヒトCD4+	刺激されていない	-	-	-
ヒトCD4+	4時間の活性化	++	-	++
ヒトCD4+	16時間の活性化	+	-	+
ヒトCD8+	刺激されていない	-	-	-
ヒトCD8+	4時間の活性化	++	-	++
ヒトCD8+	16時間の活性化	+	-	+
ヒトNK細胞	刺激されていない		-	-
ヒトNK細胞	24時間の活性化		-	+
U937	刺激されていない	++	-	-
U937	16時間の活性化	+++	-	-
THP-1	刺激されていない	++	-	-
THP-1	16時間の活性化	+++	+	-
HL-60	刺激されていない	++	-	-
HL-60	PMAによる16時間の活性化	+	-	-
HL-60	IFN γ による72時間の活性化	+++	-	-
HL-60	IFN γ による96時間の活性化	+++	-	-

【0578】

G. ネズミZcytor17, OSMR β 及びZcytor17リガンドについての定量的及び半定量的RT-PCRの結果:

ネズミZcytor17, OSMR β 及びZcytor17リガンド発現レベルを、いくつかのネズミT細胞集団において試験し、そして結果を、下記表9に要約する。ネズミZcytor17発現を、半定量的RT-PCRにより試験し、そして、休止及び活性化された一次CD4+ T細胞の両者において低レベルで存在することを示した。Zcytor17の発現は、休止のCD8+ T細胞上で検出され、そして次に、4及び16時間の点で抗-CD3及び抗-CD28抗体による活性化に基づいて低下するように思えた。OSMR β 発現が、定量的RT-PCRにより測定され、そして休止及び活性化されたCD4+及びCD8+ T細胞において発現されることを示された。

【0579】

OSMR β の発現は、4時間の活性化の後、上昇し、そして次に、CD4+及びCD8+ T細胞の両者において16時間までに刺激されていないレベルに戻った。Zcytor17リガンドは、定量的RT-PCRにより検出され、そして刺激されていないCD4+ T細胞において非常に低いレベルで発現されることが示された。しかしながら、4時間の活性化に続いて、Zcytor17リガンド発現は劇的にアップレギュレートされ、そして16時間の点までにわずかに低下した。CD8+ T細胞においては、Zcytor17リガンドは、刺激されていない細胞においては検出されなかった。4時間の点でいくつかのZcytor17リガンド発現が存在するが、しかし16時間の発現レベルは、検出以下に低下した。

【0580】

D011.10 T細胞においては、Zcytor17発現を、生来の及びTh2スキューされた細胞において検出したが、しかしTh1スキューされた細胞においては検出しなかった。OSMR β 発現は

、生来のD011.10細胞においては低レベルであった。Th1スキューされた細胞においては、OSMR β 発現レベルの劇的な上昇が存在し、そしてTh2スキューされた細胞においては、中位の発現の上昇が存在した。それらの細胞におけるZcytor17リガンド発現は、Th2スキューされたサブセットにより有力であることを示された。低レベルがTh1サブセットにおいて検出され、そして発現は生来の細胞においては、検出されなかった。それらの結果は、下記表9に要約される。

【0581】

Th1又はTh2方向にスキューされた一次CD4⁺ T細胞においては、Zcytor17は試験されなかった。OSMR β 発現は、すべての3種のサンプルにおいて検出され、そして最高レベルはTh2サンプルにおいて見出された。D011.10結果に類似して、Zcytor17リガンド発現はTh2スキューされたサブセットにおいて高レベルで検出され、少量がTh1サブセットにおいて検出され、そして刺激されていない細胞においては検出されなかった。それらの結果は、下記表9に要約される。

【0582】

【表9】

表9：

ネズミT細胞	Zcytor17	OSMR β	Zcytor17リガンド
CD4 ⁺ T細胞 刺激されていない	+	+	+/-
CD4 ⁺ T細胞 4時間の活性化	+	++	++
CD4 ⁺ T細胞 16時間の活性化	+	+	+
CD8 ⁺ T細胞 刺激されていない	+	+	-
CD8 ⁺ T細胞 4時間の活性化	+/-	++	+
CD8 ⁺ T細胞 16時間の活性化	-	+	-
D011.10 生来の	+	+	-
D011.10 Th1	-	+++	+
D011.10 Th2	+	++	++
CD4 ⁺ T細胞 刺激されていない		++	-
CD4 ⁺ T細胞-Th1スキューされた		+++	+
CD4 ⁺ T細胞-Th2スキューされた		++	+++

【0583】

Zcytor17リガンドトランスジェニック皮膚サンプルにおいては、Zcytor17、OSMR β 及びZcytor17リガンド発現レベルを、定量的RT-PCRを用いて決定した。Zcytor17は、すべてのサンプルに、おおよそ同等のレベルで存在することが示された。トランスジェニックサンプルよりも非トランスジェニック対照動物においてより劇的に高いレベルのOSMR β 発現が存在した。Zcytor17リガンド発現は、非トランスジェニック対照動物において検出されず、そしてトランスジェニック動物においては、中位～高レベルの発現が存在した。結果は、下記表10に要約する。

【0584】

【表 10】

表10:

ネズミZcytor17リガンド トランスジェニック皮膚	皮膚表現型	Zcytor17	OSMR β	Zcytor17 リガンド
野生型マウス	正常	+	+++	-
野生型マウス	正常	+	+++	-
トランスジェニック#1	正常	+	+	+
トランスジェニック#1	脱毛	+	+	+
トランスジェニック#2	正常	+	+	+
トランスジェニック#2	脱毛	+	+	+
トランスジェニック#3	正常	+	+	+
トランスジェニック#3	脱毛	+	+	+
トランスジェニック#4	正常	+	+	+++
トランスジェニック#4	脱毛	+	+	+++

10

【0585】

異なった実験において、Zcytor17、OSMR β 及びZcytor17リガンド発現レベルを、急性膀胱炎にされたマウスの膀胱において、定量的RT-PCRにより測定した。Zcytor17発現はすべてのサンプルにおいて検出されなかった。OSMR β 発現は、正常な対照サンプル（グループ1）においては、低レベルで見出されたが、しかし12時間の点で強いアップレギュレーションを示し（グループ2）、そして24時間の点でわずかに低いレベルを示した（グループ3）。Zcytor17リガンド発現は、対照動物において検出されなかったが、しかしカエルレイン注射されたグループにおいては、高いレベルを示した。データは下記表11に要約される。

20

【0586】

【表 11】

表11:

膀胱モデル	説明	Zcytor17	OSMR β	Zcytor17 リガンド
グループ1	正常な対照	-	+	-
グループ2	注射後12時間	-	+++	++
グループ3	注射後24時間	-	++	++

30

【0587】

もう1つの実験においては、Zcytor17及びOSMR β 発現レベルを、DSS処理にゆだねられたマウスの遠位結腸において試験した。炎症性腸疾患のことネズミモデルにおいては、両遺伝子の発現レベルを、定量的RT-PCRにより決定し、そして下記表12に要約される。Zcytor17発現レベルは、疾病の重症度と共に上昇し、グループ1の正常動物においては発現レベルは低く、そして上昇レベルがグループ2及び3に見出された。グループ4動物においては、Zcytor17レベルは、より正常なレベルに戻った。Zcytor17発現とは異なって、OSMR β レベルは、対照動物においては最高であり、そしてそのレベルは、すべての3種のDSS処理されたグループにおいて実際、低下した。

40

【0588】

【表 1 2】

表12:

IBDモデル	説明	SAC日		Zcytor17	OSMR β
グループ1	正常な対照	14		+	++
グループ2	DSS-処理された、2日	2		++	+
グループ3	DSS-処理された、7日	7		+++	+
グループ4	DSS-処理された、7日	14		+	+

10

【0 5 8 9】

例28. 多重組織第1鎖cDNAのRT-PCR分析に基づくヒトZcytor17lig組織分布発現

Zcytor17ligの遺伝子発現を、市販の標準化された多重組織第1鎖cDNAパネル (OriGene Technologies, Inc. Rockville, MD; BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) を用いて試験した。それらは、OriGene “Human Tissue Rapid-Scan™ Panel” (カタログ番号CHSCA-101; 22の異なった組織、骨髄及び血漿血液白血球を含む) 及びBD Biosciences Clontech “Human Blood Fractions MTC™ Panel” (カタログ番号K1428-1; 9種の異なった血液画分を含む) を包含した。

【0 5 9 0】

20

PCR反応を、139bpの生成物を生成する、Zcytor17lig特異的オリゴヌクレオチドプライマーZC41,458 (配列番号60) 及びZC41,457 (配列番号61)、及び92bpの生成物を生成する、ZC41,459 (配列番号62) 及びZC41,460 (配列番号63)、Qiagen HotStarTag DNAポリメラーゼ及び緩衝液 (Qiagen, Inc., Valencia, CA)、蒸留水、及びRediLoad™ 色素 (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL) を用いて設定した。PCRサイクラー条件は次の通りであった: 95℃での15分間の初期変性 (1サイクル)、95℃での45秒の第2変性、53℃又は56℃での1分のアニーリング及び72℃での1分15秒の拡張 (45サイクル)、続いて72℃で7分の最終拡張 (1サイクル)。反応を、2%アガロースゲル上での電気泳動により分離し (EM Science, Gibbstown, NJ)、そして臭化エチジウムによる染色により可視化した。

30

【0 5 9 1】

正しいサイズのDNAフラグメントを、OriGene “Human Tissue Rapid-Scan™ Panel” を用いて、次のヒト成人組織において観察した: 精巣、血漿血液リンパ球 (PBL)、及び骨髄。

正しいサブのDNAフラグメントを、BD Biosciences Clontech “Human Blood Fractions MTC™ Panel” を用いて、次のヒト血液画分において観察した: 活性化された単核細胞 (B-&T-細胞及び単球)、活性化されたCD8+細胞 (T-サプレッサー/細胞毒性)、活性化されたCD4+細胞 (T-ヘルパー/インジューサー) 及び休止CD8+細胞 (わずか)。

【0 5 9 2】

例29. ヒトオンコスタチンM受容体のクローニング

40

オンコスタチンM β 受容体 (OSMR β) は、IL12R-B2に類似する構造を有するタイプIサイトカイン受容体である。OSMR β 及びzcytor17を、それらがサイトカインシグナル化複合体においてサブユニットとして相互作用するかどうか、及びそれらが一緒に、zcytor17ligのためのシグナル化受容体又は可溶性受容体アンタゴニストとして作用できるかどうか見出すために試験した。

【0 5 9 3】

OSMR β を単離するために、オリゴヌクレオチドPCRプライマーZC39982 (配列番号64) 及びZC39938 (配列番号65) を、ヒトオンコスタチンM β cDNA配列 (配列番号6) の十分な長さのコード領域を増幅するために企画した (Genbank受託番号U60805; Mosley B, JBC Volume 271, Number 50, Issue of December 20, 1996pp. 32635-32643)。

50

【0594】

PCR反応を、cDNAの源を同定するために、強いポリメラーゼAdvantage II (Clontech, Palo Alto, CA) を用いて、cDNAライブラリー鑄型のアレイに対して行った。使用される鑄型は、5百万の独立したcDNAクローンを個々に含む、増幅されたcDNAプラスミドライブラリーからであった。反応を、鑄型として400fモル/ μ lの個々のオリゴヌクレオチド及び2~20ng/ μ lの増幅されたプラスミドライブラリーDNAを用いて、製造業者の説明書に従ってアッセムリーした。cDNAライブラリーは、次のヒト組織及び細胞系に由来した：胎児脳、前立腺平滑筋、骨髄、RPMI1588、甲状腺、WI-38、精巣、刺激された末梢血液単核細胞、刺激されたCD3+細胞、THP-1、活性化された扁桃、HACAT及び胎児肝臓。反応を、サーモサイクラー機械上で次の条件を用いて行った：95℃で20秒、68℃で3分（30サイクル）
。30サイクルの終結で、68℃で8分の追加の単一の拡張サイクルを行った。

10

【0595】

PCR生成物を、TAEアガロース、臭化エチジウムの存在下でのゲル電気泳動、続くUV照射により可視化した。最も富んだ生成物は、前立腺平滑筋cDNAライブラリーからであることが見出された。前立腺平滑筋鑄型、及びオリゴヌクレオチドZC39982（配列番号64）及びZC39983（配列番号65）を用いてのPCR反応を、やや強いが、しかしより高い適合性の熱安定性DNAポリメラーゼ“turboPFu”（Stratagene, La Jolla, CA）を用いて反復した。30の増幅サイクルを次の条件下で行った：94℃で30秒の変性、63℃で45秒のアニーリング、72℃で3.5分の拡張。単一バンドの生成物を、0.8%TAE、アガロースゲル上でゲル精製した。

20

【0596】

次に、このDNAを、哺乳類発現ベクター中にこのcDNAのクローニングを可能にするために、制限酵素認識配列を含む企画されたプライマーZC39980（配列番号66）及びZC39981（配列番号67）を用いて、再び増幅した。

【0597】

PCR反応を、“TurboPfu”及び精製されたPCR生成物を用いて、次の条件（15サイクル）下で行った：95℃で1分、64℃で1分20秒、72℃で4.5分。次に、PCR反応を、EcoRI及びXhoI（Invitrogen, Carlsbad, CA）により消化し、そして上記のようにしてゲル精製した。哺乳類発現ベクターpZ7NXを、EcoRI及びXhoIによる消化により調製し、そしてPCR生成物を、このベクターに連結し、そしてE. コリDH10b細胞中にエレクトロポレートした。
いくつかの細菌コロニーを単離し、そして配列決定した。1つのクローンが正しかった。但し、単一の非保存性突然変異を除く。予測される配列を適合させるようこの塩基を変えるために、オリゴヌクレオチド拡張突然変異及び隣接するPstI制限部位を、pZP7Nx-h、すなわち鑄型として前もって配列決定されているオンコスタチンM Rプラスミドを用いて、“TurboPfu”とのPCR反応に使用した。

30

【0598】

PCR増幅されたDNAを、PstI及びXhoIにより消化し、そして攻撃性突然変異を含むPst/XhoIフラグメントの代わりにpZP7Nx-hオンコスタチンM Rプラスミド中にクローン化した。この新規プラスミドを、最近増幅されたPstI~XhoI領域にわたって配列決定し、補正を確かにし、そして他の誤りが増幅工程において創造されなかったことを確めた。この分析は、前記コード領域にわたって予測される配列が適合する配列を確認した。この配列は配列番号6で示され、そして対応するアミノ酸配列は、配列番号7で示される。

40

【0599】

例30. ヒトZcytor17/オンコスタチンM受容体（OSMR β ）ヘテロダイマーを創造するための構造体

そのような可溶性ヘテロダイマー受容体の構成、発現及び精製のためのシステムは、当業界において知られており、そして受容体対、すなわちヒトオンコスタチンM受容体（OSMR β ）及びヒトzcytor17適合されて来た。この構造体に関しては、OSMR β のための可溶性受容体についてのポリヌクレオチドは、配列番号68で示され、そして対応するポリペプチドは配列番号69で示され；そしてヒトzcytor17のための可溶性受容体についてのポリヌク

50

レオチドは配列番号70で示され、そして対応するポリペプチドは配列番号71で示される。

【0600】

分泌された可溶性hzcytor17/ヒトOSMR β ヘテロダイマーを発現する細胞を構成するためには、得られるヘテロダイマー可溶性受容体が、C-末端でGlu-Glu標識（配列番号35）と共にIgG γ （Fc4）（配列番号37）のH鎖に融合されるヒトOSMR β の細胞外ドメインを含んで成るよう、構造体が製造され；そしてzcytor17の細胞ガイドメインはC-末端でHis標識（配列番号72）と共にFc4（配列番号37）に融合される。Hzcytor17及びヘテロダイマーのヒトOSMR β アームの両者に関しては、12個のアミノ酸（配列番号73）のGly-Serスペーサーが、受容体の細胞外部分とFc4のN末端との間に構築される。

【0601】

A. ヒト可溶性OSMR β /Fc4-CEEの構成：

ヘテロダイマーのヒト可溶性OSMR β /Fc4-CEE部分の構成に関しては、ヒトOSMR β の細胞外部分を、オリゴZC14063（配列番号48）及びZC41557（配列番号74）によるPCRを用いて、次の通りのPCR反応条件下で単離した：95°Cで60秒、57°Cで30秒、及び72°Cで100秒（30サイクル）；及び72°Cで7分。PCR生成物をQIAquick PCR精製キット（Qiagen）を用いて精製し、EcoRI及びBglIII（Boehringer-Mannheim）により消化し、ゲル電気泳動により分離し、そしてQIAquickゲル抽出キット（Qiagen）を用いて精製した。

【0602】

キメラの発現カセット、プラスミド主鎖及びFc4-GluGlu標識部分は、前もって製造された自家プラスミド内に含まれた。プラスミドベクターを、EcoRI及びBamHI（Boehringer-Mannheim）により消化し、ゲル電気泳動により分離し、そしてQIAquickゲル抽出キット（Qiagen）を用いて精製した。ヒトOSMR β 及びFc4-CEE含有プラスミドの消化され、そして精製されたフラグメントを、T4 DNAリガーゼ（Life Technologies, Bethesda, MD）を用いて、標準連結方法により一緒に連結した。得られる連結のミニプレブを、可溶性OSMR β についての正しいサイズ（772bp）のEcoRI/SmaI挿入体についてスクリーンし、そして陽性ミニプレブを、配列決定し、PCR反応の精度を確めた。この新規プラスミド構造体を、pZP9-ONCOMR-Fc4CEEと命名する。

【0603】

B. ヒト可溶性OSMR β /Fc4-CHISの構成：

ヘテロダイマーのhzcytor17/Fc4-CHIS部分の構成に関しては、ヒトzcytor17の細胞外部分を、Zcytor17-Fc4可溶性受容体を前もって含むプラスミドの活性により単離した。プラスミドを、まずSalI（New England Biolabs, Beverly, MA）により消化し、この後、反応を連続的に、フェノールクロロホルムにより抽出し、そしてエタノール沈殿せしめた。

【0604】

次に、消化されたDNAを、T4 DNAポリメラーゼ（Boehringer-Mannheim）により処理し、SalI消化により創造される5'オーバーハングをフィルインし、DNA末端をブランク化し、この後、反応を連続的に、フェノールクロロホルム抽出し、そしてエタノール沈殿せしめた。ブランク化されたDNAを、BglIII（Boehringer-Mannheim）によりさらに消化し、3'末端で切断し、ゲル電気泳動により分離し、そしてQIAquickゲル抽出キット（Qiagen）を用いて、製造業者の説明書に従って精製した。zcytor17の細胞外ドメインをコードする配列を含む、その得られるDNAフラグメントを、次の通りに調製された哺乳類発現ベクターを含むFc4-CHIS標識に連結した。

【0605】

キメラの発現カセット、プラスミド主鎖及びFc4-CHIS標識部分は、前もって製造された自家プラスミドベクター内に含まれた。このプラスミドベクターを、EcoRI（Boehringer-Mannheim）により消化し、この後、反応を連続的に、フェノールクロロホルム抽出し、そしてフェノール沈殿せしめた。次に、消化されたDNAを、T4 DNAポリメラーゼ（Boehringer-Mannheim）により処理し、EcoRI消化により創造される5'オーバーハングをフィルインし、DNA末端をブランク化し、この後、反応を連続的に、フェノールクロロホルム抽出し、そしてエタノール沈殿せしめた。ブランク化されたDNAを、BamHI（Boehringer-Mannheim）により消化し、この後、反応を連続的に、フェノールクロロホルム抽出し、そしてエタノール沈殿せしめた。

10

20

30

40

50

im)によりさらに消化し、3'末端で切断し、ゲル電気泳動により分離し、そしてQIAquickゲル抽出キット (Qiagen) を用いて、製造業者の説明書に従って精製した。ヒトzcytor17及びFc4-CHIS含有プラスミドの消化され、そして精製されたフラグメントを、ゲル電気泳動により分離し、そして標準の連結方法を用いて、T4 DNAリガーゼ (Life Technologies, Bethesda, MD) を用いて精製した。

【0606】

得られる連結のミニプレブを、次のPCR反応条件と共に、zcytor17特異的センスプライマーZC29180 (配列番号22) 及びFc4特異的アンチセンスプライマーZC29232 (配列番号75) を用いて、PCRによりスクリーンした：94℃で60秒、68℃で150秒及び72℃で7分 (30サイクル)。848bpの予測される生成物サイズは、pZEM228 hzcytor17/Fc4HISと称するプラスミドの正しいアセンブリーを確認した。

10

【0607】

第2のzcytor17-Fc4構造を、COS細胞からのホモダイマータンパク質の生成に使用するために創造した。手短には、十分な融合タンパク質のためのコード領域を、Zcytor17-Fc4可溶性受容体を前もって含むプラスミドのSalI (Boehringer-Mannheim) による消化により単離した。反応を連続的に、フェノールクロロホルム抽出し、そしてフェノール沈殿せしめた。次に、消化されたDNAを、T4 DNAポリメラーゼ (Boehringer-Mannheim) により処理し、EcoRI消化により創造される5'オーバーハングをフィルインし、DNA末端をブラント化し、この後、反応を連続的に、フェノールクロロホルム抽出し、そしてエタノール沈殿せしめた。

20

【0608】

ブラント化されたDNAを、NotI (Boehringer-Mannheim) によりさらに消化し、3'末端で切断し、ゲル電気泳動により分離し、そしてQIAquickゲル抽出キット (Qiagen) を用いて、製造業者の説明書に従って精製した。CMV駆動の発現カセットを含む哺乳類発現ベクターを消化し、適合できる末端を生成し、そして2つのフラグメントを一緒に連結した。得られる連結のミニプレブを、次のPCR反応条件と共に、zcytor17特異的センスプライマーZC14063 (配列番号48) 及びzcytor17特異的アンチセンスプライマーZC27899 (配列番号19) を用いて、PCRによりスクリーンした：94℃で60秒、68℃で150秒及び72℃で7分 (30サイクル)。

【0609】

30

1000bpの予測される生成物サイズは、pZP7NX- hzcytor17-Fc4と称するプラスミドの正しいアセンブリーを確認した。このプラスミドを、Lipofectamine (Gibco/BRL) を用いて、製造業者の説明書に従って、COS細胞中にトランスフェクトした。細胞を、DMEM+5%FBS (Gibco/BRL) において60時間、条件付けし、この後、タンパク質を、プロテインG-セファロース4Bクロマトグラフィーカラム上で精製し、そしてインビトロ バイオアッセイ、例えば本明細書に記載されるそれらのアッセイのために利用可能にした。

【0610】

C. ヒトZcytor17/オンコスタチンM受容体 (OSMR β) の創造：

約16 μ gの個々のpZP9-ONCOMR-Fc4CEER及びpZEM228 hzcytor17/Fc4HISを、Lipofectamine (Gibco/BRL) を用いて、製造業者の説明書に従って、BHK-570 (ATCC No. CRL-10314) 細胞中に同時トランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を、0.5mg/mlのG418 (Gibco/BRL) 及び250nMのメチルトレキセート (MTX) (Sigma, St. Louis, MO) を含むDMEM+5%FBS (Gibco/BRL) において10日間、選択した。

40

【0611】

二重選択された細胞のその得られるプールを用いて、ヘテロダイマータンパク質を生成した。このプールの3種の細胞画分 (Nunc, Denmark) を用いて、10Lの血清フリーのならし培地を生成した。ならし培地を、1mlのプロテイン-Aカラムに通してそして(10) 750 μ lの画分を溶出した。最高濃度を有することが見出されたそれらの画分のうち4種をプレートし、そしてPBSに対して透析した (10KDのMWカットオフ)。所望するヘテロダイマー可溶性zcytor17/OSMR β タンパク質複合体を、ニッケルカラムに前記プールを通し、そ

50

して種々の濃度のイミダゾールによりカラム洗浄することにより、他の培地成分から単離した。zcytor17/OSMR β タンパク質は中間濃度のイミダゾールで溶出し、そしてhcytor17/Fc4HISホモダイマーはより高い濃度のイミダゾールで溶出した。

【0612】

例31. ノザンブロット及びPCRを用いての組織パネルにおけるヒトzcytor17の組織分布

A. ノザンブロットを用いてのヒトzcytor17組織分布：

Human multiple Tissue Northern Blots (Human 12-lane MTN Blot I and II, 及びHuman Immune System MTN Blot II; Human Endocrine MTN, Human Fetal MTN Blot II, Human Multiple Tissue Array) (Clontech), 及び種々の組織を含む自家プロットを、プローブし、ヒトzcytor17発現の組織分布を決定した。自家調製されたプロットは、次の組織及び細胞系mRNAを含んだ：SK-Hep-1細胞、THP1細胞、副腎 (Clontech)；腎臓 (Clontech)、肝臓 (Clontech及びInvitrogen)；脊椎 (Clontech)、精巣 (Clontech)、ヒトCD4+T-細胞、ヒトCD8+T-細胞、ヒトCD19+T-細胞、ヒト混合されたリンパ球反応物 (MLR)、THP1細胞系 (ATCC No. TTB-202)、U937細胞系、p338D1マウスリンパ芽球細胞系 (ATCC No. CCL-46) (イノマイシンにより刺激されているか又はされていない)；及びWI-38ヒト胚肺細胞系 (ATCC No. CRL-2221) (イノマイシンにより刺激されているか又はされていない)。

【0613】

zcytor17 (配列番号4) のための約500bpのPCR由来のプローブを、プライマーとしてオリゴヌクレオチドZC28,575 (配列番号77) 及びZC27,899 (配列番号19) を用いて増幅した。PCR増幅を次の通りに行った：94℃で1分、65℃で1分及び72℃で1分 (30サイクル)；続いて72℃で7分 (1サイクル)。PCR生成物をアガロースゲル電気泳動により可視化し、そして約500bpのPCR生成物を、本明細書に記載のようにしてゲル精製した。プローブを、PRIME IT IITM Random Primer Labeling Kit (Stratagene) を用いて、その製造業者の説明書に従って、放射性ラベルした。プローブを、NUCTRAPTM プッシュカラム (Stratagene) を用いて精製した。EXPRESSHYBTM (Clontech) 溶液を、プレハイブリダイゼーションのために、及びノザンブロットのためのハイブリダイゼーション溶液として使用した。プレハイブリダイゼーションは、68℃で2時間、行われた。

【0614】

ハイブリダイゼーションは、約 1.5×10^6 cpm/mlのラベルされたプローブにより68℃で一晩を要した。プローブを、室温で $2 \times \text{SSC}$ 、0.05%のSDSにより3度、続いて、 $2 \times \text{SSC}$ 、0.1%SDSにより50℃で10分間、1度、洗浄した。いくつかの薄いバンドが、数日の暴露の後、見られた。約9kbの転写体が、気管、骨格筋及び胸腺に見られ；約2kbの転写体がPBL、HPV、U937及びTHP-1細胞に見られ；そして約1.2kbの転写体が胎盤、骨髄及び甲状腺、及びHPV及びU937細胞に見られた。上記列挙されるすべての組織においては、シグナルの強さは薄かった。ほとんどの正常な組織においては、ほとんど発現が出現せず、このことは、zcytor17の発現する細胞又は組織の活性化に依存することを示唆する。

【0615】

B. PCRを用いての組織パネルにおける組織分布：

ヒト組織からのcDNAのパネルを、PCRを用いて、zcytor17発現についてスクリーンした。パネルは自家製造され、そして種々の正常及び癌性ヒト組織からの94種のマラソンcDNA及びcDNAサンプルを包含し、そして細胞系は下記表13及び表14に示される。前記cDNAは自家ライブラリーからであり、又はマラソンcDNAは自家RNA調製物、すなわちClontech RNA又はInvitrogen RNAからであった。マラソンcDNAは、マラソン-ReadyTM キット (Clontech, Palo Alto, CA) を用いて製造され、そしてクラスリンプライマーZC21,195 (配列番号78) 及びZC21,196 (配列番号79) によりQC試験し、そして次に、クラスリンバンドの強さに基づいて希釈された。

【0616】

パネルサンプルの性質を評価するために、品質管理 (QC) についての次の3種の試験を行った：(1) ライブラリーのために使用されるRNA品質を評価するために、自家cDNAを

10

20

30

40

50

、個々のcDNAライブラリーについてのベクター配列に対して特異的であるベクターオリゴによるPCRにより、平均挿入体について試験し；（２）パネルサンプルにおけるcDNAの濃度の標準化を、5'ベクターオリゴZC14,063（配列番号48）及び3'α-チューブリン特異的オリゴプライマーZC17,574（配列番号49）又は3'G3PDH特異的オリゴプライマーZC17,600（配列番号50）を用いて、十分な長さのαチューブリン又はG3PDH cDNAを増幅するために、標準のPCR方法を用いて達成し；そして（３）サンプルを、可能なリボソーム又はミトコンドリアDNA汚染について調べるために配列決定に送った。

【0617】

パネルを、ヒトゲノムのDNA（Clontech, Palo, Alto, CA）陽性対照サンプルを含む96ウェル形式において組み立てた。個々のウェルは約0.2~100pg/μlのcDNAを含んだ。PCR反応を、オリゴZC26,358（配列番号80）及びZC26,359（配列番号81）、Takara Ex TaqTM（TAKARA Shuzo Co. LTD, Biomedicals Group, Japan）、及びRadiload 色素（Research Genetics, Inc., Huntsville, AL）を用いて組み立てた。増幅を次の通りに行った：94℃で2分（1サイクル）、94℃で30秒、66.3℃で30秒及び72℃で30秒（35サイクル）、続いて72℃で5分（1サイクル）。約10μlのPCR反応生成物を、4%アガロースゲルを用いての標準のアガロースゲル電気泳動にゆだねた。正しい推定されるDNAフラグメントサイズを、リンパ節、前立腺、甲状腺、HPV（前立腺上皮）、HPVS（選択された前立腺上皮）、肺腫瘍、子宮腫瘍反応及びゲノムDNA反応において観察した。

【0618】

前立腺組織（2種のサンプル）、HPV（前立腺上皮）、HPVS（選択された前立腺上皮）及びゲノムについてのDNAフラグメントを切除し、そしてGel Extractionキット（Qiagen, Chatsworth, CA）を用いて、製造業者の説明書に従って精製した。フラグメントを、それらが実際、zcytor17であることを示すために、配列決定により確かめた。

【0619】

10

20

【表 1 3】

表13:

組織/細胞系	サンプル#	組織/細胞系	サンプル#
副腎	1	骨髄	3
膀胱	1	胎児脳	3
骨髄	1	ランゲルハンス島	2
脳	1	前立腺	3
頸部	1	RPMI#1788 (ATCC#CCL-156)	2
結腸	1	精巣	4
胎児脳	1	甲状腺	2
胎児心臓	1	WI38 (ATCC#CCL-75)	2
胎児腎臓	1	ARIP (ATCC#CRL-1674-rat)	1
胎児肝臓	1	HaCat-ヒトケラチノサイト	1
胎児肺	1	HPV (ATCC#CRL-2221)	1
胎児筋肉	1	副腎	1
胎児皮膚	1	前立腺SM	2
心臓	2	CD3+選択されたPBMC イノマイシン+PMA刺激された	1
K562 (ATCC#CCL-243)	1	HPVS (ATCC#CRL-2221)-選択された	1
腎臓	1	心臓	1
肝臓	1	下垂体	1
肺	1	胎盤	2
リンパ節	1	唾液腺	1
メラノーマ	1	HL60 (ATCC#CCL-240)	3
脾臓	1	血小板	1
下垂体	1	HBL-100	1
胎盤	1	腎系球体間質	1
前立腺	1	T-細胞	1
直腸	1	好中球	1
唾液腺	1	MPC	1
骨格筋	1	Hut-102 (ATCC#TIB-162)	1
小腸	1	内皮	1
脊椎	1	HepG2 (ATCC#HB-8065)	1
脾臓	1	線維芽細胞	1

【0 6 2 0】

【表 1 4】

表14：

組織/細胞系	サンプル#	組織/細胞系	サンプル#
胃	1	E. Histo	1
精巣	2		
胸腺	1		
甲状腺	1		
気管	1		
子宮	1		
食道	1		
胃腫瘍	1		
腎臓腫瘍	1		
肝臓腫瘍	1		
肺腫瘍	1		
卵巣腫瘍	1		
直腸腫瘍	1		
子宮腫瘍	1		

10

20

【0 6 2 1】

C. PCR及びノザンによるzcytor17の発現分析：

受容体の発現に影響を及ぼす細胞及び成長条件の注釈は、リガンド源のその機能を誘発し、そしてその源を予測する有用な手段である。このためには、本発明者は広範囲の種類
の組織及び細胞型を調査した。熱安定性ポリメラーゼAdvantage IITM (Clontech, La Jol
la, CA) を、オリゴヌクレオチドプライマーZC29,180（配列番号22）及びZC29,179（配列
番号82）、及び下記に列挙される1～10ngの種々のcDNA鋳型と共に、30の増幅サイクル（
94℃で30秒；66℃で20秒；68℃で1.5分）の間、使用した。これに続いて、個々の反応20
%を、0.8%アガロース、TAE/臭化エチジウムゲル上で行い、そしてUV光により可視化し
た。次に、サンプルを、バンドの強度に基づいて評点を付けた。下記表15を参照のこと。

30

【0 6 2 2】

【表 1 5】

表15：

細胞及び条件	評点 0 - 5
PMAにより刺激されたHeI	0
U937	3
MCF-7	0
HuH7	1
ヒト小胞	0
HT-29	0
HEPG2	0
IL6により刺激されたHepG2	0
ヒト皮膚内皮	0
ヒト静脈内皮	0
ヒトCD4+	0
BEWO	0
ヒトCD19+	1
PHA、PMA、イノマイシン、IL2、IL4、TNF α により24時間刺激されたヒトPBMC	0
LPS、PWM、IFN γ 、TNF α により24時間刺激されたヒトPBMC	0
上記条件のすべてにより48時間刺激されたヒトPBMC	4
HUVEp. 2	4
RPMI1788	0
TF1	0
PMA、イノマイシンにより刺激されたサル脾臓T細胞	0
形質転換されたヒト前立腺上皮HPV	5
炎症されたヒト扁桃	0
HACAT	0
ヒト軟骨細胞	1
ヒト滑液細胞	1
THP1	5
REH	0

【0 6 2 3】

強い陽性のPCRシグナルのうち、2種は、ヒト単球細胞系U937及びTHP1からであった。

前立腺上皮系と共にそれらの2種の細胞系を、ノザンプロットによる分析のために選択した。種々の組織からのmRNAを用いてのノザン分析による転写体の可視化でのこれまでの試みは、強く且つ拡散性のシグナルを、7~10kbの驚くべき大きなサイズ範囲で生成し、これは、このデータを解釈するのに困難にしている。変性ホルムアルデヒド/MOPS/0.8%アガロースゲルを調製し (RNA Methodologies, Farrell, RE Academic Press)、そして2 μ gのポリA+mRNAを、RNAラダー (Life Technologies, Bethesda, MD) と共に、個々のサンプルについて試験した。

【0 6 2 4】

次に、ゲルを、Hybondナイロン (Amersham, Buckinghamshire, UK) に移し、UV架橋し、そしてオリゴZC28,575 (配列番号77) 及びZD27,899 (配列番号19) によるPCRにより生成され、そしてMegaprime 32 Pキット (Amersham) によりラベルされたヒトzcytor17に、プローブを用いて68°Cで一晩、ExpressHyb溶液 (Dlontech, LaJolla, CA) においてハイブリダイズした。ノザンプロットを、65°Cで15分間、0.2×SSC及び0.1%SDSにより連続的

に洗浄し、そして強化スクリーンにより7日間、フィルムに照射した。卓越した8kbのバンドが、前立腺上皮及びU937系の両者において見出され、そしてより薄いバンドがTHP1レーンに存在した。

【0625】

ハイブリダイゼーションとして使用されるcDNAを最適化するために、4種の異なった領域の十分な長さのヒトzcytor配列を、PCRにより増幅し、ラベルし、ゲノム及び増幅されたcDNAライブラリーDNAを含むサザンブロットに、上記のようにしてハイブリダイズした。本明細書においてプローブA-Dと命名された4種のプローブを、次のプライマー対を用いて増幅した：(A) ZC28,575 (配列番号77)、ZC27,899 (配列番号19)；(B) ZC27,895 (配列番号20)、ZC28,917 (配列番号83)；(C) ZC28,916 (配列番号84)、ZC28,918 (配列番号85)；及び(D) ZC28,916 (配列番号84)、ZC29,122 (配列番号21)。PCRによりzcytor17を含むことが示されている、増幅されたcDNAライブラリーと共にゲノムDNAを、EcorI及びXhoIにより消化し、挿入体を生成し、そして重複TAE/0.8%アガロースゲル上に負荷し、0.5MのNaOH、1.5MのNaClにより変性し、Hybondにブロットし、UV架橋し、そして明確なプローブによりそれぞれハイブリダイズした。プローブBは、最少の非特異的結合及び最強のシグナルを有することが見出された。従って、プローブBを、すべての続くハイブリダイゼーションのために使用した。

10

【0626】

THP1細胞が循環性単球の卓越したモデルであり、そして低レベルでzcytor17を発現する場合、本発明者は、zcytor17の発現を高めるために、種々の化合物によりそれら进行处理した。細胞を、 2×10^5 /mlの密度に増殖し、種々の刺激培地により洗浄し、そしてそれに再懸濁し、4～30時間、増殖し、そしてRNA調製のために収穫した。

20

【0627】

個々の培地を、次の薬剤又はサイトカイン対の1つにより補充した：LPS 2 μ l/ml (Sigma Chemicals, St Louis, MO)、hTNF α 2ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN)、hGM-CSF 2ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN)、hIFN γ 50ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN)、hM-CSF 1ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN)、hIL6 1ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN)、hIL1 β 2ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN)、hIFN γ 50ng/ml + hIL4 0.4ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN)、hIFN γ 50ng/ml + hIL10 1ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN)、PMA 10ng/ml (Calbiochem, San Diego, CA) 及び未処理の対照。

30

【0628】

培養期間の最後で、全RNAを、RNAeasy Midi-キット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて調製した。ポリA+RNAを、MPGキット (CPG, Lincoln Park, NJ) を用いて、前記全RNAから選択した。個々の状態からのポリA+RNA 2 μ gを、ホルムアルデヒド/MOPS/アガロースゲル上に負荷し、上記のようにして、ナイロンに移し、そしてUV照射した。次に、それらのノザンブロットを、上記のようにして、プローブBに対して、68°Cで一晩、ハイブリダイズし、65°Cで0.2 $\times$ SSC、0.1% SDSにより高い緊縮性下で洗浄し、フィルムに一晩、照射し、次に、シグナル定量化のためにリン光体スクリーンに照射した (図2を参照のこと)。

40

【0629】

卓越した8kbのmRNA及び比較的弱い2.8kbのバンドが、すべてのレーンに見られた。zcytor17 mRNAの20倍の上昇がhIFN γ により30時間、処理された細胞からのRNAに見られ、この効果は、IL4による同時処理によりわずかに弱められた。mRNAにおけるマイナーな3倍の上昇がLPS、TNF α GM-CSFにより処理された細胞からのRNAに見出されたが、M-CSF、IL6及びIL1 β はzcytor17 mRNAレベルに対して効果を有さなかった。一緒に考えると、このデータは、単球マクロファージ生物学において、及びそれらの細胞が関係するいずれかの数の疾病工程の延長により、zcytor17受容体及びそのリガンドについての役割を示唆する。

【0630】

例32. ノザンブロット及びPCRを用いての組織パネルにおけるヒトzcytor17の組織分布

50

ヒトzcytor17lig cDNAフラグメントを、遺伝子特異的プライマー：センスプライマー-ZC41438（配列番号93）及びアンチセンスプライマー-ZC41437（配列番号94）、及び鋳型ヒトzcytor17lig cDNA（配列番号90）によるPCRを用いて得た。このフラグメントを、標準の方法を用いて精製し、そして約25ngを、Prime-It RmTランダムラベリングキット（Staratagene）を用いて、 ^{32}P dCTPによりラベルし、そしてUltarahyb（Ambion）においてハイブリダイズし、そしてBiomaxフィルム/増強スクリーンを個々の場合、創造業者の推薦に従って暴露するために使用した。ClontechからのClontech Human 12レーンMTN II及びヒト脳MTNプロットIV、ヒト免疫系MTN II及びヒトMTEアレイIIを包含する。新規のこれまで未使用のプロットを、Ambion ultrahyb方法に従って、42°Cで一晩ハイブリダイズした。陽性プロットは、ヒト12レーンMTN（Clontech）を包含した。試験された12種の組織のうち、胎盤のみが約1.2kbの転写体に対して陽性であった。

10

【0631】

例33. ヒトzcytor17lig-CEEを発現する哺乳類発現ベクターの構成

A. zCyt17Lig-CEE/pZMP21の構成：

zCyt17Lig-CEE（配列番号95）をコードするポリヌクレオチドのすべて又は一部を含む発現プラスミドを、相同組換えにより構成した。プラスミドは、zCyt17Lig-CEE/pZMP21と呼ばれた。

【0632】

zCyt17Lig-CEE/pZMP21の構成を、PCR増幅を用いて、zCyt17Lig-CEEフラグメントを生成することによって達成した。zCyt17Lig-CEEフラグメントの生成のために使用されるDNA鋳型は、zCyt17Lig/pZP7nxであった。zCyt17Lig-CEEフラグメントの生成のために使用されるプライマーは、次のものであった：（1）5'から3'末端側に、28bpのベクターフランキンク配列（挿入体の5'側）及びzCyt17Ligの5'配列に対応する21bpを含むZC41607（配列番号97）（センス配列）；及び5'から3'末端側に、37bpのベクターフランキンク配列（挿入体3'側）、3bpの停止コドン、C-末端EE標識をコードする21bp、及びzCyt17Lig配列3'末端に対応する21bpを含むZC41605（配列番号98）（アンチセンス配列）。上記PCR増殖に起因するフラグメントは、C末端EE標識の追加を有する鋳型zCyt17Ligのコピーであり、zCyt17Lig-CEEの最終生成物を生成する。

20

【0633】

PCR反応を次の通りに行った：100 μl の最終体積に、次のものを添加した：15mMのMgClを有する10 $\times$ Taqポリメラーゼ反応緩衝液10 μl 、1 μl のTaq DNAポリメラーゼ（5単位/ μl 、Gibco）、3 μl の10mMのdNTP、78 μl の蒸留水、プライマー-ZC41607（配列番号97）の20pモル/ μl ストック3 μl 、プライマー-ZC41605（配列番号98）の20pモル/ μl ストック3 μl 、及びzCyt17lig鋳型DNAの0.13 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ストック2 μl 。50 μl に等しい体積の鉱油を、前記混合物に添加した。反応を、94°Cへの5分間の加熱；続いて94°Cで1分；55°Cで2分；72°Cで3分（35サイクル）；続いて、72°Cでの10分の拡張、及び反応を集めるまで、4°Cでの維持。

30

【0634】

プラスミドpZMP21を、BglII酵素により制限消化し、超遠心分離プロトコルを用いて、QiaQuick PCR精製キット（Qiagen）により清浄し、そしてPCRフラグメントによる組換えのために使用した。プラスミドpZMP21を、pRS316（American Type Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209に寄託され、そしてNo. 77145として受託される）から取られた酵母遺伝子要素、ポリオウィルスからのIRES要素、及びトランスメンブランドメインのカルボキシル末端で切断された、CD8の細胞外ドメインから構成されたpZMP20から構成した。pZMP21は、MPSVプロモーター、免疫グロブリンシグナルペプチドイントロン、コード配列の挿入のための複数の制限部位、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類発現ベクターである。プラスミドはまた、複製のE. コリ起点、SV40プロモーター、エンハンサー及び複製の起点を有する哺乳類選択マーカー発現単位、SV40ターミネーター、及びS. セレビスシアエにおける選択及び複製のために必要とされるURA3及びCEN-ARS配列を有する。

40

50

【0635】

50 μ lのコンピテント酵母細胞 (S.セレビシアエ) を、それぞれ約100ngの切断されたプラスミド、5 μ lの前記PCR混合物と共に組合し、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” Ω 、25 μ Fで、電気パルスした。個々のキュベットに、1.2Mのソルビトール600 μ lを添加し、そして酵母を、2種のURA-Dプレート上の1つの100 μ lのアリコート及び1つの300 μ lアリコートにプレートし、そして30°Cでインキュベートした。約72時間後、単一のプレートからのUra+酵母形質転換体を、1mlの水に再懸濁し、そして短時間、回転せしめ、酵母細胞をペレット化した。

【0636】

10

その細胞ペレットを、500 μ lの溶融緩衝液 (2 %Triton X-100, 1%SDS, 100mMのNaCl、10mMのトリス、pH8.0, 1mMのEDTA) に再懸濁した。この溶融混合物500 μ lを、300 μ lの酸洗浄されたガラスビーズ及び300 μ lのフェノールクロロホルムを含むEppendorf管に添加し、1分間、2又は3度、かき混ぜ、続いて5分間、最大速度で、Eppendorf遠心分離機において回転せしめた。300 μ lの水相を、新しい管に移し、そしてDNAを600 μ lの100 %エタノール (EtOH) により沈殿せしめ、続いて、4 °Cで10分間、遠心分離した。次に、DNAペレットを、500 μ lの70 %エタノールにより洗浄し、続いて4°Cで1分間、遠心分離した。DNAペレットを30 μ lの水に再懸濁した。

【0637】

エレクトロコンピテントE.コリ細胞 (MC1061) の形質転換を、5 μ lの酵母DNA調製物及び50 μ lのMC1061細胞により行った。細胞を、2.0kV、25mF及び400オームで電気パルスした。エレクトロポレーションの後、600 μ lのSOC (2 %Bucto™ Trypton (Difco, Detroit, MI), 0.5%酵母抽出物 (Difco)、10mMのNaCl、2.5mMのKCl、10mMのMgCl₂、10mMのMgSO₄、20mMのグルコース) を、添加した。エレクトロプレートされたE.コリ細胞を、250 μ l及び50 μ lのアリコートで、2個のLB AMPプレート (LBブイオン (Lennox)、1.8%Bato Agar (Difco)、100mg/Lのアンピシリン) 上にプレートした。プレートを、37°Cで約24時間、逆にしてインキュベートした。3個のアンピシリン耐性コロニーを、ランダムに選択し、そして挿入体の配列分析のために提出した。大規模プラスミドDNAを、Qiagen Maxiキット (Qiagen) を用いて、その製造業者の説明書に従って、配列確認されたクローンから単離した。

20

30

【0638】

B. zCytol17Lig (m)-CEE/pZMP21の構成：

ネズミzCytol17Lig-CEE (配列番号104及び105) をコードする完全なオリゴヌクレオチドを含む発現プラスミドをまた、上記例33Aに記載される方法を用いて、相同組換えにより構成した。使用されるプライマーは、次のものであった：(1) 挿入点の28bpの5'側ベクターオーバーラップ、zcytor17lig(m)の5'末端の21bpを有するZC41643 (配列番号106) (逆方向、5'→3'アンチセンス)、及び(2) 挿入点の3'の37bpベクターオーバーラップ；3bpの停止コドン；21bpのC-末端EE標識；zCytol17Lig (m)-CEEの3'末端の24bpを有するZC41641 (配列番号107) (逆方向、5'→3'アンチセンス)。プラスミドを、zcytor17lig (m)-CEE/pZMP21と命名した。zcytor17lig (m)-CEEのポリヌクレオチド配列は、配列番号104で示され、そして対応するポリペプチド配列は配列番号105で示される。

40

【0639】

例34. zcytor17lig-CEEポリペプチドのトランスフェクション及び発現

A. 293T細胞におけるヒトzCytol17Lig-CEE/pZMP21の発現：

Zcytor17Lig-CEEを、293T細胞 (Stanford University School of Medicine, Stanford, CA; ATCC No. SD-3515) において一時的に発現し、初期精製されたタンパク質を生成した。トランスフェクションの前、293T細胞を、フラスコ当たり合計体積30mlの培養培地 (SL7V4+5%FBS+1%Pen/Strep) を有する30のT162培養フラスコに、 6.5×10^4 個の細胞/cm²で接種した。細胞を、37°Cで24時間インキュベートした。

【0640】

50

DNA/リボソーム混合物を次の通りに調製した。2つの50mlの円錐形管を、25mlのトランスフェクション培地（SL7V4+1%Pen/Strep）により満たしそして1.13mgのzCytol17Lig-CEE/pZMP21（例33）を、それぞれに添加した。別の組の2つの50mlの円錐形管を、22mlのトランスフェクション培地（上記）により満たし、そして3mlのリボソーム（Lipofectamine, Gibco）を個々に添加した。個々の組の管に関しては、1つの管のDNAを1つの管のリボソームに添加し、そしてDNA/リボソーム混合物を30分間インキュベートした。DNA/リボソーム混合物を含む、2つの50mlの円錐形管をプールし（約100ml）、そして300mlのトランスフェクション培地を添加した。

【0641】

293T細胞の30のフラスコをデカントし、約15mlのPBSにより1度、洗浄し、そして12.4mlの希釈されたDNA/リボソーム混合物を、個々のフラスコに添加した。フラスコを37℃で3時間インキュベートした。インキュベーション期間の後、25mlの培養培地（上記）を、個々のT162フラスコに添加した。トランスフェクション培地を、約96時間後、収穫し、そしてタンパク質精製のための使用した（例35）。

【0642】

B. BHK細胞におけるヒトzcytor17lig-CEE/pZMP21の発現：

十分な長さのzCytol17Ligタンパク質を、zCytol17Lig CEE/ pZMP21（上記例33を参照のこと）によりトランスフェクトされたBHK細胞において生成する。BHK570細胞（ATCC CRL-10314）を、T75組織培養皿にプレートし、そして増殖培地（SL7V4、5%ウシ胎児血清、1%ペニシリン/ストレプトマイシン）において、37℃で一晩、5%CO₂下で、約50~70%の集密性まで増殖する。次に、細胞を、血清フリー（SF）培地（SL7V4）において、リボソーム-介在性トランスフェクション（LipofectamineTM; Life Technologiesを用いて）に従って、zCytol17Lig CEE/ pZMP21によりトランスフェクトした。プラスミド（16μg）を1.5mlの管においてSF培地に希釈し、640μlの合計最終体積にする。

【0643】

脂質混合物35μlを、SF培地605μlと共に混合し、そしてその得られる混合物を、室温で約15分間インキュベートする。次に、5mlのSF培地を、DNA：脂質混合物に添加する。細胞を10mlのPBSにより1度すすぎ、PBSをデカントし、そしてDNA：脂質混合物を添加する。細胞を、37℃5時間インキュベートし、次に15mlの培地（SL7V4、5%ウシ胎児血清、1%ペニシリン/ストレプトマイシン）を個々のプレートに添加する。プレートを37℃で一晩インキュベートし、そしてDNA：脂質混合物を、次の日、選択培地（SL7V4、5%ウシ胎児血清、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、1μMのMTX）により交換する。トランスフェクションの約10日後、T75トランスフェクションフラスコからのメトトレキサート耐性コロニーを、トリプシン処理し、そして細胞をプールし、そしてT-162フラスコ中にプレートし、そして大規模培養に移す。

【0644】

C. 293T細胞におけるヒトzCytol17Lig-CEE(m)/pZMP21の発現：

マウスzCytol17Lig(m)-CEEを、例34Aに記載のようにして、293T細胞において1時的に発現し、そして培養された培地を、タンパク質精製のために使用した（例35）。

【0645】

例35. 293T細胞からのZcytor17lig-CEEの精製

特にことわらない限り、すべての操作は4℃で行われた。次の方法を、C-末端Glu-Glu（EE）標識（配列番号103）を含むマウス及びヒトZcytor17ligを精製するために使用した。Zcytor17lig-CEE（例34）を発現する293T細胞からのならし培地を、精製した。ならし培地の合計の標的物タンパク質濃度を、抗-EE抗体を用いて、SDS-PAGE及びウェスタンブロット分析により決定した。

【0646】

5.5mlのカラム体積の抗-EE Poros50A（PE BioSystems, Framingham, MA）（下記のようにして調製された）を、Waters AP-1, 1cm×7cmのガラスカラム（Waters, Milford, MA）に注いだ。カラムを流動充填し、そしてリン酸緩衝溶液（PBS）（pH7.4）により、BioCad

10

20

30

40

50

Sprint (PE BioSystems, Framingham, MA) 上で平衡化した。ならし培地を、NaClにより0.3Mに調節し、そしてpHを7.2に調節した。次に、ならし培地を、約3ml/分の流速で一晩、カラム上に充填した。カラムを、10カラム体積 (CV) のPVS (pH7.4) により洗浄し、そして再び、3CVの5×Sigma PBS (pH7.4) により洗浄した。それを、3ml/分で、0.5Mのアセトン、0.5MのNaCl (pH2.5) により段階的溶出した。画分管は、溶出液をすぐに中和するために、1mlのトリス塩基 (pH調節されていない) を含んだ。

【0647】

カラムを再び、中和するために、5×Sigma PBS (pH7.4) により洗浄し、そして次に、PBSにより平衡化した。2ml画分を、完全な溶出クロマトグラフィー上で集め、そして280及び215nmでの吸光度をモニターし；通過物及び洗浄プールをまた、保存し、そして分析した。5×PBS及び酸溶出ピーク画分を、一次抗体抗-EE及び二次抗体、接合されたマウス-HRPにより、SDS-PAGE銀染色及びウェスタンブロットを通して、標的タンパク質について分析した。興味ある酸溶出画分をプールし、そして5000ダルトン分子量カットオフ膜回転濃縮機 (Millipore, Bedford, MA) を用いて、その製造業者の説明書に従って、38mlから0.8mlに濃縮した。

10

【0648】

凝集された材料及びいずれかの汚染性同時精製タンパク質からZcytor17lig-CEEを分離するために、プールされた濃縮画分を、PBSにより平衡化され、そしてBioCad Sprintを用いて、1.0ml/分の流速で充填される、1.6×60cm (120ml) のSephadex 75 (Pharmacia, Piscataway, NJ) カラム上でのサイズ排除クロマトグラフィー処理にゆだねた。3mlの画分を、全クロマトグラフィーを通して集め、そして280及び215nmでの吸光度をモニターした。ピーク画分を、SDS-PAGE銀染色により特徴づけ、そして最も純粋な画分のみをプールした。この材料は、精製されたZcytor17lig-CEEタンパク質を提供した。

20

【0649】

ウェスタンブロットされた、クーマシーブルー及び銀色されたSDS-PAGEゲル上で、Zcytor17lig-CEEは、1つの主要バンドであった。精製された材料のタンパク質濃度を、BCA分析 (Pierce, Rockford, IL) により行い、そしてタンパク質を等分し、そして標準の方法に従って、-80℃で貯蔵した。

【0650】

PorosA50抗-EEを調製するために、65mlの層体積のPorosA50 (PE Biosystems) を、100mlの水及び次に、0.1Mのトリエタノールアミン、pH8.2 (TEA, ICN, Aurora, Ohio)、1Mの硫酸ナトリウム (pH8.8) の0.02%アジ化ナトリウム含有溶液により、真空フラスコフイルターユニットを用いて洗浄した。300mlの体積中、2mg/mlの濃度でのEEモノクローナル抗体溶液を、250mlの体積の洗浄された樹脂と共に混合した。室温で一晩でのインキュベーションの後、結合されなかった抗体を、5体積の200mMのTEA、1Mの硫酸ナトリウム、pH8.8の0.02%アジ化ナトリウム含有溶液により樹脂を洗浄することによって除去した。

30

【0651】

樹脂を、2体積のTEA、1Mの硫酸ナトリウム (pH8.8) の0.02%アジ化ナトリウム含有溶液に再懸濁し、そして適切な容器に移した。3mlの25mg/ml (68mM) のジスクシンイミジルスベレート (Pierce, Rockford, ILにより供給されるDMSO中) を添加し、そしてその溶液を、室温で3時間インキュベートした。次に、樹脂上の非特異的部位を、真空フラスコフイルターユニットを用いて、200mMのTEA (pH8.8) 中、20mMのエタノールアミン (Sigma, St. Louis, MO) 5体積と共に室温で10分間インキュベートすることによりブロックした。樹脂を、PBS (pH7.4)、続いて0.1Mのグリシン (pH3) により洗浄し、そして10×PBSにより中和した。蒸留水による洗浄の後、最終のカップリングされた抗-EE Poros-A50樹脂を、20%エタノールにおいて、4℃で貯蔵した。

40

【0652】

例36. ヒト及びマウスZcytor17ligのN-末端配列決定

A. ヒトZcytor17ligのN-末端配列決定：

50

標準の自動化されたN-末端ポリペプチド配列決定（エドマン分解）を、Applied Biosystemsからの試薬を用いて行った。N-末端配列分析を、Mode 1494 Protein Sequencer System (Applied Biosystem, Inc., Foster City, CA) 上で行った。データ分析を、Model 610A Data Analysis System for Protein Sequencing, バージョン2.1a (Applied Biosystems) により行った。

【0653】

精製されたヒトzcytor17lig-CEEサンプル（例35）を適用した。サンプルを、N-末端配列決定のために、調製されたガラス繊維フィルター上に負荷した。ガラス繊維フィルターは、それをBiobrene™ と共に予備循環することによって調製された。

分泌されたヒトzcytor17ligポリペプチドのN-末端配列分析は、シグナル配列の予測される分解部位を確認しなかったが、しかしヒトzcytor17lig前駆体配列の配列番号2における残基27（Leu）での成熟開始をもたらした。

【0654】

B. ヒトZcytor17ligのN-末端配列決定：

標準の自動化されたN-末端ポリペプチド配列決定（エドマン分解）を、Applied Biosystemsからの試薬を用いて行った。N-末端配列分析を、Mode 1494 Protein Sequencer System (Applied Biosystem, Inc., Foster City, CA) 上で行った。データ分析を、Model 610A Data Analysis System for Protein Sequencing, バージョン2.1a (Applied Biosystems) により行った。

【0655】

精製されたマウスzcytor17lig-CEEサンプルを、プロテインGセファロース/抗-EEビーズ（例35）上に捕獲されるように、供給した。ビーズを、Novex SDS PAGEシステム（4～12%のビストリスMES NuPAGE; Invitrogen）を用いて、その製造業者の説明書に従って、還元SDS-PAGEサンプル緩衝液に、及びSDS-PAGE上での走行の前、煮沸水浴上に配置した。ゲルを、Novex PVDF膜（Invitrogen）にエレクトロトランスファーし、そして標準方法を用いて、クーマシーブルー染色した（Sigma, St. Louis, MO）。対応する抗-EEウェスタンブロットを行い、N-末端タンパク質配列決定のためのzcytor17ligバンドを同定した。使用されるマウス抗-EE IgG HRP接合された抗体を自家製造した。

【0656】

分泌されたマウスzcytor17ligポリペプチドのN-末端配列分析は、マウスzcytor17lig前駆体配列の配列番号11及び91に関して、31（Ala）での成熟開始をもたらすシグナル配列の予測される分解部位を確認した。

【0657】

例37. COS細胞結合アッセイ

結合アッセイを用いて、zcytor17受容体を含んで成る受容体、例えばzcytor17受容体を含んで成るzcytor17受容体又は受容体ヘテロダイマー及びトリマー（例えば、zcytor17/OSMR, zcytor17/WSX-1, 又はzcytor17/OSMR/WSX-1, 又は他のクラスIサイトカイン受容体サブユニット）へのzcytor17ligの結合を試験した。zcytor17受容体プラスミドDNAを、COS細胞中にトランスフェクトし、そしてトランスフェクトされたCOS細胞を用いて、下記のように、zcytor17受容体を含んで成る受容体へのzcytor17ligの結合を評価した。

【0658】

A. COS細胞トランスフェクション：

COS細胞トランスフェクションを次の通りに行った：次の組合せでの受容体プラスミドDNA800ng: pZp7pX/zcytor17のみ；pZp7pX/WSX-1のみ；pZp7pX/OSMRのみ；pZp7pX/zcytor17+ pZp7pX/OSMR；pZp7pX/zcytor17+ pZp7pX/WSX-1；pZp7pX/OSMR+ pZp7pX/WSX-1；pZp7pX/zcytor17+ pZp7pX/OSMR+ pZp7pX/WSX-1及び80 µlの血清フリーDMEM培地（550mlのDMEM中、55mgのビルビン酸ナトリウム、146mgのL-グルタミン、5mgのトランスフェリン、2.5mgのインスリン、1 µgのセレンウム及び5mgのフェチュイン）中、4 µlのリポフェクタミン^T M を混合し、室温で30分間インキュベートし、そして次に、320 µlの血清フリーDMEM培地を添加する。12ウェル組織培養プレート（フィブロネクチン被覆された）上にプレートさ

れた 2×10^5 個のCOS細胞上に前記混合物400 μ lを添加し、そして37°Cで5時間インキュベートする。500 μ lの20%FBS DMEM培地（500mlのDMEM中、100mlのFBS、55mgのピルビン酸ナトリウム及び146mgのL-グルタミン）を添加し、そして一晩インキュベートする。

【0659】

B. 結合アッセイ：

結合アッセイを次の通りに行った：培地を、PBS+0.1%BSAによりすすぎ、細胞を除去し、そして次に、細胞を同じ溶液により60分間ブロックした。次に、細胞を、1.0 μ g/mlのzcytor17ligCEE精製されたタンパク質と共に、PBS+0.1%BSAにおいて1時間インキュベートする。次に、細胞を、PBS+0.1%BSAにより洗浄し、そして1：1000に希釈されたマウス抗-Glu Glu抗体と共に、さらに1時間インキュベートした。再び、細胞を、PBS+0.1%BSAにより洗浄し、次に1：200に希釈されたヤギ抗-マウス-HRP接合された抗体と共に1時間インキュベートした。

10

【0660】

陽性結合を、希釈緩衝液（NENキット）により1：50に希釈されたフルオレセインチラミド試薬により検出し、そして4～6分間インキュベートし、そしてPBS+0.1%BSAにより洗浄した。細胞をPBS中、1.8%ホルムアルデヒドにより15分間、固定し、次にPBS+0.1%BSAにより洗浄した。細胞を、PBSにより1：5に希釈されたVectashield Mounting Media（Vedtor Labs Burlingame, CA）により保存した。細胞を、蛍光顕微鏡上でのFITCフィルターを用いて可視化した。

20

【0661】

陽性結合を、zcytor17のみ、zcytor17+OSMR β 、zcytor17+WSX-1及びzcytor17+OSMR β + WSX-1によりトランスフェクトされた細胞について検出した。結合は、WSX-1+OSMR β 、OSMR β のみ又はWSX-1のみによりトランスフェクトされた細胞については検出されなかった。

【0662】

例38. マウスzcytor17ligはルシフェラーゼアッセイにおいてマウスzcytor17/OSMR β 受容体を活性化する

A. 十分な長さのマウスzcytor17及びマウスOSMR β の発現のためのクローニング：

マウス精巣cDNAライブラリーを、マウスzcytoR17の十分な長さのクローンについてスクリーンした。ライブラリーを、65,000cfu/プレートで24LB+Ampプレート上にプレートした。フィルターリフトを、合計約1.6百万のコロニーに対して、Hybond N（Amersham-Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ）を用いて調製した。フィルターを配向について熱針により印を付け、そして次に、0.5MのNaOH及び1.5Mのトリス-HCl、pH7.2において6分間、変性した。次に、フィルターを、1.5MのNaCl及び0.5Mのトリス-HCl、pH7.2において6分間、中和した。DNAを、1200ジュールでのUVクロスリンカー（Stratalinker（商標）、Stratagene, La Jolla, CA）を用いてフィルターに固定した。次に、フィルターを、室温で一晩、持ち上げ、乾燥せしめた。

30

【0663】

次の日、フィルターを、0.25 $\times$ SSC、0.25%SDS及び1mMのEDTAから成る予備洗浄緩衝液により65°Cで予備洗浄した。細胞残骸を、Kimwipes（商標）（Kimberly-Clark）を用いて手動的に除去し、そして溶液を、1時間にわたって3度、交換した。フィルターを空気乾燥し、そして、必要なまで室温で貯蔵した。次に、フィルターを、20mlのExpressHybTM ハイブリダイゼーション溶液（Clontech, Palo Alto, CA）において約3時間、プレハイブリダイズした。

40

【0664】

プローブB（例31）を、オリゴヌクレオチドプライマーZC27,895（配列番号20）及びZC28,917（配列番号83）を用いて、ヒトzcytoR17鋳型からPCRにより生成し、そして市販のキット（Megaprime DNA Labeling System; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ）を用いて、その製造業者の説明書に従って、³²Pにより放射性ラベルした。プローブを、StratageneTM プッシュカラム（NucTrap（商標）カラム；Stratagene, La Jolla, CA）を用いて精製した。プローブを、100°Cで15分間、変性し、そしてExpressHybTM に添加し

50

た。フィルターを、 1.6×10^6 cpm/mlのプロープを含むハイブリダイズ溶液15mlにおいて、63°Cで一晩ハイブリダイズした。

【0665】

フィルターを、 $2 \times \text{SSC}$ 、0.1%SDS及び1mMのEDTAに85°Cで洗浄し、そしてX-線フィルムに-80°Cで4.5日間、照射した。13個の陽性体を、プラグとしてプレートから採取し、そして1.7mlの管における31mlのLB+ampに配置した。管を4°Cで一晩、維持した。それらの13個の陽性体を、さらに2回精製にゆだねた。第三プレートを37°Cで増殖せしめ、この後、フィルターリストを取り、そして単一のコロニーを採取し、そして配列決定に送った。それらのうち3個は、zcytoR17のマウスオルト体の配列を含むことが決定された。

【0666】

さらに、PCR生成物を、鋳型としてCTLL-2 cDNA及びプライマーとして、オリゴヌクレオチドZC38,239（配列番号108）及びZC38,245（配列番号109）を用いて生成した。CTLL-2はマウス細胞毒性Tリンパ球細胞系（ATCC No. TIB-214）である。このPCR反応を次の通りに行った：95°Cで1分（1サイクル）、95°Cで15秒、68°Cで3分、次に68°Cで10分（30サイクル）、4°Cでのソーキング。PCR反応は、約0.5ngのcDNA、20pモルの個々のオリゴヌクレオチド、及び1µlのAdvantage IIポリメラーゼ混合物（ClonTech）を使用した。

【0667】

約6%のPCR生成物を、上記のように、新規PCR反応において鋳型として使用し、但しオリゴヌクレオチドZC38,239（配列番号108）及びZC38,238（配列番号110）を除く。このPCR反応を次の通りに行った：94°Cで45秒、65°Cで45秒、72°C 1分、次に72°Cで7分（30サイクル）；10°Cでのソーキング。PCR反応のほとんどを、1.0%アガロースゲル上に負荷し、そして約360bpでの有力なバンドを切除し、DNAフラグメントを溶離し、そしてDNA配列決定を行った。

【0668】

マウスzcytor17ポリヌクレオチドの配列を、配列番号111で示し、そしてその対応するアミノ酸配列を配列番号112で示す。さらに、切断された可溶性形のマウスzcytor17ポリヌクレオチドを配列番号113で示し、そしてその反応するアミノ酸配列を配列番号129で示す。

【0669】

十分な長さのマウスOSMR β cDNAを得るために、5'及び3' PCR生成物を単離し、そして内部BamHI部位を用いて連結した。PCRプライマーを、ヌクレオチド配列（配列番号119）を用いて企画し、そしてクローニングのためのEcoRI及びXbaI制限部位を含む。ゲノムマウスOSMR β 核酸配列は、配列番号119で示され、ここでコード配列は、配列番号120で示される、970個のアミノ酸ポリペプチドのマウスOSMR β をコードする残基780~3692を包含する。配列番号120のポリペプチドをコードする変性核酸配列は、配列番号121で示される。

【0670】

5' PCR生成物を、鋳型として自家3T3-L1（分化されたマウス脂肪細胞）cDNAライブラリー及びプライマーとしてオリゴヌクレオチドZC41,764（配列番号115）及びZC41,598（配列番号116）を用いて生成した。この5' PCR反応を次の通りに行った：95°Cで45秒、55°Cで45秒、72°Cで1.5分、次に72°Cで7分（30サイクル）；4°Cでのソーキング。PCR反応は、約3µgのcDNAライブラリーから調製されたプラスミド、20pモルの個々のオリゴヌクレオチド、及び5単位のPwo DNAポリメラーゼ（Roche）を使用した。約90%の5' PCR生成物を、EcoRI及びBamHIにより消化し、そして1.0%アガロースゲル上でゲル精製した。約1446bpのバンドを切除し、そして連結のために使用した（下記を参照のこと）。

【0671】

3' PCR生成物を、鋳型としてマウス胎盤自家cDNAライブラリー及びプライマーとしてオリゴヌクレオチドZC41,948（配列番号117）及びZC41,766（配列番号118）を用いて生成した。この3' PCR反応を次の通りに行った：95°Cで45秒、55°Cで45秒、72°Cで1.5分、次に72°Cで7分（30サイクル）；4°Cでのソーキング。PCR反応は、約3µgのcDNAライブラリーから調製されたプラスミド、20pモルの個々のオリゴヌクレオチド、及び5単位のPwo DNA

10

20

30

40

50

ポリメラーゼ (Roche) を使用した。約90%の3' PCR生成物を、BamHI及びXbaIにより消化し、そして1.0%アガロースゲル上でゲル精製した。約2200bpのバンドを切除し、そしてEcoRI及びXbaIにより消化された発現ベクターpZP-5Zに、5' PCR生成物(上記に記載される)と共に、連結するために使用した。三部分連結を、上記5' EcoRI~BamHIフラグメント、3' BamHI~XbaIフラグメント、及びEcoRI及びXbaIにより消化された発現ベクターpZP-5Zにより行った。

【0672】

これは、pZP-5Z/OSMR β を称する、マウスOSMR β のための十分な長さのcDNA(配列番号19のヌクレオチド780~3692)を含むpZP-5Zプラスミドを生成した。pZP-5Z/OSMR β における十分な長さのマウスOSMR β cDNAは、配列番号120からの2つのアミノ酸挿入体を有する。位置370でのアミノ酸グリシンの重複及び位置526でのアミノ酸グルタミン酸の重複が存在する。プラスミドpZP-5Zは、CMVプロモーター、コード配列の挿入のための複数の制限部位、及びヒト成長ホルモントーミネーターを有する発現カセットを含む哺乳類発現ベクターである。プラスミドはまた、複製のE. コリ起点、SV40プロモーター、エンハンサー及び複製の起点を有する哺乳類選択マーカー発現ユニット、ゼオシン耐性遺伝子及びSV40ターミネーターを有する。

得られる形質転換体を配列決定し、マウスOSMR β cDNA配列を確めた。

【0673】

B. BaF3/KZ134/zcytor17m, BaF3/KZ134/zcytor17m/OSMR β m, BHK/KZ134/zcytor17m. 及びBHK/KZ134/zcytor17m/OSMR β m細胞系の構成：

安定したBaF3/KZ134及びBHK/KZ134細胞系(例20)を、十分な長さのマウスzcytor17, pZP-7P/zcytor17m(例38A)をコードする発現プラスミドによりトランスフェクトし、それぞれBaF3/KZ134/zcytor17m及びBHK/KZ134/zcytor17mを創造した。次に、マウスOSMR β 発現プラスミド、すなわちpZP-5Z/OSMR β (例38A)を、それらの細胞中にトランスフェクトし、それぞれBaF3/KZ134/zcytor17m/OSMR β m及びBHK/KZ134/zcytor17m/OSMR β mを創造した。方法は例4に記載の通りであり、但しBaF3/KZ134/zcytor17m及びBHK/KZ134/zcytor17mを、ゲネチシンの他に、2 μ g/mlのプロマイシンにより選択し、そしてBaF3/KZ134/zcytor17m/OSMR β m及びBHK/KZ134/zcytor17m/OSMR β mを、ゲネチシンの他に、2 μ g/mlのプロマイシン及び200 μ g/mlのゼオシンにより選択した。

【0674】

クローンを、標準技法を用いて希釈し、プレートし、そして選択した。クローンを、マウスzcytor17ligならし培地又は精製されたマウスzcytor17ligタンパク質(例35)を、インジューサーとして用いて、ルシフェラーゼアッセイ(上記例20を参照のこと)によりスクリーンした。最高のルシフェラーゼ応答(STATルシフェラーゼを通して)及び最低のバックグラウンドを有するクローンを選択した。安定したトランスフェクト細胞系を選択した。

【0675】

C. マウスZcytor17ligはBaF3/KZ134/zcytor17m/OSMR β m及びBHK/KZ134/zcytor17m/OSMR β mルシフェラーゼアッセイにおいてマウスzcytor17受容体を活性化する：

細胞系を、例20に記載のようにして、ルシフェラーゼアッセイのためにプレートした。BaF3/KZ134/zcytor17m, BaF3/KZ134/zcytor17m/OSMR β m, BHK/KZ134/zcytor17m, 及びBHK/KZ134/zcytor17m/OSMR β m細胞のSTAT活性を、次のものを用いてアッセイした：(1)ヒトzcytor17ligによりトランスフェクトされたBHK570細胞からのならし培地(例7)、(2)マウスzcytor17ligによりトランスフェクトされたBHK570細胞からのならし培地(例18)、(3)精製されたマウス及びヒトzcytor17lig(例35)、及び(4)培地のみの対照応答を測定するためのmIL-3フリー培地。ルシフェラーゼアッセイを、例20に記載のように行なった。

【0676】

このアッセイの結果は、BaF3/KZ134/zcytor17m細胞、BHK/KZ134/zcytor17m細胞又はトランスフェクトされていないBaF3/KZ134又はBHK/KZ134対照細胞に比較して、マウスzcyto

10

20

30

40

50

r17ligに対する、BaF3/KZ134/zcytor17m/OSMR β m及びBHK/KZ134/zcytor17m/OSMR β m細胞のSTATレポーター応答を確め、そして前記応答がマウスzcytor17/OSMR β 受容体を通して介在することを示す。この結果はまた、ヒトzcytor17ligが、マウス受容体複合体を通してSTATレポーターアッセイを活性化しないことを示す。

【0677】

例39. 流動細胞計測法によるzcytor17及びzcytor17/OSMR β に結合するヒトzcytor17リガンド

ヒトzcytor17Lのビオチニル化を次の通りに行なった：5.26mg/mlでのzcytor17 (100 μ l) を、蒸留水に溶解された10mg/mlのEZ-リンクSulfo-NHS-LC-ビオチン (Pierce, Rockford, IL) 30 μ lと共に組合した。この溶液を、室温で30分間、ロッカー上でインキュベートした。ビオチニル化の後、溶液を、Slide-A-Lyzer透析カセットを用いて、PBSにおいて透析した。

10

【0678】

異なった受容体組合せへのヒトzcytor17リガンドの結合性質を試験するために、BHK及びBAF3の両細胞を、当業界において良く知られている標準技法を用いて、発現プラスミドによりトランスフェクトした。それらのプラスミド次の組合せで両細胞系中にトランスフェクトした：zcytor17のみ、OSMR β のみ、及びzcytor17及びOSMR β 両者。トランスフェクションは、上記に詳細されるようにして行われた。トランスフェクトされていないBHK及びBAF3細胞を対照として使用した。細胞を次の通りにしてFACSにより染色した：2E5細胞を次のいずれかにより染色し：2.0 μ g/ml、100ng/ml、10ng/ml、1.0ng/ml、100pg/ml、10pg/ml、1.0pg/mlのビオチニル化されたzcytor17L、又はFACS緩衝液 (PBS+2%BSA+2%NHS (Gemini) +2%NGS) において氷上で30分間、染色しないで放置した。細胞を洗浄し、そして次に、細胞をFACS緩衝液により1.5回、洗浄し、そしてFACS緩衝液に再懸濁し、そしてCellQuestソフトウェア (Becton Dickinson, Mountain View, CA) を用いて、BD FACSCaliber上でFACSにより分析した。

20

【0679】

BHK及びBAF3細胞の両者は、zcytor17リガンドがzcytor17のみ、及びOSMR β との組合しでの両者に結合し、そしてzcytor17/OSMR β ヘテロダイマーがわずかに強いことを示した。結合は、OSMR β のみを発現するいずれの細胞系においても見出されなかった。zcytor17リガンドは、濃度依存性態様で結合した。BHK結合に関する平均蛍光強度 (MFI) が、下記表16に示される。

30

【0680】

【表 16】

表16 :

zcytor17 μg/ml	2.0	0.100	0.010	0.001	0.0001	0.00001	0.000001	0.0
BHK C17+OSMR β	3780	2126	328	53	17	15	14	13
BHK-C17	3032	1600	244	39	16	15	14	15
BHK-OSMR β	13	X	X	X	X	X	X	0
BHK-WT	15	14	13	X	X	X	X	13

10

zcytor17 μg/ml	10.0	3.33	1.11	0.37	0.12	0.04	0.00
BAF3-C17+OSMR β	531	508	489	441	364	247	7
BAF3-OSMR β	6	5	5	5	5	5	11
BAF3-WT	13	13	12	12	12	12	13

zcytor17ng/ml	100.0	10.0	1.0	0.0
BAF3-C17	347	72	17	7

20

【0681】

例40. ヒトZcytor17lig処理された細胞の遺伝子発現アレイ分析

RNAを、ヒトzcytor17lig処理されたA549細胞、zcytor17lig処理されたSK-LU-1細胞、及び処理されていない対照細胞から、Rneasy Midiキット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて、その製造業者の説明書に従って単離した。

【0682】

zcytor17ligにより処理された細胞及びそれぞれの対照細胞の遺伝子発現プロファイルを、GEArray Q Series cDNA発現アレイ (SuperArray Inc., Bethesda, MD) を用いて行った。Q Series cDNA発現アレイは、特定の生物学的経路に関連する96までのcDNAフラグメント、又は類似する機能又は構造特性を有する遺伝子を含む。処理された及び対照の細胞のアレイの比較は、特定遺伝子のアップ及びダウンレギュレーションの決定を可能にする。プローブラベリング、ハイブリダイゼーション及び検出を、製造業者の説明書に従って行った。化学ルミネセンスシグナル検出及びデータ獲得は、Lumi-Imagerワークステーション (Roche, Indianapolis, IN) 上で行われた。得られるイメージデータを、ImageQuant 5.2 (Amersham Biosciences, Inc., Piscataway, NJ) 及びGEArray Analyzer 1.2 (SuperArray Inc., Bethesda, MD) ソフトウェアを用いて分析した。

30

【0683】

ヒトインターロイキン及び受容体QシリーズHS-014Nアレイからの結果の分析は、標準化の後、zcytor17lig処理されたヒトSK-LU-1細胞におけるIL13RA2の約4.7倍の上昇、及びzcytor17lig処理されたヒトA549細胞におけるIL13RA2の約2.2倍の上昇を示した。

それらの結果は、zcytor17ligがSK-LU-1及びA549細胞においてIL13RA2を、有意にアップレギュレートすることを示す。それらの両者は、ヒト肺癌に由来する細胞系を確立される (Blobelなど., Virchows Arch B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol., 1984; 45(4): 407-29)。より特定には、A549は、ヒト肺上皮細胞系として特徴づけられる (Linなど., J. Pharm. Pharmacol., 2002 Sep; 54(9): 1271-8; Martinezなど., Toxicol. Sci., 2002 Oct; 69(2): 409-23)。

40

【0684】

50

インターロイキン-13 (IL-13)、すなわち活性化されたTリンパ球により分析されるサイトカインは、アレルギー性喘息の抑制、及び気道過応答性、好酸球レクルートメント及び粘液過剰生成を包含する喘息の実験モデルへの使用のために必要且つ十分であることを示されている (Wills-Karpなど., Science, 1998; 282: 2258-2261)。IL-13の選択的中和は喘息表現型を改善することが示されている (Grunigなど., Science, 1998; 282:2261-2263)。IL-13は、ヒト鼻ポリプ上皮及び培養された鼻上皮におけるムチン遺伝子MUC8発現のアップレギュレーションに関与することもまた報告されている (Kimmなど., Acta Otolaryngol., 2002; Sep; 122(6): 638-643; Seongなど; Acta Otolaryngol., 2002; Jun; 122(4): 401-407)。MUC8、すなわち主要気道ムチン糖タンパク質は、ポリプを有する慢性静脈洞炎の粘液過分泌の病因において役割を演じるものとして包含される (Seungなど., Acta Otolaryngol., 2002; Jun; 122(4): 401-407)。

10

【0685】

機能的に、IL-13は、インターロイキン-13受容体 α -1鎖 (IL13RA1) 及びIL-4受容体 α (IL4RA) から成る受容体複合体を通してシグナル化する (Daines and Hershey, J. Biol. Chem., 2002; 277(12): 10387-10393)。インターロイキン-13受容体 α -12 (IL13RA2) は高い親和性を伴って、但し単独でIL13を結合することもまた示されている (Daines and Hershey, J. Biol. Chem., 2002; 277(12): 10387-10393)。しかしながら、この受容体はシグナル化のために必要な細胞質ドメインを欠いており、そして従って、おとりの受容体であると思われる。IL13RA2は、インターフェロン (IFN) γ による細胞処理に従って発現される細胞内貯蔵所及び表面からすばやく移動され得る細胞内分子であることが示されている。IFN- γ 処理後のIL13RA2の表面発現は、タンパク質合成に関与せず、そして低められたIL-13シグナル化をもたらす (Daines and Hershey, J. Biol. Chem., 2002; 277(12): 10387-10393)。

20

【0686】

zcytor17ligについての遺伝子発現アレイ分析の結果は、肺上皮由来の細胞系のzcytor17lig処理がIL13RA2遺伝子発現の有意な上昇をもたらしたことに於いて、IFN- γ の作用に対して新規であるzcytor17ligの作用を示す。従って、zcytor17lig処理が、IL13RA2発現の長期アップレギュレーション及びIL13のダウンレギュレーションが所望される疾病、例えば喘息、気道機能亢進 (AHR) 及びムチン調節、例えばポリプを伴う慢性静脈洞炎において有益であることが想定され得る。

30

【0687】

例41. ネズミzcytor17ligトランスジェニックマウス

zcytor17lig過剰発現を評価するために、次の2種の異なったプロモーターにより駆動される遺伝子のネズミ形を発現するトランスジェニックマウスの複数候補体を生成した：リンパ球-特異的プロモーターE μ /lak及び遍在するプロモーターEF1 α (例22)。血清タンパク質レベルは、約20~300ng/mlの範囲である。E μ /lckプロモータは、EF1 α -zcytor17ligトランスジェニックマウスにおけるレベルよりも高いレベルの血清のタンパク質を有するマウスを生成した。

【0688】

zcytor17ligトランスジェニックマウスは、生後4~8週で皮膚表現型を進行せしめた。トランスジェニックマウスの柔毛は、明らかな起毛、及びそれらのマウスの背部、胴部の両側、及びそれらの眼のまわりでの軽い程度~重度の程度の脱毛を伴って、しわくちゃ (ruffled) に成った。この表現型は、それらの血清に検出できるレベルのzcytor17ligタンパク質を有するマウスに一定して見出された。候補体の中で、E μ /lck駆動の遺伝子を発現するマウス間での100%の発生率、及びEF1 α -zcytor17ligトランスジェニックマウスにおける50%の発生率が注目され、これは、それらの血清において検出される相対レベルのzcytor17ligと十分に相互関係する。

40

【0689】

トランスジェニック皮膚は、通常、感染されるようになる (少なくとも、スタフィロコカス・アウレウスによる)、皮膚の表皮剥離及び損傷を時々、誘発するのに十分な、マ

50

ウスのひっかき行動により明らかなように、そう痒性であるように思えた。マウスは本来、金属の耳標識により同定されるが、しかしほとんどの場合、その耳標識は、マウス自体により強制的に除去された。これはしばしば、外耳への重度の損失をもたらした。それらの傷つけられた耳はしばしば、多くの動物において、それらの耳の後部及び耳の間で進行する、長期継続するプステル及びかさぶた、及び漏出性の拡張創傷の存在下で考えられるように、適切に治療しなかった。トランスジェニックマウスの何匹かはまた、それらの肩及び首上に疥癬性創傷を進行せしめた。皮膚損傷は、動物亜集団において観察され、脱毛がすでに明らかであり、そしてマウスの引っ掻き行動によりしばしば悪化される、皮膚の領域上に一般的に発生する。

【0690】

10

同時定量的RT-PCRを、トランスジェニック（但し、非トランスジェニックではない）皮膚サンプルにおけるzcytor17lig RNA転写体を検出するために使用し、そしてE μ /lckトランスジェニック皮膚は、EF1 α -zcytor17ligトランスジェニックマウスからの皮膚よりも一層、zcytor17lig RNAを発現する。zcytor17受容体サブユニット、すなわちzcytor17及びOSM-R β をコードする遺伝子は、非トランスジェニック及びzcytor17litトランスジェニックマウスの両者の皮膚において発現された。

【0691】

流動細胞計測法によるE μ /lckトランスジェニック候補体の亜集団からのリンパ組織の試験は、それらのマウスの脾臓及びリンパ節における活性化されたT細胞の割合の有意な上昇を示した。分析された4匹のマウスのうち2匹は、たぶん、それらの首上での損傷の存在のために、重度に拡大された頸部リンパ節を有した。トランスジェニックマウスにおける脾臓重量のわずかな上昇、及びその血液において循環する単球及び好中球におけるわずかな上昇が、観察された。試験される種々のサイトカインの上昇も、又はそれらのマウスにおける循環性血清アミロイドAレベルの変化も存在しなかった。トランスジェニックマウスにおける免疫細胞に対する効果は、zcytor17ligの直接的又は関節的結果であるか、又は皮膚損傷の二次効果である。

20

【0692】

組織病理学が、皮膚以外の多くの組織、例えば肝臓、胸腺、脾臓、腎臓及び精巣に対して行われ、そしてそれらの器官に有意な異常性は示されなかった。しかしながら、トランスジェニックの皮膚の分析は、皮膚の源及び位置に依存して高く変化する多くの変更（例えば、正常、無毛又は損傷）を示した。多くの場合、トランスジェニックマウスの耳は、非トランスジェニック対照に比較して、肥厚化された表皮（例えば、約4層対2層）を有し、そしてその下部組織は、時々的好中球を伴って、主に単核である、少数～中位の数の炎症性細胞を含んだ。腹部上の表皮は、トランスジェニック動物において多病巣性のわずかな肥厚部分が出現したが、しかし、下部の皮膚又は皮下部分に炎症性細胞の明らかな上昇は存在しなかった。

30

【0693】

マウスからの皮膚の無毛部分においては、いくらかの残骸を含むが、しかし毛幹を有さない（根から倒れた毛）、膨張した毛包が存在した。損傷された領域においては、表皮の重度の肥厚化（表皮肥厚）、皮膚の表面上での高められたケラチン（角質増殖）、皮膚における種々のサイズ及び有意な数の炎症性細胞の分散した潰瘍（主に好中球、及び種々の数のマクロファージ及びリンパ球）が存在した。皮膚はまた、損傷を縁取る多くの肥満細胞を含んだ。トランスジェニック皮膚の損傷領域における毛幹のいくつかは、活性段階（発育相）にあり、対照的に、“正常な”領域における毛幹の多くは、退縮（退行期）～不活性（休止期）段階にあった。

40

【0694】

zcytor17ligトランスジェニックマウスの表現型は、アトピー性皮膚炎（AD）患者、及びADのマウスモデルのその表現型に強く類似する。ADは、ヘルパーT細胞サブセット2（Th2）の過剰活性化されたサイトカインにより特徴づけられる通常の慢性炎症疾患である。zcytor17ligは、Th2対Th1細胞により選択的に発現され、これは、この比較にさらなる信

50

用を付与する。ADの正確な病因は未知であるが、複数の因子、例えば過活性Th2免疫応答、自己免疫性、アレルゲン及び遺伝子素因が、包含されて来た。疾病の腫瘍特徴は、乾皮症（皮膚の乾燥）、そう痒（皮膚のかゆみ）、結膜炎、炎症性皮膚損傷、スタフィロコカス・アウレウス感染、好酸球増加、血清IgE及びIgG1の上昇、及びT細胞、肥満細胞、マクロファージ及び好酸球浸潤による慢性皮膚炎を包含する。S. アウレウスによるコロニー形成又は感染は、ADを悪化し、そしてこの皮膚疾患の慢性度を維持することが認識されている。

【0695】

ADはしばしば、喘息及びアレルギー鼻炎を有する患者に見出され、そして時折り、アレルギー性疾患の初期出現である。西欧諸国における人工の約20%が、それらのアレルギー性疾患に悩んでおり、そして発展途上国におけるADの発生率は未知の理由のために上昇している。ADは典型的には、子供において始まり、そして青年を通して成人に存続する。ADに関する現在の処理は、局部コルチコステロイド、経口シクロスポリンA、非コルチコステロイド免疫抑制剤、例えばタクロリマス（tacrolimas）（軟膏形でのFK506）、及びインターフェロン- γ を包含する。ADについての種々の処理にかかわらず、多くの患者の症状は改善されず、又はそれらは医薬への逆の反応を有し、他のより効果的な治療剤についての研究を必要とする。

【0696】

zcytor17ligのためのヘテロダイマー受容体（zcytor17及びOSM-R β ）を発現する上皮細胞は、身体中へのアレルゲン侵入の部位（例えば、皮膚、腸、肺、等）で位置し、そして樹状突起細胞（選択的抗原提供細胞）と密着して相互作用する。樹状突起細胞は、アレルギー性疾患の病因において重要な役割を演じ、そしてzcytor17ligが皮膚及び肺における上皮細胞上のその受容体と相互作用し、そしてそれらの器官における免疫応答に影響を与えることが可能である。従って、zcytor17lig及びその受容体は、アレルギー性疾患、例えばAD及び喘息の病因に寄与することができる。さらに、zcytor17ligトランスジェニックマウスの表現型は、このリガンドが、マウスはそれらの耳への損傷を修復することができず、そしてしばしば、それらの背部及び側部上で長期続く損傷を担持するので、創傷治療において役割を演じることができることを示唆する。従ってzcytor17ligのアンタゴニストは、それらの及び他の徴候のための生存性治療剤を提供することができる。

【0697】

例42. アデノウィルスSTAT/SRE受容体遺伝子による一時的感染を通してのヒト形質転換された上皮細胞系のルシフェラーゼアッセイ

広範囲の種類のヒト形質転換された上皮細胞系（下記表16を参照のこと）を、個々の細胞型について特定されるように、通常の増殖培地に10,000細胞/ウェルで96ウェル平底プレートに接種した。次の日、細胞を、アデノウィルスレポーター構造体KZ136により、5000の感染の多重度で感染せしめた。KZ136レポーターは、血清応答要素の他に、STAT要素を含む。合計体積は、2mMのL-グルタミン（GibcoBRL）、1mMのピルビン酸ナトリウム（GibcoBRL）及び1×インスリン-セレンウムサプリメント（GibcoBRL）により補充されたDNE M（この後、血清フリー培地として言及する）を用いて、ウェル当たり100 μ lであった。細胞は一晩、培養された。

【0698】

次の日、培地を除去し、そして100 μ lの誘発培地により交換した。誘発培地は、100ng/ml, 50ng/ml, 25ng/ml, 12.5ng/ml, 6.25ng/ml, 3.125ng/ml及び1.56ng/mlで、血清フリー培地により希釈されたヒトzcytor17リガンドであった。20%FBSの陽性対照を用いて、アッセイを確認し、そしてアデノウィルスによる感染が成功したことを確かにした。細胞を、5時間、誘発し、この時点で、培地を吸引した。次に、細胞を、50 μ l/ウェルのPBSにより洗浄し、そして続いて、30 μ l/ウェルの1×細胞溶解緩衝液（Promega）に溶解した。室温で96-ウェルプレートに移した。次に、プレートを、40 μ l/ウェルのルシフェラーゼ基質（Promega）の注入を伴って、5秒の調整を用いて、Luminometer上で読み取った。

その結果は、下記表17に示されるように、zcytor17リガンドに対する複数の上皮細胞系の応答能力を示した。

【0699】

【表17】

表17:

細胞	種	組織	形態学	疾病	誘発倍率
A549	ヒト	肺	上皮	癌	2×
Sk-lu-1	ヒト	肺	上皮	腺癌	6×
WI-38	ヒト	胚性肺	線維芽細胞		陰性
MRC-5	ヒト	肺	線維芽細胞		陰性
Du145	ヒト	前立腺	上皮	癌	10×
PA-HPV-7	ヒト	前立腺	上皮	HPVにより形質転換された	5×
PC-3	ヒト	前立腺	上皮	腺癌	陰性
U20S	ヒト	骨	上皮	骨肉腫	15.5×
SaOS2	ヒト	骨	上皮	骨肉腫	22×
MG-63	ヒト	骨	線維芽細胞	骨肉種	陰性
143B	ヒト	骨	線維芽細胞	骨肉種	3.5×
HOS	ヒト	骨	線維芽細胞及び上皮		8×
TRBMeC	ヒト	血管骨髓	上皮		2×
HT144	ヒト	皮膚	線維芽細胞	メラノーマ	5×
C32	ヒト	皮膚		メラノーマ	陰性
Sk-Mel-2	ヒト	皮膚	ポリゴナル	メラノーマ	2.7×
WM-115	ヒト	皮膚	上皮	メラノーマ	2×
HCT-116	ヒト	結腸	上皮	癌	陰性
HT-29	ヒト	結腸	上位	癌	陰性
CaCo2	ヒト	結腸	上皮	腺癌	3×
HBL-100	ヒト	乳房	上皮		1.5×
ME-180	ヒト	頸部	上皮	癌	陰性
HeLa 299	ヒト	頸部	上皮	腺癌	陰性
SK-N-SH	ヒト	脳	上皮	神経芽腫	陰性
U138MG	ヒト	脳	ポリゴナル	グリア芽腫	陰性
HepG2	ヒト	肝臓	上皮	癌	陰性
Chang肝臓	ヒト	肝臓	上皮		陰性
Sk-Hep-1	ヒト	肝臓	上皮	腺癌	4×
Int407	ヒト	腸	上皮		陰性
3a-SubE	ヒト	胎盤			陰性

【0700】

例43. ヒトzcytor17リガンドと共に培養されたヒト上皮細胞系によるサイトカイン生成
ヒト疾病状態の上皮細胞系（A549、ヒト肺上皮癌；SkLu1、ヒト肺上皮腺癌；DU145、ヒト前立腺上皮癌；PZ-HPV-7、形質転換されたヒト前立腺上皮HPV；U20S、ヒト骨上皮骨肉腫）を、インビトロでのzcytor17リガンドに対する応答において、サイトカイン生成についてスクリーンした。それらの細胞系は、RT-PCRにより同定されるzcytor17及びOSMR- β の両者を有し、そしてアデノウィルスシフエラーゼレポーター構造体KZ136（例42）によりアッセイされる場合、ヒトzcytor17リガンドに対して応答する。それらの細胞系によるサイトカイン生成は、一連の3回の実験におけるヒトzcytor17リガンドに反応して決定された。

【0701】

10

20

30

40

50

A. ヒトzcytor17ligと共に培養されたヒト疾病状態上皮細胞系によるサイトカイン生成
:

細胞を、6 ウェルプレート (Costar) に、 4.5×10^5 細胞/ウェルの密度でプレートし、そしてそれぞれの成長培地において培養した。細胞を、次の試験試薬と共に培養した：100 ng/ml の zcytor17 リガンド、10 ng/ml の インターフェロン γ (IFN γ) (R&D Systems, Minneapolis, MN)、10 ng/ml の 腫瘍壊死因子 α (TNF α) (R&D Systems, Minneapolis, MN)、10 ng/ml の IL-1 β (R&D Systems, Minneapolis, MN)、又は 100 μ g/ml の リポポリ多糖 (LPS) (Sigma)。

【0702】

上清液を、24 及び 48 時間で収穫し、そして次のサイトカインについてアッセイした：GM-CSF (顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子)、IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1 (マクロファージ化学誘引タンパク質-1) 及び TNF α 。BioSource International (Camarillo, CA) 過らの複合抗体ビーズキットを用いて、サンプル中のサイトカインを測定した。アッセイを、Luminex-100 装置 (Luminex, Austin, TX) 上で読み取り、そしてデータを、Master Plex ソフトウェア (Miraibio, Alameda CA) を用いて分析した。24 時間サンプルにおける個々の細胞系についてのサイトカイン生成 (pg/ml) が、下記表 18 及び表 19 に示される。

10

【0703】

【表 1 8】

表18：

GM-CSF pg/mL：

	A549	SkLu1	Du145	U20S	PZ-HPV-7
zcytor17L	18.80	10.26	16.19	13.26	14.10
IFN-g	16.19	13.36	11.56	16.26	11.81
IL-1b	104.60	126.44	76.77	338.25	27.32
TNFa	106.67	33.20	58.50	107.09	33.79
LPS	17.64	10.62	11.81	25.47	18.34
对照	14.81	8.56	13.26	21.67	13.96

10

IL-1b pg/mL：

	A549	SkLu1	Du145	U20S	PZ-HPV-7
zcytor17L	26.90	30.17	28.77	29.07	28.00
IFN-g	29.07	35.33	21.96	26.90	26.73
IL-1b	1332.88	1256.17	979.02	1107.35	998.60
TNFa	31.11	33.28	35.33	31.24	25.66
LPS	33.28	28.77	29.07	31.11	31.24
对照	28.77	28.77	26.73	31.24	29.07

20

IL-6 pg/mL：

	A549	SkLu1	Du145	U20S	PZ-HPV-7
zcytor17L	20.09	26.89	193.05	19.37	17.30
IFN-g	17.52	33.64	217.58	27.02	17.63
IL-1b	175.44	5920.19	2375.29	304.08	18.44
TNFa	354.16	1002.51	1612.17	103.58	18.33
LPS	18.06	35.65	162.18	22.42	17.30
对照	17.63	27.80	71.23	19.32	17.19

30

【0 7 0 4】

【表 19】

表19:

IL-8 pg/mL:

	A549	SkLu1	Du145	U20S	PZ-HPV-7
zcytor17L	86.33	150.81	150.61	45.92	6.81
IFN-g	24.07	72.82	163.31	81.78	1.35
IL-1b	1726.24	4083.12	4407.79	5308.83	124.17
TNFa	3068.68	3811.75	2539.39	3324.02	69.65
LPS	20.28	167.13	230.39	115.08	7.95
対照	14.92	109.78	107.27	93.44	9.49

10

MCP-1 pg/mL:

	A549	SkLu1	Du145	U20S	PZ-HPV-7
zcytor17L	8.97	187.29	26.84	105.15	7.20
IFN-g	7.30	267.99	17.05	88.68	7.71
IL-1b	8.11	8039.84	88.78	3723.81	4.70
TNFa	8.50	7100.37	153.26	3826.80	2.80
LPS	9.40	185.83	22.65	61.62	5.61
対照	8.16	167.93	13.68	47.78	5.61

20

TNFa pg/mL:

	A549	SkLu1	Du145	U20S	PZ-HPV-7
zcytor17L	16.23	17.52	16.67	15.80	17.09
IFN-g	15.80	17.09	15.80	16.65	15.80
IL-1b	16.66	17.09	15.80	17.95	16.23
TNFa	1639.92	1648.83	2975.07	1348.33	3554.82
LPS	16.87	15.80	15.37	17.09	17.52
対照	16.23	15.80	15.80	17.09	16.66

30

【0705】

試験されたすべての細胞系は、対照サイトカインIL-1b及びTNMFaによる刺激に応答してGM-CSF及びIL-8を生成した。ほとんどの細胞系は、IL-1b及びTNFa刺激に応答してIL-6及びMCP-1inを生成した。zcytor17リガンドは、対照に比較して、DU145細胞系においてIL-6生成を刺激した(193pg/ml対71pg/ml)。zcytor17リガンドは、A549細胞に見られる最大効果(5倍)を伴って、IL-8を生成するために、5種の細胞系のうち3種を刺激し、そしてUS20S細胞においてIL-8生成を2倍、低めた。zcytorリガンドと共に培養される場合、DU145及びU20S細胞によるMCP-1生成に対してわずかな効果が存在した。

40

【0706】

B. ヒトzcytor17ligと共に培養された正常ヒト上皮細胞系によるサイトカイン生成:

ヒト上皮細胞系の他に、正常ヒト気管支上皮細胞(NHBE, Clonetics)をまた試験した。細胞を、24ウェルプレートに、 1×10^5 細胞/ウェルの密度でプレートし、そして次の試験試薬と共に培養した: 1000ng/ml, 100ng/ml及び10ng/mlのzcytor17リガンド(A760F)

50

、10ng/mlのTNFa、10ng/mlのOSM、10ng/mlのIFNa、10ng/mlのTGFb又は10ng/mlのLymphotoctin。上清液を、24及び48時間で収穫し、そして次のサイトカインについてアッセイした：IL-6、IL-8、MCP-1、MIP-1a、RANTES及びEotaxin。サイトカインを、前に記載のようにしてアッセイした。48時間サンプルにおける個々の細胞系についてのサイトカイン生成（pg/ml）が、下記表20に示される。

【0707】

【表20】

表20：

10

IL-6pg/ml：

	A549	DU145	SkLu1	U2OS	NHBE
r17L 1000ng/ml	24.5	56.3	32.1	25.2	64.5
r17IL 100ng/ml	25.0	65.0	31.0	25.4	50.2
r17L 10ng/ml	24.8	51.8	30.2	25.3	54.3
TNFa	272.9	355.4	437.5	36.1	299.3
OSM	26.4	73.5	112.4	25.6	80.4
IFNa	24.6	109.3	33.7	26.4	52.4
TGFb	24.4	102.6	42.7	27.8	268.9
対照	24.5	36.3	29.9	25.2	47.9

20

IL-8pg/ml：

	A549	DU145	SkLu1	U2OS	NHBE
r17L 1000ng/ml	35.0	243.3	45.6	18.6	402.0
r17IL 100ng/ml	31.0	290.7	40.1	21.3	296.0
r17L 10ng/ml	30.4	240.4	33.4	18.9	361.8
TNFa	2809.3	2520.9	1385.2	784.9	1486.3
OSM	37.8	60.6	68.0	22.5	494.6
IFNa	18.9	315.3	39.5	33.1	231.6
TGFb	9.9	77.5	19.6	88.9	246.9
対照	10.9	238.0	38.0	39.7	315.8

30

MCP-1pg/ml：

	A549	DU145	SkLu1	U2OS	NHBE
r17L 1000ng/ml	nd	nd	149.1	81.0	nd
r17IL 100ng/ml	nd	nd	130.6	81.9	nd
r17L 10ng/ml	nd	nd	111.7	49.1	nd
TNFa	nd	22.1	2862.6	1104.7	nd
OSM	nd	17.2	448.2	85.8	nd
IFNa	nd	nd	131.7	10.5	nd
TGFb	nd	1.7	54.5	27.6	nd
対照	nd	nd	113.0	1.7	nd

40

nd＝ 検出されなかった。

【0708】

DU145細胞は、zcytor17リガンドに応答して、IL-6を生成し、結果は、例43Aを反復した。しかしながら、A549及びU2OSのみは、例43Aに見出されるのと類似するIL-8応答を有した。SkLu1及びU2OS細胞の両者は、zcytor17リガンドに応答して、MCP-1を生成した。NHBE

50

細胞によるサイトカイン生成は、対照に比較して、低かった。

【0709】

C. ヒトzcytor17lig及びIFN γ と共に培養されたヒト疾病状態上皮細胞系によるサイトカイン生成：

細胞を、24ウェルプレートに、 2×10^5 細胞/ウェルの密度でプレートし、そして100ng/ml, 10ng/ml又は1ng/mlで、10ng/mlのIFN γ +/- zcytor17リガンドと共に同時培養した。上清液を、24及び48時間で集め、そして上記のようにして、IL-8及びMCP-1について分析した。24時間サンプルにおける個々の細胞系についてのサイトカイン生成 (pg/ml) が下記表21に示されている。

【0710】

【表21】

表21：

			IL-8 pg/ml	MCP-1 pg/ml
A549	10ng/mL IFNg+100ng/mL r17L		86.7	nd
	10ng/mL IFNg+10ng/mL r17L		75.1	nd
	10ng/mL IFNg+1ng/mL r17L		63.6	nd
	10ng/ml IFNg		35.4	nd
	対照		36.6	nd
DU145	10ng/mL IFNg+100ng/mL r17L		102.3	nd
	10ng/mL IFNg+10ng/mL r17L		92.9	nd
	10ng/mL IFNg+1ng/mL r17L		79.9	nd
	10ng/ml IFNg		70.7	nd
	対照		79.4	nd
SkLu1	10ng/mL IFNg+100ng/mL r17L		152.2	604.9
	10ng/mL IFNg+10ng/mL r17L		194.4	870.7
	10ng/mL IFNg+1ng/mL r17L		138.7	585.4
	10ng/ml IFNg		170.8	652.6
	対照		203.0	292.3
U20S	10ng/mL IFNg+100ng/mL r17L		106.8	357.0
	10ng/mL IFNg+10ng/mL r17L		108.2	347.7
	10ng/mL IFNg+1ng/mL r17L		109.9	293.3
	10ng/ml IFNg		118.8	159.8
	対照		146.8	7.0

【0711】

A549細胞は、zcytor17リガンドに応答してIL-8を生成したが、しかしながら、IFN γ の添加を伴って同時培養細胞の効果は存在しなかった。U20S細胞は、IFNgと共に培養される場合、20倍以上、MCP-1を製造し、そしてIFN γ + zcytor17リガンドと共に培養される場合、50倍以上、MCP-1を製造した。

【0712】

例44. DU145前立腺上皮細胞における ^3H -TdR組込みに対するzcytor17lig効果

細胞を、グルタミン、ピルベート、非必須アミノ酸 (Life Technologies) 及び10% ウシ胎児血清 (Hyclone) により補充されたMEM (Life Technologies) 増殖培地を含む96-ウェル組織クラスター (Falcon) に、25,000/ウェルの密度で接種した。集密性 (24時間後) で、0.1% BSA (Life Technologies) を血清により置換することによって、細胞を、増殖組織培地に交換した。細胞同調を達成するために48時間後、増殖阻止培地を、新鮮な培地により交換した。次に、組換えzcyor17lig (試験試薬) を、種々の濃度 (0.24~60ng/ml) で添加し (下記表16を参照のこと)、基礎DNA複製に対するタンパク質の効果につい

て試験した。

【0713】

いくつかのウェルは、高いレベルのTdr組込みに対するタンパク質の効果を試験するために、zcytor17リガンドの他に、2.5%FBS (Hyclone) を受けた。10%FBS及び20ng/mlの血小板由来の成長因子-BB (PDGF-BB) (R&D) を、正の対照として使用した。

zcytor17リガンド及び試験試薬の残りの添加の18時間後、細胞を、250nCi/mlの $[^3\text{H}]$ -チミジン (NEN) により4時間パルスした。4時間のパルスに続いて、培地を捨て、そして100 μl のトリプシン溶液 (Life Technologies) を、個々のウェルに添加し、細胞を除いた。Du145により組込まれる放射能を、細胞をPackard Filtermate 196細胞ハーベスターにより収穫し、そしてPackard TopCount NXT μ プレートシンチレーションカウンターを用いて、組込まれたラベルを計数することによって決定した。

10

【0714】

下記表22に見出されるように、zcytor17ligは、濃度依存性態様で、静止細胞 (0.1%BSAにおける) におけるチミジン組込みを誘発した。この効果は、使用される最高濃度60ng/mlで、BSA対照の2.5倍に達した。さらに、zcytor17ligのこの効果はまた、基線組込みが2.5%FBS (このシリーズにおいては、10%FBSと同じ能力のミトゲン) の添加により高められる場合、検出できる。従って、それらの結果は、基礎及び刺激された条件の両者下で、zcytor17ligがDU145癌細胞のためのミトゲン因子として作用することができる。

表22は、DU145細胞によるチミジン組込みに対するzcytor17ligの効果を示す。結果はcpm/ウェルで示され、そして数値は、三重反復ウェルの平均 $\pm$ 標準偏差である。

20

【0715】

【表22】

表22 :

	0.1%BSA	2.5%FBS
BSA対照	1139 $\pm$ 336	4228 $\pm$ 600
Zcytor17lig (0.24ng/mL)	1430 $\pm$ 136	4894 $\pm$ 1037
Zcytor17lig (0.74ng/mL)	1657 $\pm$ 32	5038 $\pm$ 810
Zcytor17lig (2.22ng/mL)	1646 $\pm$ 57	5162 $\pm$ 808
Zcytor17lig (6.67ng/mL)	2226 $\pm$ 189	6385 $\pm$ 1613
Zcytor17lig (20ng/mL)	2168 $\pm$ 108	5880 $\pm$ 1085
Zcytor17lig (60ng/mL)	2512 $\pm$ 111	6165 $\pm$ 417
PDGF-BB (20ng/mL)	4094 $\pm$ 202	5927 $\pm$ 360

30

【0716】

例45. E. コリにおけるhuzcytor17リガンドの発現

40

A. huzcytor17Lig/MBP-6H融合ポリペプチドを発現する発現ベクターpRPS01の構成 :

マルトース結合タンパク質 (MBP) にC-末端で融合されるhuzcytor17ligをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを、相同組換えにより構成する。融合ポリペプチドは、本明細書に記載されるhuzcytor17ligに融合される約388個のN-末端アミノ酸MBP部分を含む。huzcytor17lig cDNAのフラグメントを、本明細書に記載のようなPCRを用いて単離する。

【0717】

次の2種のプライマーを、標準のPCR反応におけるzcytor17ligフラグメントの生成に使用する : (1) 1つは、約40bpのベクターフランキンク配列及びhuzcytor17ligの約20bpのアミノ末端に対する配列を含み、及び(2) もう1つは、前記フランキンクベクター配

50

列に対応する3'末端約40bp及びhuzcytor17ligのカルボキシル末端に反応する配列約25bpを含む。100 µlのPCR反応物2 µlを、分析するために、1×TBE緩衝液中、1.0%アガロースゲル上で試験し、そして予測される分子量フラグメントが観察された。残るPCR反応物を、第2のPCR管において組合し、そして無水エタノール400 µlにより沈殿せしめる。沈殿されたDNAを、下記のようにして、SmaI切断された受容体ベクターpTAP98中への組換えのために使用し、MBP-huzcytor17lig融合体をコードする構造体を生成する。

【0718】

ベクターpTAP98を、酵母相同組換えを用いて構成する。100ngのEcoRI切断された、pMAL-c2を、1 µgのPvuI切断されたpRS316、1 µgのリンカーと共に組合し、そして1 µgのScaI/EcoRI切断されたpRS316を、PCR反応において組合す。PCR生成物を、100%エタノール沈殿により濃縮する。コンピテント酵母細胞 (S.セレビシアエ) 株、SF838-9Dαを、約1 µgの上記huzcytor17lig PCR生成物及び100ngのSmaI消化されたpTAP98ベクターを含む混合物数10 µLと共に組合し、そして0.75kV、25 µF及び∞オームでエレクトロポレートした。得られる反応混合物を、URA-Dプレート上にプレートし、そして30°Cでインキュベートした。

10

【0719】

約48時間後、単一プレートからUra⁺酵母形質転換体を採取し、DNAを単離し、そしてエレクトロコンピテントE.コリ細胞 (例えば、MC1061, Casadabanなど., J. Mol. Biol. 138, 179-207) を形質転換した。得られるE.コリ細胞を、標準方法を用いて、MM/CA+AMP 100mg/lプレート (Pryor and Leiting, Protein Expression and Purification. 10:309-319, 1997) 上にプレートする。4個の個々のクローンをプレートから収穫し、そして、100 µg/mlのアmpiシリンと共に、MM/CA中に、2時間、37°Cで、接種した。その個々の培養物1mlを、1mMのIPTGにより誘発する。

20

【0720】

約2~4時間後、個々の誘発された培養物250 µlを、酸により洗浄されたガラスビーズ250 µ、及び5% β ME及び色素を含むThomer緩衝液 (8Mの尿酸、100mMトリス、pH7.0, 10%グリセロール、2 mMのEDTA, 5 % SDS) 250 µlと共に混合する。サンプルを1分間、振盪し、そして65°Cに10分間、加熱する。その20 µlの個々のサンプルを、4%~12%PAGEゲル (NOVEX) 上のライン当たりに負荷する。ゲルを、1×MES緩衝液において試験する。陽性クローンを、pRPS01と命名し、そして配列決定分析にゆだねる。

30

【0721】

1 µlの配列決定DNAを用いて、エレクトロコンピテントE.コリ株MC1061を形質転換する。細胞を、2.0kV, 25 µF及び400オームで電気パルスする。エレクトロポレーションに続いて、0.6mlのSOCに救済し、そして100mg/lのアmpiシリンを含むLB+Ampプレート上で37°Cで増殖した。4種の培養物を、IPTGにより誘発し、そして上記のようにして、陽性クローンをスクリーンした。陽性クローンを、Huzcytor 17lig/MBP-6H融合タンパク質のタンパク質の精製のために、標準技法により増殖する。

【0722】

B. E. コリ発酵からのhuzcytor17Lig/MBP-6Hの精製:

特にことわらない限り、すべての操作は4°Cで行われた。次の方法を、組換えhuzcytor17lig/MBP-6Hポリペプチドを精製するために使用した。pRPS01構造体を含み、そしてhuzcytor17Lig /MBP-6Hを発現するE. コリ細胞を、標準の分子生物学的方法を用いて構成し、そして50.0g/lのSuperBroth II (12g/lのカゼイン、24g/lの酵母抽出物、11.4g/lのリン酸二カリウム、1.7g/lのリン酸一カリウム; Becton Dickenson, Cockeysville, MD)、5g/lのグリセロール及び5ml/lの硫酸マグネシウムにおいて培養した。20gの細胞を収穫し、そしてタンパク質精製のために使用した。

40

【0723】

融解された細胞を、500mlのアミロース平衡化緩衝液 (20mMのトリス、100mMのNaCl, pH 8.0) に再懸濁した。-7°C~-10°Cの温度設定及び30K PSIを有するFrenck Press細胞分解システム (Constant Systems Ltd., Warwick, UK) を用いて、細胞を溶解した。再懸濁さ

50

れた細胞を、Franch Pressを用いてのサイクリングの前及び後、 A_{600} 読み取りにより破壊について調べた。上清液を、タンパク質精製のために、残核ペレットから収穫した。

【0724】

アミロース樹脂の25mlカラム (New England Biolabs, Beverly, MA) (下記のようにして調製された) を、Bio-Rad, 2.5cm D×10cm Hのガラスカラムに入れた。カラムを充填し、そして10カラム体積 (CV) のアミロース平衡化緩衝液 (20mMのトリス、100mMのNaCl、pH8.0) により平衡化した。処理された細胞上清液を、一晚、揺り動かしながら、アミロース樹脂にバッチ負荷した。前記樹脂を、Bio-Radカラムに戻し、10CVのアミロース平衡化緩衝液により洗浄し、そして約2CVのアミロース溶出緩衝液 (アミロース平衡化緩衝液、10mMのマルトース、Fluka Biochemical, Switzerland) により重力により溶出した。10の5mlの画分を、溶出プロフィールにわたって集め、そして280及び320nmで吸光度についてアッセイした。アミロース樹脂を、1CVの蒸留水、5CVの0.1% (w/v) のSDS (Sigma)、5CVの蒸留水、5CVのアミロース平衡化緩衝液、及び最終的に1CVのアミロース貯蔵緩衝液 (アミロース平衡化緩衝液、0.02% (w/v) のアジ化ナトリウム) により再生した。再生された樹脂を4℃で貯蔵した。

10

【0725】

興味ある溶出プロフィール画分をプールし、そして4LのPBS (pH7.4) (Sigma) (4回の交換を伴って) に対して、8時間にわたって、10K透析チャンパー (Slide-A-Lyzer, Pierce Immunochemical) において透析し、低分子量汚染物を除去し、緩衝液を交換し、そして脱塩した。透析に続いて、収穫された材料は、精製されたhuzcytor17Lig/MBP-6Hポリペプチドを表した。精製されたhuzcytor17Lig/MBP-6Hポリペプチドをフィルター殺菌し、そして適切な分子量の生成物について、SDS-PAGEクーマシー染色により分析した。huzcytor17Lig/MBP-6Hポリペプチドの濃度を、BCA分析により、1.28mg/mlであるものとして決定した。

20

【0726】

例46. ヒトzcytor17ligポリクローナル抗体

A. 調製及び精製:

ポリクローナル抗体を、精製された組換えhuzcytor17L/MBP-6Hポリペプチド (例45) により、2匹の雌New zealand 白色ウサギを免疫化することによって、調製する。ウサギは、完全フロイントアジュバント中、精製されたタンパク質200mgの初期腹腔内 (IP) 注射、続いて、不完全フロイントアジュバント中、精製されたタンパク質100µgの追加免疫IP注射を、3週ごとに与えられる。第2の追加免疫注射 (合計3回の注射) の投与後7~10日で、動物は放血され、そして血清が集められる。次に、動物を、追加免疫し、そして3週ごとに放血する。

30

【0727】

huzcytor17L/MBP-6H特異的ウサギ血清を、CNBr-SEPHAROSE 1g当たり約10mgの非特異的精製された組換えMBP-融合タンパク質を用いて調製されるCNBr-SEPHAROSE 4Bタンパク質カラム (Pharmacia LKB) を用いて、抗-MBP抗体を予備吸着した。huzcytor17L/MBP-6H-特異的ポリクローナル抗体を、10mgの特異的抗原精製された組換えタンパク質huzcytor17L/MBP-6Hを用いて調製されたCNBr-SEPHAROSE 4Bタンパク質カラム (Pharmacia LKB) を用いて、予備吸着されたウサギ血清から親和性精製した。

40

【0728】

精製に続いて、ポリクローナル抗体を、少なくとも8時間にわたって、抗体体積のPBSにより20回 (4回の交換を伴って)、透析した。ヒトzcytor17-リガンド-特異的抗体を、抗体標的物として、500ng/mlの精製された組換えタンパク質huzcytor17L/LMBP-6H又はバキュロウィルス発現システムにおいて生成されたhuzcytor17L-CEEを用いて、ELISAにより特徴づけた。ウサギ抗-huzcytor17L/MBP-6H親和性精製された抗体の検出の下限 (LLD) は、その特異的精製された組換え組換え抗原huzcytor17L/MBP-6Hに基づいて100pg/mlであり、そしてバキュロウィルス発現システムにおいて生成された、精製された組換えhuzcytor17L-CEEに基づいて500pg/mlである。

50

【0729】

B. ウサギ抗-ヒトZcytoR17lig MBP-6H抗体のSDS-PAGE及びウェスタンブロット：

ウサギ抗-ヒトZcytoR17lig MBP-6H抗体を、クーマシー染色方法を用いてのSDS-PAGE (Nupage4-12%, invitrogen, Carlsbad, CA) 及びヤギ抗-IgG-HRPを用いてのウェスタンブロットにより試験した。ヒト及びマウスzcytor17lig精製されたタンパク質 (200~25ng) を、Invitrogen Novex's Xcell II mini-cellを用いて電気泳動し、そして装置のマニュアルに提供される指針に従って、Novex's Xcell IIブロットモデルを用いて室温でニトロセルロース (0.2mm; Invitrogen, Carlsbad, CA) に、攪拌しながらトランスファーした。トランスファーを、25mMのトリス塩基、200mMのグリシン及び20%メタノールを含む緩衝液において、300mAで1時間、行った。

10

【0730】

次に、フィルターを、Western A緩衝液 (50mMのトリス、pH7.4、5mMのEDTA、pH8.0、0.05%のIgepal CA-630、150mMのNaCl及び0.25%のゼラチン) により、4℃で一晩、軽く揺り動かしながらブロッックした。ニトロセルロースをすばやくすすぎ、次にウサギ抗-ヒトzcytoR17lig MBP-6H (1:1000) を、Western A緩衝液に添加した。ブロットを、軽く振盪しながら、室温で1.5時間、室温でインキュベートした。ブロットを、Western Aによりそれぞれ5分間、3度すすぎ、次に、ヤギ抗-ウサギIgG HRP抗体 (1:5000) を、Western A緩衝液に添加した。

【0731】

ブロットを、軽く揺り動かしながら、室温で1時間インキュベートした。ブロットを、Western Aによりそれぞれ5分間、3度すすぎ、次に水によりすばやく、すすいだ。ブロットを市販の化学ルミネセント基質試薬 (1:1に混合されたECL Westernブロット検出試薬1及び2: Amersham Pharmacia Biotech Buckinghamshire, Englandから得られた試薬) を用いて展開し、そしてブロットをX-線フィルムに5分までの間、照射した。

20

【0732】

精製されたヒトzcytor17ligは、約30kDaで大きなバンドとして、及び還元された条件下で約20kDaで小さなバンドとして出現した。マウスzcytor17ligは、ウサギ抗-ヒトzcytor17lig抗体により検出されなかった。

【0733】

例47. 形質転換された骨髄内皮細胞 (TRBMEC) 単層へのU937単離付着に対するZcytor17ligの効果

30

形質転換された骨髄内皮細胞 (TRBMEC) を、Microvascular Growth Supplement (MVGS) (Cascade Biologics) により補充された培地M131 (Cascade Biologics) を含む96ウェル組織クラスター (Falcon) に、25,000/ウェルの密度で接種した。集密性 (24時間後) で、細胞を、1%胎児ウシ血清 (Hyclone) により補充されたM199 (Gibco-Life Technologies) に交換した。ヒト組換えzcytor17lig (試験試薬) を、付着をもたらし免疫細胞-内皮細胞相互作用に対するタンパク質の効果について試験するために、種々の濃度 (0.4~10ng/ml) で添加した。

【0734】

いくつかのウェルは、炎症条件下で内皮細胞に対するタンパク質の効果を試験するために、zcytor17ligの他に、0.3ng/mlの腫瘍壊死因子 (TNF α R&D Systems)、すなわち既知の前炎症性サイトカインを受けた。0.3ng/mlでのTNF α 効果の約70%を表し、すなわちそれは内皮へのU937細胞 (ヒト単離-様細胞系) の最大付着を誘発しない。この理由のために、この設定は、TNF α 効果のアップレギュレーション及びダウンレギュレーションの両者を検出できる。TNF α を伴って及びそれを伴わないでの付着の基礎レベルを、試験試薬の効果を評価するために基線として使用した。

40

【0735】

試験試薬 (zcytor17リガンド $\pm$ TNF α) と共に内皮細胞を一晩インキュベートした後、5 μ MのCalcein-AM蛍光マーカー (Molecular Probes) により染色されたU937細胞を、1%FBSにより補充されたRPMI 1640 (フェノールレッドを有さない) に懸濁し、そしてす

50

すがれたTRBMEC単層上に100,000細胞/ウェルでプレートした。485/538nmの励起/発光波長での蛍光レベル（Molecular Devicesマイクロプレートリーダー、CytoFluor Application）を、非付着性U937を除去するために、温RPMI1640（フェノールを有さない）により3度、十分にすすぐ前、及びすすいだ後、30分後に測定した。前－すすぎ（合計）及び後－すすぎ（付着特異的）蛍光レベルを用いて、%付着性（正味付着/正味合計×100＝%付着性）を決定した。

【0736】

下記表23に見出されるように、zcytor17ligは、単独で添加される場合、使用される濃度範囲で内皮単層へのU937細胞の基礎付着性に影響を及ぼした（2倍以下の上昇、ANOVA試験により $p<0.01$ ）。単独で、陽性クロン、すなわち0.3ng/mlのTNF α は、U937細胞の付着性を、基礎5.8%から35%（6倍）に高めた。TNF α の存在下で、zcytor17ligはTNF α の活性を助け、そしてさらに、0.4～10ng/mlの濃度－依存性態様でU937付着性を増強する（ANOVA試験により $p<0.01$ ）。10ng/mlで、zcytor17ligは、TNF α の効果を62%増強した。それらの結果は、zcytor17ligが単独で前炎症剤であり得ることを示す。

【0737】

zcytor17ligは、内皮細胞への単球付着を高めるために、亜最大濃度のTNF α の活性を助けることができる。それらの結果はまた、内皮細胞が、特に、前炎症性サイトカイン、例えばTNF α に暴露される場合、zcytor17lig作用の標的組織であることを示す。内皮細胞に対するzcytor17リガンドの効果は、前炎症性活性の部分への単球又はマクロファージ付着を強化することであり得る。活性化された単球及びマクロファージは、多くの炎症性疾患において重要である。

【0738】

従って、単球/マクロファージ付着の阻害は、zcytor17リガンドアンタゴニストのための基本原理を提供することができる。このデータは、肺疾患、血管疾患、自己免疫、腫瘍転移、アレルギー性反応を包含する疾病、接触、アレルギー性又は非アレルギー性皮膚炎又は乾癬を包含する皮膚の創傷治療及び疾患、及び炎症性腸疾患を処理するためへのzcytor17リガンドアンタゴニストの使用を支持する。表23は、TRBMEC内皮単層へのU937単球付着に対するzcytor17ligの効果を示す。結果は、%付着率で表され、そして数値は三重反復ウェルの平均±平均標準偏差である。

【0739】

【表23】

表23：

	基礎	0.3ng/mL TNF α
基礎	5.8±1.2	35±5.5
zcytor17lig 0.4ng/mL	9±0.7	44.7±2.5
zcytor17lig 1.1ng/mL	10.4±0.8	45.2±0.6
zcytor17lig 3.3ng/mL	7.9±1.7	51.1±4
zcytor17lig 10ng/mL	9.5±0.5	56.6±3.9

前述から、本発明の特定の態様が例示の目的のために本明細書において記載されて来たが、種々の修飾が本発明の範囲内で行われ得ることが理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0740】

【図1】図1は、ヒトzcytor17lig（配列番号2）（zcytor17lig）及びマウスzcytor17lig（配列番号11）（mzcytor17lig）、マウスIL-3（mIL-3）（配列番号100）、及びヒトIL-3（hIL-3）（配列番号102）の複数一列整列の例示である。

【図2】図2は、ヒトzcytor17lig（配列番号2）（zcytor17lig）及びマウスzcytor17li

g (配列番号11) (mzcytor17lig) の複数一列整列の例示である。

【図3】図3は、ヒトzcytor17lig (配列番号2) のHopp/Woods親水性プロットである。

【図1】

	1	15	16	30	31	45	
1 zcytor17lig	---	ASHTLPVRLRP	SDDVQKIVEELQSL	KMLLDK	--VEEEKGV	40	
2 mzcytor17lig	---	ATCSLSFGAPIS	KEOLRTTIDLLKQES	QDLYNNYSIKQASGM	42		
3 mIL-3	ASISGRDTHRLTRL	NCS-SIVKEIIGKL	--PEP---	ELKT--	35		
4 hIL-3	APMTQTTPKTSW-V	NCS-NMIDEIITHLK	QPPLP--	LLDFNNLN	41		
	46	60	61	75	76	90	
1 zcytor17lig	LVSONYTLPCLSPOA	QPPNNIHSPAIRAYL	KTIRQLDNKSVIDEI	85			
2 mzcytor17lig	SADESIQLPCFSLDR	EALTNISVIIAHLEK	VKVLSE-NTVDTSWV	86			
3 mIL-3	DDEGPSLRNKS----	FRRVNLSKFV	ESQGEVDPEDRYVIK	71			
4 hIL-3	GEDQDILMENN----	LRRPNLEAFN	RAVKSL--QNASAI	75			
	91	105	106	120	121	135	
1 zcytor17lig	IEHLKLIHQDAPET	NISVPTDTHE---	CKRFILTI	ISQOFSECM	127		
2 mzcytor17lig	IRWLTNISCNPLNL	NISVPGNTDES	YDCKVFVLT	VLKQFSNOMA	131		
3 mIL-3	SNLQKLNCLPLSAN	OSALPGVFIRDL	--DFRKL	URFYMH-LN	113		
4 hIL-3	SILKNLLPCLPLATA	APTRHPHIDKGDWN	EFRRKL	TFY----	116		
	136	150	151	165	166	180	
1 zcytor17lig	LALKSLTSGAQATT					142	
2 mzcytor17lig	ELQAKDNTTC					141	
3 mIL-3	DLETVLISRPPQPAS	GSVSPNRGTVEC				140	
4 hIL-3	TLENA----	QAQQT	LSLAIF			133	

FIG. 1

【図2】

	10	20	30	40	50	
ZCYTOR	MASHSGPSTSVL	FLFCCLGGMLASH	TLPVRLLRPSDDVQKIVEELQSL	KMLLDK--VEE		
M17RL-	MIFHTGTTPKPTLVLL	CCIGTWLATCSLSFGAPISKEDLRTTIDLLKQES	ODLYNNYSIKQ			
	10	20	30	40	50	60
	60	70	80	90	100	110
ZCYTOR	EKGVLVSQNYTLPCLSPOA	QPPNNIHSPAIRAYL	KTIRQLDNKSVIDEI	IEHLKLIHQ		
M17RL-	ASQMSADESIQLPCFSLDREALTNI	--SVIIAHLEKVKVLS	ENTVDTSWVIRWLTNISC			
	70	80	90	100	110	
	120	130	140	150	160	
ZCYTOR	DAPETNISVPTDTHE---	CKRFILTI	ISQOFSECM	DLALKSLTSGAQATT		
M17RL-	NPLNLNISVPGNTDES	YDCKVFVLT	VLKQFSNOMAE	LQAKONTTC		
	120	130	140	150	160	

FIG. 2

【図 3 A】

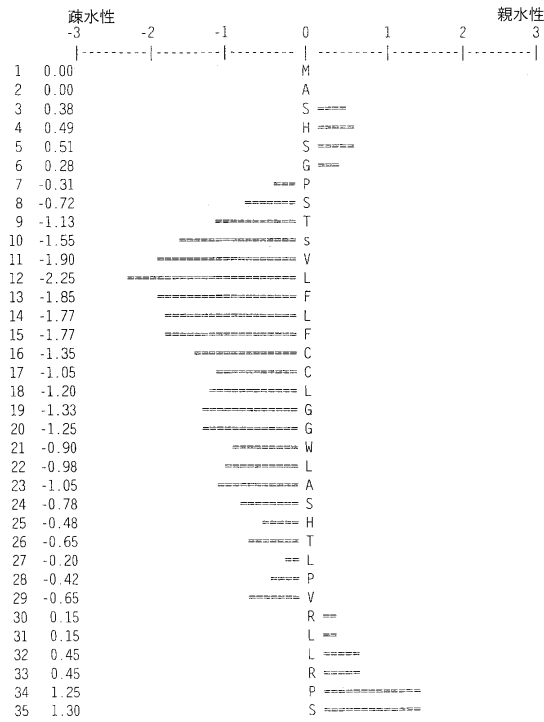


FIG. 3A

【図 3 B】

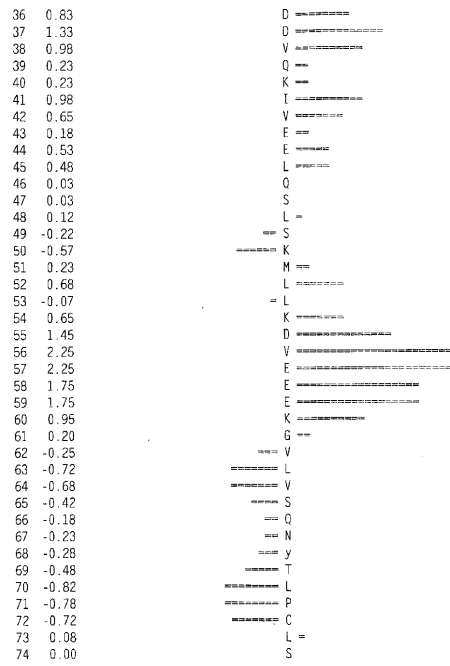


FIG. 3B

【図 3 C】

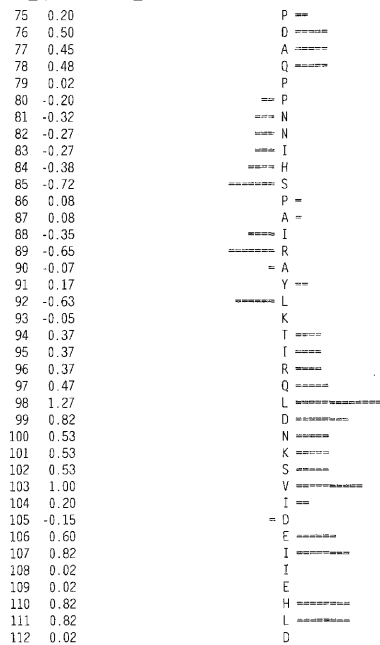


FIG. 3C

【図 3 D】

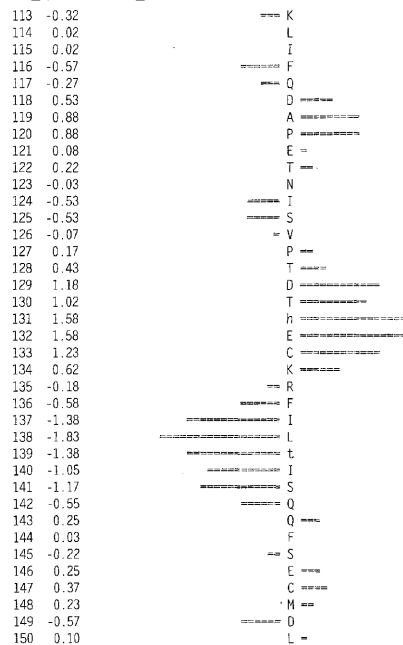


FIG. 3D

【図 3 E】

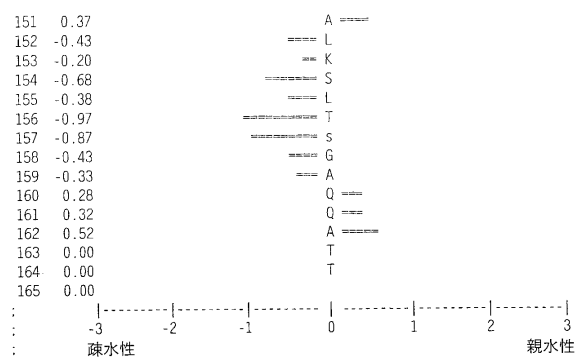


FIG. 3E

【配列表】

0004795641000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A
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 33/53 M
			G 0 1 N 33/566

(31)優先権主張番号 60/435,315

(32)優先日 平成14年12月19日(2002.12.19)

(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72)発明者 シュプレッヒャー, シンディ エー.

アメリカ合衆国, アリゾナ 8 5 6 2 4, パダゴニア, ブルー ヘブン ロード 1 5 0, ピーオー
ボックス 2 9 2

(72)発明者 クイパー, ジョセフ エル.

アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 0 2 8, ケンモア, ノースイースト ワンハンドレッドアンド
ナインティセカンド プレイス 6 5 2 4

(72)発明者 ダソビッチ, マリア エム.

アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 1 4 4, シアトル, トゥエンティーファースト アベニュー サ
ウス 2 5 1 7

(72)発明者 グラント, フランシス ジェイ.

アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 1 1 5, シアトル, サーターセブンス ノースイースト 7
7 1 4

(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 9 8 0 3 3, カー克蘭ド, ノースイースト ワンハンドレッドア
ンドイレブンス プレイス 1 3 1 2 3

(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 9 8 3 9 2, スクアミッシュ, アンジェリン アベニュー 1 8 8 9
2

(72)発明者 グロス, ジェーン エー.

アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 1 1 5, シアトル, ノースイースト セブンティーフォース
ストリート 4 2 5 8

(72)発明者 ディロン, ステイシー アール.

アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 1 1 5, シアトル, トゥエンティーエイス アベニュー ノース
イースト 8 0 5 7

審査官 千葉 直紀

(56)参考文献 国際公開第02/000721 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

JSTPlus(JDreamII)

GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

PubMed

CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

专利名称(译)	新的细胞因子zcytor17配体		
公开(公告)号	JP4795641B2	公开(公告)日	2011-10-19
申请号	JP2003560177	申请日	2003-01-21
[标]申请(专利权)人(译)	津莫吉尼蒂克斯公司		
申请(专利权)人(译)	ZymoGenetics公司，股份有限公司雷开球德		
当前申请(专利权)人(译)	ZymoGenetics公司，公司		
[标]发明人	シュプレッヒャーシンディエー クイパージョセフエル ダソビッチマリアエム グラントフランシスジェイ ハモンドアンジェラケー ノバックジュリアイー グロスジェーンエー デイロンステイシーアール		
发明人	シュプレッヒャー,シンディ エー. クイパー,ジョセフ エル. ダソビッチ,マリア エム. グラント,フランシス ジェイ. ハモンド,アンジェラ ケー. ノバック,ジュリア イー. グロス,ジェーン エー. デイロン,ステイシー アール.		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/52 C07K16/24 C12N5/10 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/566 C07K14/00 A61K A61K38/00 A61K39/395 A61P1/02 A61P1/04 A61P7/00 A61P11/06 A61P15/08 A61P17/06 A61P19/02 A61P29/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 A61P43/00 C07K C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N C12N5/078 C12N15/12 C12N15/19 C12N15/63 C12P21/00 G01N		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K38/00 A61P1/02 A61P1/04 A61P7/00 A61P11/00 A61P11/06 A61P15/08 A61P17/06 A61P19/02 A61P29/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/47 C07K14/52 C07K16/24 C07K2317/24		
FI分类号	C12N15/00.ZNAA C07K14/52 C07K16/24 C12N5/00.101 C12P21/02.H C12P21/08 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 西山雅也		
审查员(译)	千叶直树		
优先权	60/350325 2002-01-18 US 60/375323 2002-04-25 US 60/435315 2002-12-19 US		
其他公开文献	JP2005526494A JP2005526494A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了多肽在制备用于上调哺乳动物中IL-13RA2基因表达的药物中的用途，其中所述多肽包含与氨基酸序列至少90%相同的氨基酸残基序列。多肽残基选自：(a) 包含SEQ ID NO：2所示残基38 (Val) 至152 (Leu) 的氨基酸序列的多肽；(b) 多肽，其包含SEQ ID NO：2所示的残基27 (Leu) 至164 (Thr) 的氨基酸序列；(c) 包含SEQ ID NO：2所示残基24 (Ser) 至164 (Thr) 的氨基酸序列的多肽；(d) 包含SEQ ID NO：2所示的残基1 (Met) 至164 (Thr) 的氨基酸序列的多肽。

表1：

	ヘリックスA	ヘリックスB	ヘリックスC	ヘリックスD	
zcytor17lig	38-52	83-98	104-117	137-152	配列番号2の
IL-3	35-45	73-86	91-103	123-141	配列番号102の
IL-2	27-48	73-92	102-116	134-149	配列番号162の、又は配列番号168に記載されるようなヘリックスB
IL-4	30-42	65-83	94-118	133-151	配列番号164の
GM-CSF	30-44	72-81	85-103	120-131	配列番号166の