

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4737903号
(P4737903)

(45) 発行日 平成23年8月3日(2011.8.3)

(24) 登録日 平成23年5月13日(2011.5.13)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
C O 7 K	14/715 (2006.01)	C O 7 K	14/715
C 1 2 N	7/00 (2006.01)	C 1 2 N	7/00
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19

請求項の数 17 (全 86 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-509508 (P2001-509508)
(86) (22) 出願日	平成12年6月30日(2000.6.30)
(65) 公表番号	特表2003-504058 (P2003-504058A)
(43) 公表日	平成15年2月4日(2003.2.4)
(86) 国際出願番号	PCT/US2000/018383
(87) 国際公開番号	W02001/004304
(87) 国際公開日	平成13年1月18日(2001.1.18)
審査請求日	平成19年6月20日(2007.6.20)
(31) 優先権主張番号	09/348,854
(32) 優先日	平成11年7月7日(1999.7.7)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	505222646 ザイモジェネティクス, インコーポレイ テッド アメリカ合衆国 ワシントン州 シアトル イーストレイク アベニュー イースト 1 2 0 1
(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(74) 代理人	100128048 弁理士 新見 浩一
(72) 発明者	プレスネル, スコット アール. アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 4 0 7 , タコマ, ノース プロジェクト サウンド アベニュー 2 9 0 2

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトサイトカイン受容体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 のアミノ酸残基21 - 452を含んで成る、単離されたポリペプチド。

【請求項 2】

前記単離されたポリペプチドが、(a) 配列番号 2 のアミノ酸残基21 - 677、及び(b) 配列番号 2 のアミノ酸残基1 - 692から成る群から選択されたアミノ酸配列を含んで成る、請求項 1 記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 3】

前記ポリペプチドが、配列番号 2 のアミノ酸残基21 - 452に対してカルボキシル - 末端位置に存在する、配列番号 2 のアミノ酸残基453 - 473を含んで成るトランスメンブランド
メインをさらに含んで成る請求項 1 記載の単離されたポリペプチド。 10

【請求項 4】

前記ポリペプチドが、前記トランスメンブランドメインに対してカルボキシル - 末端位置に存在する、配列番号 2 のアミノ酸残基474 - 677を含んで成る細胞内ドメインをさらに含んで成る請求項 3 記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 5】

前記ポリペプチドが、配列番号 2 のアミノ酸残基21 - 452に対してアミノ - 末端位置に存在する、配列番号 2 のアミノ酸配列のアミノ酸残基 1 - 20を含んで成るシグナル分泌配列をさらに含んで成る請求項 4 記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 6】

20

(a) 配列番号 3 のヌクレオチド配列を含んで成る核酸分子、(b) 配列番号 2 のアミノ酸残基 21 - 677 を含んで成るアミノ酸配列をコードする核酸分子、及び(c) 配列番号 1 のヌクレオチド 214 - 2184 のヌクレオチド配列又は配列番号 1 のヌクレオチド 214 - 2184 の相補体を含んで成る核酸分子に対して、緊縮洗浄条件下でハイブリダイズされたまま存続する核酸分子から成る群から選択された、Zcytor14 ポリペプチドをコードする単離された核酸分子。

【請求項 7】

請求項 6 記載の単離された核酸分子を含んで成るベクター。

【請求項 8】

配列番号 2 のアミノ酸残基 21 - 452 を含んで成るアミノ酸配列をコードする核酸分子、転写プロモーター及び転写ターミネーターを含んで成る発現ベクターであって、前記プロモーターが前記核酸分子により操作可能的に連結され、そして前記核酸分子が前記転写ターミネーターにより操作可能的に連結されることを特徴とする発現ベクター。

10

【請求項 9】

請求項 8 記載の発現ベクターを含んで成る組換えウイルス。

【請求項 10】

細菌、酵母細胞、菌類細胞、昆虫細胞、哺乳類細胞及び植物細胞から成る群から選択された、請求項 8 記載の発現ベクターを含んで成る組換え宿主細胞。

【請求項 11】

Zcytor14 タンパク質を生成するために請求項 8 記載の発現ベクターを用いる方法であって、前記発現ベクターを含んで成り、そして前記 Zcytor14 タンパク質を生成する組換え宿主細胞を培養する段階を含んで成る方法。

20

【請求項 12】

請求項 1 記載のポリペプチドと特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント。

【請求項 13】

配列番号 2 のアミノ酸残基 21 - 452 から成る単離されたポリペプチド。

【請求項 14】

請求項 13 記載の単離されたポリペプチドと特異的に結合する抗体。

【請求項 15】

請求項 13 記載の単離されたポリペプチド及び免疫グロブリン成分を含んで成る融合タンパク質。

30

【請求項 16】

免疫グロブリン成分が、免疫グロブリン重鎖不変領域である、請求項 15 記載の融合タンパク質。

【請求項 17】

前記免疫グロブリン重鎖不変領域が、Fc フラグメントである、請求項 16 記載の融合タンパク質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

技術分野：

40

本発明は一般的に、ヒト細胞により発現される新規タンパク質に関する。特に、本発明は、“Zcytor 14” と称する受容体をコードする新規遺伝子、及び Zcytor 14 ポリペプチドをコードする核酸分子に関する。

【0002】

発明の背景：

サイトカインは、多くの細胞型の増殖及び分化の調節を包含する種々の生物学的効果を仲介する可溶性の小さなタンパク質である(例えば、Arai など., Annu. Rev. Biochem. 56: 783 (1990); Mosmann, Curr. Opin. Immunol. 3:311 (1991); Paul and Seder, Cell 76: 241 (1994) を参照のこと)。サイトカイングループを構成するタンパク質は、インターロイキン、インターフェロン、コロニー刺激因子、腫瘍壊死因子及び他の調節分子を包

50

含する。例えば、ヒトインターロイキン - 17は、インターロイキン - 6、細胞内付着分子 1、インターロイキン - 8、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子の発現、及びプロスタグランジンE2発現を刺激し、そしてCD34⁺造血前駆体の好中球への選択的成熟において役割を演じるサイトカインである。(Yaoなど., J. Immunol. 155: 5483 (1995); Fossiez など., J. Exp. Med. 183: 2593 (1996))。

【 0 0 0 3 】

サイトカインを結合する受容体は典型的には、高い親和性でサイトカインを結合し、そしてこの結合現象を、一定の受容体サブユニットの細胞質部分を通して細胞にトランスダクションする 1 又は複数の膜内在性タンパク質から構成される。サイトカイン受容体は、それらの細胞外リガンド結合ドメインにおける類似性に基づいて、いくつかのクラスに分類されている。例えば、インターフェロンの結合及び/又はその効果のトランスダクションを担当する受容体鎖は、特徴的な200個の残基の細胞外ドメインに基づいて、タイプIIサイトカイン受容体ファミリーのメンバーである。

10

【 0 0 0 4 】

サイトカイン及びそれらの受容体の明らかにされたインビボ活性は、他のサイトカイン、サイトカイン受容体、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臨床学的可能性及びそれらについての必要性を示す。

【 0 0 0 5 】

発明の要約：

本発明は、“Zcytor 14”と称する新規受容体を提供する。本発明はまた、Zcytor 14ポリペプチド及びZcytor 14融合タンパク質、並びにそのようなポリペプチド及びタンパク質をコードする核酸分子、及びそれらの核酸分子及びアミノ酸配列の使用方法を提供する。

20

【 0 0 0 6 】

発明の特定の記載：

1. 概観：

Zcytor 14をコードする実例のヌクレオチド配列は、配列番号 1 により提供される。コードされるポリペプチドは、次ぎのアミノ酸配列を有する：

【 0 0 0 7 】

【表 1】

MPVPWFLLSL ALGRSPVVLS LERLVGPQDA THCSPGLSCR LWDSIDLCLP
 GDIVPAPGPV LAPTHLQTEL VLRCQKETDC DLCLRVAVHL AVHGHWEEPE
 DEEKFGGAAD SGVEEPRNAS LQAQVLSFQ AYPTARCVLL EVQVPAALVQ
 FGQSVGSVVY DCFEAAALGSE VRIWSYTQPR YEKELNHTQQ LPALPWLNVS
 ADGDNVHLVL NVSEEQHFGL SLYWNQVQGP PKPRWHKNLT GPQITLNHT
 DLVPCLCIQV WPLEPDSVRT NICPFREDPR AHQNLWQAAR LRLTLQSWL
 LDAPCSLPAE AALCWRAPGG DPCQPLVPPL SWENVTVDKV LEFPLLKGHP
 NLCVQVNSSE KLQLQECLWA DSLGPLKDDV LLETRGPQD NRSLCALEPS
 GCTSLPSKAS TRAARLGEYL LQDLQSGQCL QLWDDDLGAL WACPMDKYIH
 KRWALVWLAC LLFAAALSLI LLLKKDHAKA AARGRAALLL YSADDSGFER
 LVGALASALC QLPLRVAVDL WSRRELSAQG PVAWFHAQRR QTLQEGGVVV
 LLFSPGAVAL CSEWLQDGVV GPGAHGPHDA FRASLSCVLP DFLQGRAPGS
 YVGACFDRLL HPDAVPALFR TVPVFTLPSQ LPDFLGALQQ PRAPRSGRLQ
 ERAEQVSRAL QPALDSYFHP PGTPAPGRGV GPGAGPGAGD GT(配列番号 : 2)

30

40

【 0 0 0 8 】

従って、Zcytor 14遺伝子は、692個のアミノ酸のポリペプチドをコードする。Zcytor 14

50

の特徴は、推定上のシグナル配列（配列番号2のアミノ酸残基1 - 20）、細胞外ドメイン（配列番号2のアミノ酸残基21 - 452）、トランスメンブランドメイン（配列番号2のアミノ酸残基453 - 473）、及び細胞内ドメイン（配列番号2のアミノ酸残基）を包含する。次ぎのアミノ酸配列を有する、“Zcytor 14-1”と称する変異体Zcytor 14タンパク質が同定されている：

【0009】

【表2】

```

EEPRNASLQA QVVLSFQAYP
TARCVLLEVQ VPAALVQFGQ SVGSVVYDCF EAALGSEVRI WSYTQPRYEK
ELNHTQQLPA LPWLNVSADG DNVHLVLNVS EEQHFGLSLY WNQVQGPPKP
RWHKNLTGPQ IITLNHTDLV PCLCIQVWPL EPDSVRTNIC PFREDPRAHQ
NLWQAARLRL LTLQSWLLDA PCSLPAAEAL CWRAPGGDPC QPLVPPLSWE
NVTVDVNSSE KLQLQECLWA DSLGPKDDV LLETRGPQD NRSLCALEPS
GCTSLPSKAS TRAARLGEYL LQDLQSGQCL QLWDDDLGAL WACPMDKYIH
KRWALVWLAC LLFAAALSLI LLLKKDHAKG WLRLKQDVR SGAAARGRAA
LLYSADDSG FERLVGALAS ALCQLPRVA VDLWSRRELS AQQPVAWFHA
QRRQTLQEGG VVLLFSPGA VALCSEWLQD GVSQPGAHGP HDAFRASLSC
VLPDFLQGRA PGSYVGACFD RLLHPDAVPA LFRTVPVFTL PSQLPDFLGA
LQQPRAPRSG RLQERAEQVS RALQPALDSY FHPPGTPAPG RGVGPGAGPG
AGDGT (配列番号：5)

```

【0010】

このポリペプチドをコードする実例のヌクレオチド配列は、配列番号4により提供される。

配列分析は、Zcytor 14-1が受容体ポリペプチドの切断された形であることを示した。すなわち、Zcytor 14-1は、配列番号2のアミノ酸残基1 - 113を欠いている。配列番号10は、Zcytor 14のN - 末端部分を含むZcytor 14-1ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【0011】

Zcytor 14及びZcytor 14-1アミノ酸配列の比較はまた、それらの2種のポリペプチドが他方では、スプライシングされた変異体であることを示した。Zcytor 14のアミノ酸配列は、Zcytor 14-1が欠いている17個のアミノ酸セグメント（配列番号2のアミノ酸残基339 - 355）を含み、そしてZcytor 14は、Zcytor 14-1に見出される、アミノ酸339に続く13個のアミノ酸セグメント（配列番号5のアミノ酸残基350 - 362）を欠いている。両アミノ酸セグメントを含むポリペプチドは配列番号11により供給され、そして配列番号12は13個及び17個の両アミノ酸セグメントを欠いているポリペプチドのアミノ酸配列を提供する。

【0012】

Zcytor 14遺伝子は染色体3p25 - 3p24に存在する。下記に論じられるように、この領域は、種々の障害及び疾病に関連している。

ノザン分析は、甲状腺、副腎、前立腺及び肝臓組織においてZcytor 14遺伝子の強い発現が存在し、そして心臓、小腸、胃及び気管組織においては、低い発現が存在することを示す。対照的に、脳、胎盤、肺、骨格筋、腎臓、脾臓、脾臓、胸腺、精巣、卵巣、結腸、末梢白血球、脊髄、リンパ節及び骨髄における発現はほとんどか又はまったく存在しない。それらの観察は、Zcytor 14配列が種々の組織間で分化することを示す。

【0013】

下記のように、本発明は、(a)配列番号2のアミノ酸残基21 - 452、(b)配列番号10

のアミノ酸残基21 - 435、(c)配列番号2のアミノ酸残基21 - 677、及び(d)配列番号2のアミノ酸残基1 - 692から成る群から選択された対照アミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも80%、又は少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含んで成る、配列番号2のアミノ酸配列又は配列番号10のアミノ酸配列のいずれかから成るポリペプチドと特異的に結合する抗体と特異的に結合する単離されたポリペプチドを提供する。例示的なポリペプチドは、配列番号2, 10, 11及び12から成る群から選択されたアミノ酸配列を含んで成るポリペプチドを包含する。

【0014】

本発明はまた、配列番号2のアミノ酸配列のアミノ酸残基21 - 452、又は配列番号10のアミノ酸配列のアミノ酸残基21 - 435のいずれかを含んで成る細胞外ドメインを含んで成るポリペプチドにも関する。そのようなポリペプチドは、前記細胞外ドメインに関してカルボキシル - 末端位置に存在する、配列番号2のアミノ酸残基453 - 473を含んで成るトランスメンブランドメインをさらに含んで成る。それらのポリペプチドはまた、前記トランスメンブランドメインに関してカルボキシル - 末端位置に存在する、配列番号2のアミノ酸残基474 - 677又は配列番号10のアミノ酸残基457 - 673のいずれかを含んで成る細胞内ドメイン、及び任意には、前記細胞外ドメインに関してアミノ - 末端位置に存在する、配列番号2のアミノ酸配列のアミノ酸残基1 - 20を含んで成るシグナル分泌配列を含んで成る。

【0015】

本発明はまた、変異体Zcytor 14ポリペプチドを包含し、ここで前記変異体ポリペプチドのアミノ酸配列は、少なくとも70%の同一性、少なくとも80%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性又は95%以上の同一性から成る群から選択された、配列番号2のアミノ酸配列との同一性を共有し、そして前記変異体ポリペプチドのアミノ酸配列と配列番号2のアミノ酸配列との間のいずれかの差異は1又は複数の保存性アミノ酸置換によるものである。

【0016】

本発明はさらに、そのようなポリペプチドと特異的に結合する抗体及び抗体フラグメントを提供する。典型的な抗体は、ポリクローナル抗体、ネズミモノクローナル抗体、ネズミモノクローナル抗体に由来するヒト適合された抗体及びヒトモノクローナル抗体を包含する。例示的な抗体フラグメントは、F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, Fv, scFv及び最少認識単位を包含する。本発明はさらに、キャリアー、及び本明細書に記載されるペプチド、ポリペプチド、抗体又は抗 - イディオタイプ抗体を含んで成る組成物を提供する。

【0017】

本発明はまた、(a)配列番号3のヌクレオチド配列を含んで成る核酸分子、(b)配列番号2のアミノ酸残基21 - 677又は配列番号10のアミノ酸残基21 - 673のいずれかを含んで成るアミノ酸配列をコードする核酸分子、及び(c)配列番号1のヌクレオチド214 - 2184のヌクレオチド配列又は配列番号1のヌクレオチド214 - 2184の補体を含んで成る核酸分子に対して、緊縮洗浄条件下でハイブリダイズされたまま存続する核酸分子から成る群から選択された、Zcytor14ポリペプチドをコードする単離された核酸分子を提供する。例示的な核酸分子は、核酸分子(c)によりコードされるアミノ酸配列と配列番号2のその対応するアミノ酸配列との間のいずれかの差異が保存性アミノ酸置換のためであるそれらの核酸を包含する。本発明はさらに、配列番号1のヌクレオチド214 - 2184、又は配列番号1のヌクレオチド154 - 2184を含んで成る単離された核酸分子にも関する。

【0018】

本発明はまた、そのような核酸分子を含んで成るベクター及び発現ベクターを包含する。そのような発現ベクターは、転写プロモーター及び転写ターミネーターを含んで成り、ここで前記プロモーターが前記核酸分子に操作可能的に連結され、そして前記核酸分子が転写ターミネーターに操作可能的に連結される。本発明はさらに、それらのベクター及び発現ベクターを含んで成る組換え宿主細胞及び組換えウィルスを包含する。例示的な宿主細胞は、細菌、酵母、菌類、昆虫、哺乳類、及び植物細胞を包含する。そのような発現ベクターを含んで成る組換え宿主細胞は、発現ベクターを含んで成り、そしてZcytor 14タン

10

20

30

40

50

パク質を生成するそのような組換え宿主を培養し、そして任意には、その培養された宿主細胞からZcytor 14タンパク質を単離することによって、Zcytor 14ポリペプチドを調製するために使用され得る。

【0019】

さらに、本発明は、医薬的に許容できるキャリアー、及び少なくとも1つのそのような発現ベクター、又はそのような発現ベクターを含んで成る組換えウイルスを含んで成る医薬組成物を提供する。本発明はさらに、医薬的に許容できるキャリアー及び本明細書に記載されるポリペプチドを含んで成る医薬組成物を包含する。

【0020】

本発明はまた、生物学的サンプルにおけるZcytor 14RNAの存在を検出するための方法を提供し、ここで前記方法は、(a) Zcytor 14核酸プローブと、(i) 前記生物学的サンプルから単離された試験RNA分子、又は(ii) 前記単離された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、配列番号1のヌクレオチド配列の一部、又はその相補体から成るヌクレオチド配列を含んで成り；そして(b) 前記核酸プローブ、及び前記試験RNA分子又は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し、ここで前記ハイブリッドの存在が前記生物学的サンプルにおけるZcytor 14 RNAの存在を示す。

10

【0021】

本発明はさらに、生物学的サンプルにおけるZcytor 14の存在を検出するための方法を提供し、ここで前記方法は、(a) 前記生物学的サンプルと、配列番号2のアミノ酸配列から成るポリペプチドと特異的に結合する抗体、又は抗体フラグメントとを接触せしめ、ここで前記接触が、前記生物学的サンプルへの前記抗体又は抗体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) 前記結合された抗体又は結合された抗体フラグメントのいずれかを検出する段階を含んで成る。そのような抗体又は抗体フラグメントはさらに、放射体同位体、蛍光ラベル、化学ルミネセントラベル、酵素ラベル、生物ルミネセントラベル及びコロイド状金から成る群から選択された検出できるラベルを含んで成る。

20

【0022】

本発明はまた、それらの検出方法を行うためのキットを提供する。例えば、Zcytor 14遺伝子発現の検出のためのキットは、核酸分子を含んで成る容器を含んで成り、ここで前記核酸分子は、(a) 配列番号1のヌクレオチド214 - 2184のヌクレオチド配列を含んで成る核酸分子、(b) 配列番号1のヌクレオチド配列のヌクレオチド214 - 2184の補体を含んで成る核酸分子、(c) 少なくとも8個のヌクレオチドから成る(a)のフラグメントである核酸分子、及び(d) 少なくとも8個のヌクレオチドから成る(b)のフラグメントである核酸分子から成る群から選択される。そのようなキットはまた、核酸分子の存在を示すことができる1又は複数の試薬を含んで成る第2容器を含んで成る。他方では、Zcytor 14タンパク質の検出のためのキットは、配列番号2のアミノ酸配列から成るポリペプチドと特異的に結合する、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。

30

【0023】

本発明はまた、配列番号2又は配列番号10のアミノ酸配列から成るポリペプチドを特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントを特異的に結合する、抗-イディオタイプ抗体又は抗-イディオタイプ抗体フラグメントも企画する。

40

【0024】

本発明はさらに、Zcytor 14分泌シグナル配列をコードするヌクレオチド配列、及び生物学的活性のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んで成る単離された核酸分子を包含し、ここで前記Zcytor 14分泌シグナル配列は、配列番号2の残基1~20のアミノ酸配列を含んで成る。生物学的活性のポリペプチドは、第VIIa因子、プロインスリン、インスリン、卵巣刺激ホルモン、組織型プラスミノゲン活性化因子、腫瘍壊死因子、インターロイキン、コロニー刺激因子、インターフェロン、エリトロポエチン、及びトロンボポエチンを包含する。さらに、本発明は、Zcytor 14分泌シグナル配列及びポリペプチドを含んで成る融合タンパク質を提供し、ここで前記Zcytor 14分泌シグナル配列は、配列

50

番号2の残基1~20のアミノ酸配列を含んで成る。

【0025】

本発明はさらに、配列番号2のアミノ酸残基21-452又は配列番号10のアミノ酸残基21-435のいずれかを含んで成る細胞外Zcytor 14ドメインをコードする単離された核酸分子を提供する。本発明はまた、配列番号2のアミノ酸残基21-452、又は配列番号10のアミノ酸残基21-435のいずれかから成る単離されたポリペプチド、そのようなポリペプチドを特異的に結合する抗体、及びそのような抗体と特異的に結合する抗-イディオタイプ抗体を包含する。

【0026】

本発明はまた、配列番号2のアミノ酸残基21-452又は配列番号10のアミノ酸残基21-425のいずれかを含んで成るZcytor 14細胞外ドメイン及び免疫グロブリン成分を含んで成る融合タンパク質を提供する。そのような融合タンパク質においては、免疫グロブリン成分は、免疫グロブリンH鎖不変領域、例えばヒトFcフラグメントであり得る。本発明はさらに、そのような融合タンパク質をコードする単離された核酸分子を包含する。

本発明のそれらの及び他の観点は、下記の詳細な記載に基づいて明らかになるであろう。

【0027】

2. 定義:

次の記載においては、多くの用語が広範囲に使用される。次の定義は、本発明の理解を促進するために提供される。

本明細書において使用される場合、“核酸”又は“核酸分子”とは、ポリヌクレオチド、例えばデオキシリボ核酸(DNA)又はリボ核酸(RNA)、オリゴヌクレオチド、ポリメラーゼ鎖反応(PCR)により生成されるフラグメント、及び連結、切断、エンドヌクレアーゼ作用及びエキソヌクレアーゼ作用のいずれかにより生成されるフラグメントを言及する。

【0028】

核酸分子は、天然に存在するヌクレオチド(例えばDNA及びRNA)、又は天然に存在するヌクレオチドの類似体(例えば天然に存在するヌクレオチドの鏡像異性体形)、又は両者の組み合わせであるモノマーから構成され得る。修飾されたヌクレオチドは、糖成分において、及び/又はピリミジン又はプリン塩基成分において変更を有することができる。糖修飾は、ハロゲン、アルキル基、アミン及びアジド基による1又は複数のヒドロキシル基の置換を包含し、又は糖はエーテル又はエステルとして機能され得る。さらに、全糖成分は、立体的に及び電子的に類似する構造体、例えばアザ-糖及びカルボン酸糖類似体により置換さえ得る。

【0029】

塩基成分における修飾の例は、アルキル化されたプリン及びピリミジン、アシル化されたプリン又はピリミジン、又は他の良く知られている複素環式置換基を包含する。核酸モノマーは、ホスホジエステル結合又はそのような結合の類似体により結合さえ得る。ホスホジエステル結合の類似体は、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホラニリデート、ホスホラミデート、及び同様のものを包含する。用語“核酸分子”とはまた、いわゆる、ポリアミド主鎖に結合される天然に存在するか又は修飾された核酸塩基を含んで成る“ペプチド核酸”も包含する。核酸は一本鎖又は二本鎖のいずれかであり得る。

【0030】

用語“核酸分子の相補体”とは、相補的ヌクレオチド配列、及び対照ヌクレオチド配列に比較して逆の配向を有する核酸分子である。例えば、配列5' ATGCACGGG 3' は、5' CCGTGCAT 3' に対して相補的である。

用語“contig”とは、他の核酸分子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核酸分子を示す。連続した配列とは、核酸分子の全体において、又はその一部に沿って、一定の長さの核酸分子を“オーバーラップ”すると言われる。

【0031】

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

10

20

30

40

50

(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)。

【0032】

用語“構造遺伝子”とは、特定のポリペプチドの特徴のアミノ酸の配列に翻訳されるメッセンジャーRNA(mRNC)に転写される核酸分子を言及する。

“単離された核酸分子”とは、生物のゲノムDNAに組み込まれない核酸分子である。例えば、細胞のゲノムDNAから分離された成長因子をコードするDNA分子が、単離されたDNA分子である。単離された核酸分子のもう1つの例は、生物のゲノムに組み込まれない、化学的に合成された核酸分子である。特定の種から単離された核酸分子は、その種からの染色体の完全なDNA分子よりも小さい。

10

【0033】

“核酸分子構造体”とは、天然においては存在しない配置で組み合わせられ、そして並置された核酸のセグメントを含むようヒト介在を通して修飾された - 本鎖又は二本鎖の核酸分子である。

“線状DNA”とは、遊離5'及び3'及び末端を有する非環状DNA分子を示す。線状DNAは、閉環DNA分子、例えばプラスミドから、酵素消化又は物理的な破壊により調製され得る。

【0034】

“相補的DNA(cDNA)”とは、逆転写酵素によりmRNA鋳型から形成される一本鎖DNA分子である。典型的には、mRNAの一部に対して相補的なプライマーは、逆転写の開始のために使用される。当業者はまた、そのような一本鎖DNA分子及びその相補的DNA鎖から成る二本鎖DNA分子を言及するために用語“cDNA”を用いる。用語“cDNA”はまた、RNA鋳型から生成されたcDNA分子のクローンも言及する。

20

【0035】

“プロモーター”とは、構造遺伝子の転写を方向づけるヌクレオチド配列である。典型的には、プロモーターは、構造遺伝子の転写開始部位に最も近い、遺伝子の5'非コード領域位置する。転写の開始において機能するプロモーター内の配列要素は、しばしば、コンセンサスヌクレオチド配列により特徴づけられる。それらのプロモーター要素は、RNAポリメラーゼ結合部位、TATA配列、CAAT配列、分化 - 特異的要素(DSE: McGeheeなど., *Mol. Endocrinol.* 7: 511 (1993))、サイクリックのAMP応答要素(CRE)、血清応答要素(SRE: Treisman, *Seminars in Cancer Biol.* 1: 47 (1990))、グルココルチコイド応答要素(GRE)及び他の転写因子のための結合部位、例えばCRE/ATF(0' Reillyなど., *J. Biol. Chem.* 267: 19938 (1992))、AP2(Yeなど., *J. Biol. Chem.* 269: 25728 (1994))、SP1、cAMP応答要素結合タンパク質(CREB; Loeken, *Gene Expr.* 3: 253 (1993))、及びオクタマー因子(一般的には、Watsonなど., eds., *Molecular Biology of the Gene*, 4th ed. (The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc. 1987), and Lemaigre and Rousseau, *Biochem. J.* 303: 1 (1994))を包含する。プロモーターが誘発プロモーターである場合、転写の速度は誘発剤に反応して上昇する。対照的に、転写の速度は、プロモーターが構成プロモーターである場合、誘発剤により調節されない。抑制できるプロモーターはまた知られている。

30

40

【0036】

“コアプロモーター”は、TATAボックス及び転写の開始を包含するプロモーター機能のための必須ヌクレオチド配列を含む。この定義によれば、コアプロモーターは、活性を増強し又は組織特異的活性を付与することができる特定の配列の不在下で検出できる活性を有しても又は有さなくても良い。

【0037】

“調節要素”は、コアプロモーターの活性を調節するヌクレオチド配列である。例えば、調節要素は、特定の細胞、組織又はオルガネラにおいて独占的に又は選択的に転写を可能にする細胞因子と結合するヌクレオチド配列を含むことができる。それらのタイプの調節要素は通常、“細胞 - 特異的”、“組織 - 特異的”、又は“オルガネラ - 特異的”態様で

50

発現される遺伝子に結合されている。例えば、Zcytor 14プロモーターは、腎臓、膵臓又は脾臓組織に対して、甲状腺、副腎、前立腺及び肝臓組織において、操作可能的に結合された遺伝子の発現を高い程度、刺激すべきである。

“エンハンサー”は、転写の開始部位に対してエンハンサーの距離又は配向に関係なく、転写の効率を高めることができるタイプの調節要素である。

【0038】

“異種DNA”とは、所定の宿主細胞内に天然において存在しない、DNA分子又はDNA分子の集団を言及する。特定宿主細胞に対して異種であるDNA分子は、宿主DNAが非宿主DNA（すなわち、外来性DNA）と組み合わせられる限り、宿主細胞種（すなわち、内因性DNA）に由来するDNAを含むことができる。例えば、転写プロモーターを含んで成る宿主DNAセグメントに操作可能的に連結されるポリペプチドをコードする非宿主DNAセグメントを含むDNA分子は、異種DNA分子であると思われる。逆に言えば、異種DNA分子は、外来プロモーターと操作可能的に連結される内因性遺伝子を含むことができる。もう1つの例として、野生型細胞に由来する遺伝子を含んで成るDNA分子は、そのDNA分子が野生型遺伝子を欠いている突然変異細胞中に導入される場合、異種DNAであると思われる。

10

【0039】

“ポリペプチド”とは、天然又は合成的に生成されても、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個よりも少ないアミノ酸残基のポリペプチドは通常、“ペプチド”として言及される。

“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。

20

【0040】

非宿主DNA分子によりコードされるペプチド又はポリペプチドは“異種”ペプチド又はポリペプチドである。

“組み込まれた遺伝子要素”とは、その要素がヒト操作を通して細胞中に導入された後、宿主細胞の染色体中に組み込まれているDNAのセグメントである。本発明においては、組み込まれた遺伝子要素は通常、エレクトロポレーション又は他の技法により細胞中に導入される線状化されたプラスミドに由来する。組み込まれた遺伝子要素は、元の宿主細胞からその子孫に通過される。

30

【0041】

“クローニングベクター”は、宿主細胞において自律的に複製する能力を有する、核酸分子、例えばプラスミド、コスミド、又はバクテリオファージである。クローニングベクターは典型的には、ベクターの必須の生物学的機能を失わないで、決定できる態様で核酸分子の挿入を可能にする1又は少数の制限エンドヌクレアーゼ認識部位、及びクローニングベクターにより形質転換された細胞の同定及び選択への使用のために適切であるマーカー遺伝子をコードするヌクレオチド配列を含む。マーカー遺伝子は典型的には、テトラサイクリン耐性又はアンピシリン耐性を付与する遺伝子を含む。

40

【0042】

“発現ベクター”は、宿主細胞において発現される遺伝子をコードする核酸分子である。典型的には、発現ベクターは、転写プロモーター、遺伝子及び転写ターミネーターを含む。遺伝子発現は通常、プロモーターの制御下に配置され、そしてそのような遺伝子はプロモーターに“操作可能的に結合される”と言われる。同様に、調節要素及びコアプロモーターは、調節要素がコアプロモーターの活性を調節する場合、操作可能的に連結される。

【0043】

“組換え宿主”とは、異種核酸分子、例えばクローニングベクター又は発現ベクターを含む細胞である。本明細書においては、組換え宿主の例は、発現ベクターからZcytor 14を

50

生成する細胞である。対照的に、Zcytor 14は、Zcytor 14の“天然源”であり、そして発現ベクターを欠いている細胞により生成さえ得る。

“インテグレイティブ組換え体”は、異種DNAが細胞ゲノムDNA中に組み込まれるようになる組換え宿主細胞である。

【0044】

“融合タンパク質”は、少なくとも2つの遺伝子のヌクレオチド配列を含んで成る核酸分子により発現されるハイブリッドタンパク質である。例えば、融合タンパク質は、親和性マトリックスを結合するポリペプチドにより融合されるZcytor 14ポリペプチドの少なくとも一部を含むことができる。そのような融合タンパク質は、親和性クロマトグラフィーを用いて、多量のZcytor 14を単離するための手段を提供する。

10

【0045】

用語“受容体”とは、“リガンド”と称する生物活性分子に結合する、細胞結合されたタンパク質を示す。この相互作用は、細胞に対するリガンドの効果を介在する。受容体は、膜結合されたシトソール又は核；モノマー（例えば、胸腺刺激性ホルモン受容体、アドレナリン作用受容体）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、エリトロポエチン受容体及びIL-6受容体）であり得る。膜結合された受容体は、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關与する細胞内エフェクタードメインを含んで成る多ドメイン構造により特徴づけられる。一定の膜結合された受容体においては、細胞外リガンド-結合ドメイン及び細胞内エフェクタードメインは、完全な機能的受容体を含んで成る別々のポリペプチドに位置する。

20

【0046】

一般的に、受容体へのリガンドの結合は、細胞の代謝における変更を導く、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のコンホメーション変化をもたらす。受容体-リガンド相互作用にしばしば連結される代謝現象は、遺伝子転写、リン酸化、脱リン酸化、サイクリックAMPを生成の上昇、細胞カルシウムの代謝、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。

【0047】

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。

30

【0048】

“単離されたポリペプチド”は、汚染性細胞成分、例えば炭水化物、脂質又は天然においてポリペプチドに関連している他のタンパク質性不純物を実質的に含まないポリペプチドである。典型的には、単離されたポリペプチドの調製物は、高く精製された形で、すなわち少なくとも約80%の純度、少なくとも約90%の純度、少なくとも約95%の純度、95%以上の純度、又は99%以上の純度でポリペプチドを含む。特定のタンパク質調製物が単離されたポリペプチドを含むことを示すための1つの手段は、タンパク質調製物のドデシル硫酸ナトリウム（SDS）-ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びゲルのクーマシーブルー染色によるシングルバンドの出現によるものである。しかしながら、用語“単離された”とは、他の物理形、例えばダイマー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。

40

【0049】

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關して使用される。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、その対照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

50

シル末端では必ずしも必要ではない。

用語“発現”とは、遺伝子生成物の生合成を言及する。例えば、構造遺伝子においては、発現はmRNAへの構造遺伝子の転写及び1又は複数のポリペプチドへのmRNAの翻訳を包含する。

【0050】

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、又は通常低いが、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。

10

【0051】

本明細書において使用される場合、用語“イムノモジュレータ-”とは、サイトカイン、幹細胞成長因子、リンフォトキシン、同時-刺激分子、造血因子及びそれらの分子の合成類似体を包含する。

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(又はストレプトアビジン)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。

20

【0052】

“抗-イディオタイプ抗体”とは、免疫グロブリンの可変領域ドメインと結合する抗体である。本明細書においては、抗-イディオタイプの抗体は、抗-Zcytor 14抗体の可変領域と結合し、そして従って、抗-イディオタイプ抗体はZcytor 14のエピトープを模倣する。

“抗体フラグメント”は、抗体の一部、例えば $\text{F(ab}')_2$ 、 F(ab)_2 、 Fab' 、 Aab 及び同様のものである。構造に関係なく、抗体フラグメントは、損なわれていない抗体により認識される同じ抗原と結合する。例えば、抗-Zcytor 14モノクローナル抗体フラグメントは、Zcytor 14のエピトープと結合する。

30

【0053】

用語“抗体フラグメント”はまた、特定の抗原に結合する、合成の又は遺伝的に構築されたポリペプチド、例えばL鎖可変領域から成るポリペプチド、H及びL鎖の可変領域から成る“Fv”フラグメント、L及びH鎖可変領域がペプチドリリングにより連結されている組換え一本鎖ポリペプチド分子(“svFvタンパク質”)、及び超可変領域を模倣するアミノ酸残基から成る最少認識単位を包含する。

“キメラ抗体”は、嚙歯動物抗体に由来する種々のドメイン及び相補的決定領域を含む組換えタンパク質であるが、ところが抗体分子の残りはヒト抗体に由来する。

40

【0054】

“ヒト適合された抗体”は、モノクローナル抗体のネズミ相補的決定領域がネズミ免疫グロブリンのH及びL可変鎖からヒト可変ドメインに移行されている組換えタンパク質である。

本明細書において使用される場合、“治療剤”は、治療のために有用である接合体を生成するために抗体成分に接合される分子又は原子である。治療剤の例は、薬剤、毒素、イムノモジュレーター、キレート化剤、硼素化合物、光活性剤又は染料、及び放射生同位体を包含する。

“検出できるラベル”は、診断のために有用な分子を生成するために抗体成分に接合され得る分子又は原子である。検出できるラベルの例は、キレート化剤、光活性剤、放射性同

50

位体、蛍光剤、常磁性イオン又は他のマーカー成分を包含する。

【 0 0 5 5 】

“ 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。

【 0 0 5 6 】

親和性標識は、ポリ - 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Flag™ ペプチド (Hopp など., Biotechnology 6: 1204-1210, 1988)、ストレプト
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核酸分子は、商品供給者 (例えばPharmacia Biotech, Piscata
way, NJ; Eastman Kodak, New Haven, CT; New England Biolabs, Beverly, MA) から入
手できる。

【 0 0 5 7 】

“ 裸の抗体 ” は、抗体フラグメントに対立するものとして、治療剤により接合されない完
全な抗体である。裸の抗体は、ポリクローナル及びモノクローナル抗体、並びに一定の組
換え抗体、例えばキメラ性及びヒト適合された抗体を包含する。
本明細書において使用される場合、用語 “ 抗体成分 ” は、完全な抗体及び抗体フラグメン
トの両者を包含する。

“ 免疫接合体 ” は、治療剤又は検出できるラベルと抗体成分との接合体である。

【 0 0 5 8 】

本発明において使用される場合、用語 “ 抗体融合タンパク質 ” とは、抗体成分及びZcytor
14ポリペプチド成分を含んで成る組換え分子を言及する。抗体融合タンパク質の例は、Z
cytor 14細胞ドメイン、及びFcドメイン又は抗原 - 結合領域のいずれかを含んで成るタン
パク質を包含する。

“ 標的ポリペプチド ” 又は “ 標的ペプチド ” は、少なくとも 1 つのエピトープを含み、そ
して標的細胞、例えば腫瘍細胞、又は感染剤抗原を担持する細胞上で発現されるアミノ酸
配列である。T細胞は、標的ポリペプチド又は標的ペプチドに、主要組織適合性複合体分
子により提供されるペプチドエピトープを認識し、そして典型的には、標的細胞を溶解し
、又は標的細胞の他に他の免疫細胞を補充し、それにより標的細胞を殺害する。

【 0 0 5 9 】

“ 抗原性ペプチド ” は、T細胞により認識されるMHC - ペプチド複合体を形成するために、
主要組織適合複合体分子を結合し、それにより、T細胞への提供に基づいて細胞毒性リン
パ球応答を誘発するペプチドである。従って、抗原性ペプチドは、適切な主要組織適合性
複合体分子に結合し、そして細胞毒性T細胞応答、例えば抗原を結合するか又は発現する
標的細胞に対する細胞溶解又は特異的サイトカイン開放を誘発することができる。抗原性
ペプチドは、抗原提供細胞又は標的細胞上に、クラスI又はクラスII主要組織適合性複合
体分子に関して結合され得る。

【 0 0 6 0 】

真核生物においては、RNAポリメラーゼIIは、mRNAを生成するために構造遺伝子の転写を
触媒する。核酸分子はRNAポリメラーゼII鋳型を含むより企画され、ここでRNA転写体は特
定のmRNAの配列に対して相補的である配列を有する。RNA転写体は、“ アンチセンスRNA ”
と呼ばれ、そしてアンチセンスRNAをコードする核酸分子は “ アンチセンス遺伝子 ” と呼
ばれる。アンチセンスRNA分子は、mRNA分子に結合することができ、mRNA翻訳の阻害をも
たらす。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 1 】

“ Zcytor 14に対して特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチド ” 又は “ Zcytor 14アンチセンスオリゴヌクレオチド ” は、 (a) Zcytor 14遺伝子の一部と共に安定した三量体を形成できるか、又は (b) Zcytor 14遺伝子のmRNA転写体の一部と共に安定した二量体を形成できる配列を有するオリゴヌクレオチドである。

“ リボザイム ” は、触媒中心を含む核酸分子である。この用語は、RNA酵素、自己スプライシングRNA、自己分解性RNA及びそれらの触媒機能を行う核酸分子を包含する。

“ 外部案内配列 ” は、細胞内mRNAの特定種に内因性リボザイム、すなわちRNアーゼPを方向づけ、RNアーゼPによるmRNAの分解をもたらす核酸分子である。外部案内配列をコードする核酸分子は、“ 外部案内配列遺伝子 ” と呼ばれる。

10

【 0 0 6 2 】

用語 “ 変異体Zcytor 14遺伝子 ” は、配列番号 2 の修飾であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸分子を言及する。そのような変異体は、天然に存在する多型現象のZcytor 14遺伝子、及び配列番号 2 のアミノ酸配列の保存性アミノ酸置換を含む合成遺伝子を包含する。Zcytor 14遺伝子の追加の変異体形は、本明細書に記載されるヌクレオチド配列の挿入又は欠失を含む核酸分子である。変異体Zcytor 14遺伝子は、その遺伝子が配列番号 1 のヌクレオチド配列を有する核酸分子、又はその補体と、緊縮条件下でハイブリダイズするかどうかを決定することによって同定され得る。

【 0 0 6 3 】

他方では、変異体Zcytor 14遺伝子は、配列 - 比較により同定さえ得る。2つのアミノ酸配列は、その2つのアミノ酸配列のアミノ酸残基が、最大の応答により整列される場合、同じである場合、“ 100%のアミノ酸配列同一性 ” を有する。配列比較は、標準のソフトウェアプログラム、例えばDNASTAR (Madison, Wisconsin) により製造されるLASERGENE生物情報コンピューターサイトに包含されるそれらのプログラムを用いて行われ得る。

20

【 0 0 6 4 】

最適な整列を決定することによって、2つのヌクレオチド又はアミノ酸配列を比較するための他の方法は、当業者に良く知られている (例えば、Peruski and Peruski, *The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research* (ASM Press, Inc. 1997), Wu など. (eds.), “ Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins.” In *Methods in Gene Biotechnology*, Pages 123-151 (CRC Press, Inc. 1997), 及びBishop (ed.), *Guide to Human Genome Computing*, 2nd Edition (Academic Press, Inc. 1998) を参照のこと)。配列同一性を決定するための特定の方法は下記に記載される。

30

【 0 0 6 5 】

変異体Zcytor 14遺伝子又は変異体Zcytor 14ポリペプチドを同定するために使用される特定の方法にもかかわらず、変異体遺伝子又はそれによりコードされるポリペプチドは、その抗 - ウィルス又は抗 - 増殖活性により、又は抗 - Zcytor 14抗体に対して特異的に結合する能力により機能的に特徴づけられる。

【 0 0 6 6 】

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ける変化がない)、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。

40

【 0 0 6 7 】

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。

50

“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。

【0068】

本発明は、Zcytor 14遺伝子の機能的フラグメントを包含する。本発明においては、Zcytor 14遺伝子の“機能的フラグメント”は、本明細書に記載されるドメインであるか、又は抗-Zcytor 14抗体と少なくとも特異的に結合する、Zcytor 14ポリペプチドの一部をコードする核酸分子を言及する。

標準分析法の不正確さのために、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。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、Xの言及された値は、 $\pm 10\%$ で正確であると理解されるであろう。

10

【0069】

3. Zcytor 14遺伝子の生成：

ヒトZcytor 14遺伝子をコードする核酸分子は、配列番号1及び4に基づいてのポリヌクレオチドプローブを用いて、ヒトcDNA又はゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって得られる。それらの技法は、標準であり、そして十分に確立されている。

【0070】

例示されるように、ヒトZcytor 14遺伝子をコードする核酸分子は、ヒトcDNAライブラリーから単離され得る。この場合、第1段階は、当業者に良く知られている方法を用いて、組織、例えば甲状腺、副腎、前立腺又は肝臓組織からRNAを単離することによって、cDNAライブラリーを調製することである。一般的に、RNA単離技法は、細胞を分解するための方法、RNAのRNアーゼ指図された分解を阻害するための手段、及びDNA、タンパク質及び多糖類汚染物からRNAを分離する方法を提供すべきである。

20

【0071】

例えば、全RNAは、液体窒素において組織を凍結し、その凍結された組織を乳針及び乳棒により粉碎し、細胞を溶解し、フェノール/クロロホルムの溶液により前記粉碎された組織を抽出し、タンパク質を除き、そして塩化リチウムによる選択的沈殿によりRNAを残る不純物から分離することによって単離され得る（例えば、Ausubel など., (eds.), Short Protocols in Molecular Biology, 3rd Edition pages4-1~4-6 (John Wiley& Sons 1995) [“Ausubel (1995)”]; Wuなど., Methods in Gene Biotechnology, pages33-41 (CRC Press, Inc. 1997) [“Wu(1997)”]を参照のこと)。

30

【0072】

他方では、全RNAは、粉碎された組織をグアニジニウムイソチオシアネートにより抽出し、有機溶媒により抽出し、そしてRNAを汚染物から示差遠心分離により分離することによって単離され得る（例えば、Chirgwinなど., Biochemistry 18: 52 (1979); Ausubel (1995) P.4-1~4-6; Wu (1997) P.33-41 を参照のこと)。

【0073】

cDNAライブラリーを構成するために、ポリ(A)⁺RNAが全RNA調製物から単離されるべきである。ポリ(A)⁺RNAは、オリゴ(dT)-セルロースクロマトグラフィーの標準技法を用いて、全RNAから単離され得る（例えば、Aviv and Leder, Proc. Natl. Acad.Sci. USA69: 1408 (1972); Ausubel (1995) P. 4-11~4-12を参照のこと)。

40

【0074】

二本鎖cDNA分子は、当業者に良く知られている技法を用いて、ポリ(A)⁺RNAから合成される（例えば、Wu (1997) P.41-46を参照のこと)。さらに、市販のキットが、二本鎖cDNA分子を合成するために使用され得る。例えば、そのようなキットは、Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Promega Corporation (Madison, WI) 及びSTRATAGENE (La Jolla, CA) から入手できる。

【0075】

種々のクローニングベクターが、cDNAライブラリーの構成のために適切である。例えば、cDNAライブラリーは、バクテリオファージに由来するベクター、例えば gt10バクターに

50

において調製され得る。例えば、Huynhなど., “Construction and Screening cDNA Libraries in gt10 and 11” in DNA Cloning: A Practical Approach Vol. 1, Glover (ed.), page 49 (IRL Press, 1985); Wu (1997) at pages 47-52 を参照のこと。

他方では、二本鎖cDNA分子は、プラスミドベクター、例えばPBLUESCRIPTベクター (STRATAGENE; La Jolla, CA), LAMDA GEM-4 (Promega Corp.) 又は他の市販のベクター中に挿入され得る。適切なクローニングベクターはまた、American Type Culture Collection (Manassas, VA) から入手できる。

【 0 0 7 6 】

クローン化されたcDNA分子を増幅するために、cDNAライブラリーが、標準技法を用いて、原核宿主中に挿入される。例えば、cDNAライブラリーは、例えばLife Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD) から得られるコンピテントE.コリDH5細胞中に導入され得る。

ヒトゲノムライブラリーは、当業界において良く知られている手段により調製され得る (例えばAusubel (1995) p. 5-1~5-6; Wu (1997) p. 307-327を参照のこと)。ゲノムDNAは、界面活性剤Sarkosylにより組織を溶解し、その溶解物をプロテイナーゼKにより消化し、不溶性残骸を溶解物から遠心分離により清浄し、イソプロパノールを用いて溶解物から核酸を沈殿し、そして塩化セシウム密度グラジエント上で再懸濁されたDNAを精製することによって単離され得る。

【 0 0 7 7 】

ゲノムライブラリーの生成のために適切であるDNAフラグメントは、ゲノムDNAのランダム切断により、又は制限エンドヌクレアーゼによるゲノムDNAの部分消化により得られる。

ゲノムDNAフラグメントは、従来技法、例えば適切な末端を供給するために制限酵素消化の使用、DNA分子の所望しない連結を回避するためにアルカリホスファターゼ処理の使用、及び適切ガリガーゼによる連結に従って、ベクター、例えばバクテリオファージ又はコスミドベクター中に挿入され得る。そのような操作のための技法は当業界において良く知られている (例えば、Ausubel (1995) p. 5-1~5-6; Wu (1997) p. 307-327 を参照のこと)。

他方では、ゲノムライブラリーは、市販源、例えばResearch Genetic (Huntsville, AL) 及びATCC (Manassas, VA) から得られる。

【 0 0 7 8 】

cDNA又はゲノムクローンを含むライブラリーは、標準方法を用いて、配列番号1及び4に基づかれる1又は複数のポリヌクレオチドプローブによりスクリーンされ得る (例えば、Ausubel (1995) p. 6-1~6-11を参照のこと)。

Zcytor 14遺伝子をコードする核酸分子はまた、本明細書に記載されるように、Zcytor 14遺伝子のヌクレオチド配列に基づくヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーによるポリメラーゼ鎖反応 (PCR) を用いて得られる。

【 0 0 7 9 】

PCRによるライブラリーのスクリーニングの一般的方法は、例えば、Yuなど., “Use of The Polymerase Chain Reaction to Screen Phage Libraries”. In Methods in Molecular Biology, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Application, White (ed.), p.211-215 (Humana Press, Inc. 1993)により提供される。さらに、関連する遺伝子を単離するためへのPCRの使用の技法は、例えばPreston, “Use of Degenerate Oligonucleotide Primers and the Polymerase Chain Reaction to Clone Gene Family Members,” in Methods in Molecular Biology, Vol. 15: PCR Protocols; Current Methods and Applications. White (ed.), pages 317-337 (Humana Press, Inc. 1993) により記載される。

【 0 0 8 0 】

下記のようにして生成された抗-Zcytor 14抗体はまた、cDNAライブラリーからのZcytor 14遺伝子をコードするDNA配列を単離するためにも使用され得る。例えば、抗体は gt11 発現ライブラリーをスクリーンするために使用され、又は抗体はハイブリッド選択及び翻訳に続くイムノスクリーニングのために使用され得る (例えば、Ausubel (1995) p.6-12~6-16; Margolis など., “Screening expression libraries with antibody and Pr

10

20

30

40

50

otein Probes” in DNA Cloning 2: Expression Systems, 2nd Edition, Glover など (eds.) p. 1-14 (Oxford University Press 1995) を参照のこと)。

【0081】

他に、Zcytor 14遺伝子は、お互いプライムする長いオリゴヌクレオチド、及び本明細書に記載されるヌクレオチド配列を用いて、核酸分子を合成することによって得られる(例えば、Ausubel (1995) p.8-8~8-9を参照のこと)。ポリメラーゼ鎖反応を用いての確立された技法は、少なくとも2 kbの長さのDNA分子を合成する能力を提供する(Adang など., Plant Molec. Biol. 21: 1131 (1993). Bambot など., PCR Methods and Applications 2:266 (1993), Dilfon など., “Use of the Polymerase Chain Reaction for the Rapid Construction of Synthetic Genes,” in Methods in Molecular Biology, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications. White (ed.), Pages 263-268. (Humana Press. Inc. 1993), 及びHolowachukなど., PCR Methods Appl. 4: 299 (1995)。

10

【0082】

本発明の核酸分子はまた、ホスホラミジット方法のようなプロトコールを用いて、“遺伝子機会”により合成され得る。化学的に合成される二本鎖DNAが遺伝子又は遺伝子フラグメントの合成のような用途のために必要とされる場合、個々の相補的鎖は別々に製造される。短い遺伝子(60~80の塩基対)の生成は技術的に簡単であり、そして相補的鎖を合成し、そして次にそれらをアニーリングすることによって達成され得る。しかしながら、長い遺伝子(300以上の塩基対)の生成に関しては、化学的DNA合成の間、個々のサイクルのカップリング効率はめったに100%ではないので、特殊な手段が必要とされる。この問題を克服するために、合成遺伝子(二本鎖)が、20~100個の長さのヌクレオチドである一本鎖フラグメントからモジュラー形でアセンブルされる。

20

【0083】

ポリヌクレオチド合成の再考のためには、例えば、Glick and Pasternak, Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA (ASM Press 1994), Itakura など., Annu. Rev. Biochem. 53: 323 (1984), などClimie など., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87: 633 (1990) を参照のこと。

【0084】

Zcytor 14 cDNA又はZcytor 14ゲノムフラグメントの配列は、標準の方法を用いて決定され得る。本明細書に開示されるZcytor 14ポリヌクレオチド配列はまた、Zcytor 14遺伝子の5'側の非-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使用され得る。Zcytor 14遺伝子からのプロモーター要素は、例えば乳腫瘍組織又はトランスジェニック動物、又は遺伝子治療を受けている患者において異種遺伝子の発現を方向づけるために使用され得る。Zcytor 14プロモーター又は調節要素を含むゲノムフラグメントの同定は、十分に確立された技法、例えば欠失分析を用いて達成され得る(一般的には、Ausubel (1995) を参照のこと)。

30

【0085】

5'側フランギング配列のクローニングはまた、アメリカ特許第5,641,670号に開示される方法に従って、“遺伝子活性化”によるZcytor 14タンパク質の生成を促進する。手短かに言及すれば、細胞における内因性Zcytor 14遺伝子の発現は、少なくとも標的配列、調節配列、エキソン、及び対になっていないスプライドナー部位を含んで成るDNA構造体を、Zcytor 14遺伝子座中に導入することによって変更される。標的配列は、内因性Zcytor 14遺伝子座を有する構造体の相同組換えを可能にするZcytor 14 5'側非コード配列であり、それにより、前記構造体内の配列は内因性Zcytor 14コード配列により操作可能に連結されるようになる。この場合、内因性Zcytor 14プロモーターが、他の調節は列により置換されるか又はそれにより補充され、増強された組織特異的、又は他方では、調節された発現が提供される。

40

【0086】

4. Zcytor 14遺伝子変異体の生成:

本発明は、本明細書に開示されるZcytor 14ポリペプチドをコードする種々の核酸分子、

50

例えば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、それぞれ配列番号2のZcytor 14ポリペプチドをコードするすべての核酸分子を包含する縮重ヌクレオチド配列である。当業者は、配列番号3の縮重配列がまた、Tに代わってUを置換することによって、それぞれ配列番号2をコードするすべてのRNA配列を提供することを認識するであろう。

【0087】

従って、本発明は、配列番号1のヌクレオチド154~2229、及びそれらのRNA同等物を含んで成るZcytor 14ポリペプチド - コード核酸分子を企画する。同様に、配列番号6のZcytor 14 - 1縮重配列はまた、UとYとを置換することによって、配列番号5をコードするすべてのRNA配列を提供する。

第1表は、縮重ヌクレオチド位置を示すために、配列番号3及び6内に使用される1文字コードを示す。“解”は、コード文字により示されるヌクレオチドである。“相補体”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。

【0088】

【表3】

第1表

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	T	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

所定のアミノ酸について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第2表に示される。

【0089】

【表4】

第2表

アミノ酸	1文字コード	コドン	縮重コドン
Cys	C	TGC TGT	TGY
Ser	S	AGC AGT TCA TCC TCG TCT	WSN
Thr	T	ACA ACC ACG ACT	ACN
Pro	P	CCA CCC CCG CCT	CCN
Ala	A	GCA GCC GCG GCT	GCN
Gly	G	GGA GGC GGG GGT	GGN
Asn	N	AAC AAT	AAV
Asp	D	GAC GAT	GAY
Glu	E	GAA GAG	GAR
Gln	Q	CAA CAG	CAR
His	H	CAC CAT	CAY
Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGT	MGN
Lys	K	AAA AAG	AAR
Met	M	ATG	ATG
Ile	I	ATA ATC ATT	ATH
Leu	L	CTA CTC CTG CTT TTA TTG	YTN
Val	V	CTA 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
いずれか	X		NNN

【0090】

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、5及び10~12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。

【0091】

異なった種は“選択的コドン使用法”を示すことができる。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 Fiera , Gene 18 : 199 - 209、1982 ; Holm, Nuc . Acids Res . 14 : 3075 - 87、1986 ; Ikemura , J . Mol . Biol . 158 : 573 - 97 , 1982、Sharyp and Matassi , Curr . Opin . Genet . Dev . 4 : 851 (1994) , Kane , Curr . Opin . Biotechnol . 6 : 494 (1995) , 及びMakrides , Microbiol . Rev . 60 : 512 (1996) を参照のこと。

【 0 0 9 2 】

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2を参照のこと)。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。

10

【 0 0 9 3 】

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。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鋳型として作用する。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

【 0 0 9 4 】

本発明はさらに、他の種(オルト体)からの相対物を表すポリペプチド及び核酸分子を供給する。それらの種は、哺乳類、鳥類、両性類、八虫類、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、馬及び他の霊長類リガンドからのZcytor 14ポリペプチドである。ヒトZcytor 14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、Zcytor 14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。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。

30

【 0 0 9 5 】

Zcytor 14コードのcDNAが種々の方法、例えば完全な又は部分的なZcytor 14 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Zcytor 14配列から企画されたプライマーを用いて、ポリメラーゼ鎖反応を用いてもクローン化され得る。さらに、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Zcytor 14ポリペプチドに対する抗体により検出され得る。

40

【 0 0 9 6 】

当業者は、配列番号1に開示される配列がヒトZcytor 14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のであろう。本明細書に開示されるヌクレオチド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。本明細書に開示されるヌクレオチド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、本明細書に開示されるアミノ酸配列の対立遺伝子変異体であるタンパク質のように、本発明の範囲内である。

50

【0097】

Zcytor 14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。

【0098】

本発明の好ましい態様においては、単離された核酸分子は、本明細書に開示されるヌクレオチド配列を含んで成る核酸分子に対して、緊縮条件下でハイブリダイズするであろう。例えば、そのような核酸分子は、緊縮条件下で、配列番号1のヌクレオチド配列を含んで成る核酸分子、配列番号1のヌクレオチド154 - 2229のヌクレオチド配列から成る核酸分子、又は配列番号1に対して相補的なヌクレオチド配列又は配列番号1のヌクレオチド154 - 2229を含んで成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 低くあるよう選択される。 T_m は、標的配列の50%が好ましく適合されたプローブに対して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)である。

10

【0099】

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。

20

【0100】

緊縮ハイブリダイゼーション条件は、ハイブリッドの熱溶融点(T_m)よりも約5 ~ 25 低い温度、及び1 Mまでの Na^+ を有するハイブリダイゼーション緩衝液を包含する。より低い温度でのより高い温度の緊縮性は、緩衝液における個々の1%ホルムアミドについて約1 、ハイブリッドの T_m を低めるホルムアミドの添加により達成され得る。一般的に、そのような緊縮条件は、20 ~ 70 の温度、及び6 × SSC及び0 ~ 50%のホルムアミドを含むハイブリッド緩衝液を包含する。高い程度の緊縮性は、40 ~ 70 の温度で及び4 × SSC及び0 ~ 50%のホルムアミドを有するハイブリダイゼーション緩衝液により達成され得る。

30

【0101】

高い緊縮条件は典型的には、42 ~ 70 の温度、及び1 × SSC及び0 ~ 50%のホルムアミドを有するハイブリダイゼーション緩衝液を包含する。異なった程度の緊縮液が、標的配列への最大の特異的結合を達成するために、ハイブリダイゼーション、及び洗浄の間、使用され得る。典型的には、ハイブリダイゼーションに続く洗浄は、ハイブリダイズされた複合体からハイブリダイズされていないポリヌクレオチドプローブを除去するために、上昇する程度の緊縮性で行われる。

40

【0102】

上記条件は、ガイドとして作用することを意味し、そして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。

【0103】

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

50

、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）。

【 0 1 0 4 】

配列分析ソフトウェア、例えばOLIG6.0 (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。

10

【 0 1 0 5 】

ヌクレオチド配列の長さは、ハイブリッド形成の速度及び安定性に影響を及ぼす。小さなプローブ配列、すなわち50個以下の塩基対は、相補的配列との平衡化にすばやく達するが、しかし安定したハイブリッドは形成されない。インキュベーション時間（およそ分~時）が、ハイブリッド形成を達成するために使用され得る。より長いプローブ配列はよりゆっくりと平衡化するが、しかし低い温度でさえ、より安定した複合体を形成する。インキュベーションは、一晩又はそれ以上の間、進行せしめられる。一般的に、インキュベーションは、計算されたコット時間の3倍に等しい期間、行われ得る。コット時間、すなわちポリヌクレオチド配列が再会合するのにかかる時間は、当業界において知られている方法により、特定の配列について計算され得る。

20

【 0 1 0 6 】

ポリヌクレオチド配列の塩基対組成が、ハイブリッド複合体の熱安定性をもたらし、それにより、ハイブリダイゼーション温度の選択及びハイブリダイゼーション緩衝液のイオン強度に影響を及ぼす。A - T対は、塩化ナトリウムを含む水溶液においてG - C対よりも低い安定性である。従って、G - C含有率が高いほど、ハイブリッドはより安定する。配列内のG及びC残基の平等な分布がまた、ハイブリッド安定性に正に寄与する。さらに、塩基対組成は、所定の配列の T_m を変えるために操作され得る。例えば5 - メチルデオキシシジンは、デオキシシチジンより置換され得、そして5 - プロモデオキシウリジンは、デオキシシチジンにより置換され得、そして5 - プロモデオキシウリジンは T_m を高めるためにチミジンにより置換され、そして7 - デアズ - 2' - デオキシグアノシンは、 T_m に対する依存性を低めるためにグアノシンにより置換され得る。

30

【 0 1 0 7 】

ハイブリダイゼーション緩衝液のイオン濃度はまた、ハイブリッドの安定性に影響を及ぼす。ハイブリダイゼーション緩衝液は一般的にブロッキング剤、例えばDenhardt溶液 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.)、変性されたサケ精子DNA、粉乳 (BLOTTO)、ヘパリン又はSDS、及び Na^+ 源、例えばSSC (1 × SSC : 0.15 : NのNaCl, 15mMのクエン酸ナトリウム) 又はSSPE (1 × SSPE : 1.8MのNaCl, 10mMの NaH_2PO_4 , 1mMのEDTA, pH7.7) を含む。典型的には、ハイブリダイゼーション緩衝液は、10mM ~ 1 Mの Na^+ を含む。

40

【 0 1 0 8 】

不安定剤又は変性剤、例えば、ホルムアミド、テトラアルキルアンモニウム塩、グアニジウムカチオン又はチオシアネートカチオンのハイブリダイゼーション溶液への添加が、ハイブリッドの T_m を変更するであろう。典型的には、ホルムアミドが、より便利で且つ低い温度でのインキュベーションの実施を可能にするために、50%までの濃度で使用される。ホルムアミドはまた、RNAプローブを用いる場合、非特異的バックグラウンドを低めるた

50

めにも作用する。

【0109】

例示のように、変異体Zcytor 14ポリペプチドをコードする核酸分子が、配列番号1のヌクレオチド配列（又はその補体）を有する核酸分子により、50%ホルムアミド、5×SSC、50mMのリン酸ナトリウム（pH7.6）、5×Denhardt's溶液（100×Denhardt's溶液：2%（w/v）のFicoll 400、2%（w/v）のポリビニルピロリドン及び2%（w/v）のウシ血清アルブミン）、10%の硫酸デキストラン及び20 µg/mlの変性され、剪断されたサケ精子DNAを含んで成る溶液において、42 °Cで一晩ハイブリダイズされ得る。

【0110】

当業者は、それらのハイブリダイゼーション条件の変動性を考慮することができる。例えば、ハイブリダイゼーション混合物は、ホルムアミドを含まない溶液において、高度で、例えば約65 °Cでインキュベートされ得る。さらに、予備混合されたハイブリダイゼーション溶液が入手でき（例えば、CLONTECH Laboratories, Inc. からのEXPRESSHYB Hybridization Solution）、そしてハイブリダイゼーションは製造業者の説明書に従って行われ得る。

【0111】

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 °Cでの洗浄を包含する。すなわち、変異体Zcytor 14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 °Cでの、0.1%SDSを含む0.5×～2×SSC溶液、例えば55 °Cでの、0.1%SDSを含む0.5×SSC溶液、又は65 °C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。

【0112】

典型的な高い緊縮洗浄条件は、50～65 °C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。例えば、変異体Zcytor 14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 °Cでの、0.1%SDSを含む0.1×～0.2×SSC溶液、例えば50 °Cでの、0.1%SDSを含む0.1×SSC溶液、又は65 °Cでの0.1%SDSを含む0.2×SSC溶液に等しい。

【0113】

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Zcytor 14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95%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。

【0114】

本発明はまた、2種の次の基準を用いて同定され得るZcytor 14変異体核酸分子を企画する：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Zcytor 14変異体は、（1）55～65 °Cでの0.1%SDSを含む0.5×～2×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%又は95%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。

【0115】

他方では、Zcytor 14変異体は、（1）50～65 °Cでの0.1%SDSを含む0.1×～0.2×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少な

10

20

30

40

50

くとも70%,少なくとも80%,少なくとも90%,少なくとも95%又は95%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として特徴づけられ得る。

【0116】

%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、及び第3表(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“BLOSUM62”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：([同一の適合するものの合計数] / [より長い配列の長さ + 2種の配列を整合するためにそのより長い配列中に導入されるギャップの数]) (100)。

10

【0117】

【表5】

第3表

表3 :

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

20

30

40

【0118】

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、1つのアミノ酸配列及び推定上の変異体のアミノ酸配列により供給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。手短には、FASTAがまず、問題の配列(例えば、

50

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。

【0119】

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”。“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。

10

【0120】

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 分析のための好ましい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。

【0121】

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、上記に設定される他のパラメーターを伴って、1~6、好ましくは3~6、最も好ましくは3であり得る。

20

【0122】

本発明は、本明細書に開示されるアミノ酸配列に比較して、1又は複数の保存性アミノ酸変更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。例えば、配列番号2の1又は複数のアミノ酸置換を含む変異体を得られ、ここでアルキルアミノ酸がZcytor 14アミノ酸配列におけるアルキルアミノ酸に代わって置換され、芳香族アミノ酸がZcytor 14アミノ酸における芳香族アミノ酸に代わって置換され、硫黄含有アミノ酸がZcytor 14アミノ酸配列における硫黄含有アミノ酸に代わって置換され、ヒドロキシ含有アミノ酸Zcytor 14アミノ酸配列におけるヒドロキシ含有アミノ酸に代わって置換され、酸性アミノ酸がZcytor 14アミノ酸配列における酸性アミノ酸に代わって置換され、

30

【0123】

塩基性アミノ酸がZcytor 14アミノ酸配列における塩基性アミノ酸に代わって置換され、又は二塩基性モノカルボン酸アミノ酸Zcytor 14アミノ酸配列における二塩基性モノカルボン酸アミノ酸に代わって置換される。通常のアミノ酸の中で、“保存性アミノ酸置換”は、次のグループの個々内のアミノ酸間の置換により示される:(1)グリシン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン、(2)フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファン、(3)セリン及びトレオニン、(4)アスパラギン酸及びグルタミン酸、(5)

40

【0124】

グルタミン及びアスパラギン、及び(6)リシン、アルギニン及びヒスチジン。
BLOSUM62表は、関連するタンパク質の500以上のグループの高く保存された領域を表す、タンパク質配列セグメントの約2,000の局所の複数整列に由来するアミノ酸置換マトリックスである[Henikoff and Henikoff, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89: 10915 (1992)]。従って、BLOSUM62置換頻度は、本発明のアミノ酸配列中に導入され得る保存性アミノ酸置換を定義するために使用され得る。

【0125】

単に化学的性質に基づいてのアミノ酸置換を企画することが可能であるが(上記で論じられたように)、用語“保存性アミノ酸置換”とは、-1よりも大きなBLOSUM62値により表

50

される置換を言及する。例えば、アミノ酸置換は、その置換が0, 1, 2又は3のBLOSUM 62値により特徴づけられる場合、保存性である。このシステムによれば、好ましい保存性アミノ酸置換は、少なくとも1(例えば、1, 2又は3)のBLOSUM62値により特徴づけられ、ところがより好ましくは保存性置換は、少なくとも2(例えば、2又は3)のBLOSUM 62値により特徴づけられる。

【0126】

Zcytor 14の特定の変異体が、その対応するアミノ酸配列(すなわち、配列番号2)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%又は95%以上の配列同一性を有することによって特徴づけられ、ここでアミノ酸配列の変動は、1又は複数のアミノ酸置換による。

10

【0127】

Zcytor 14遺伝子における保存性アミノ酸変化が、配列番号1のいずれか1つに列挙されるヌクレオチドに代わってヌクレオチドを置換することによって導入され得る。そのような“保存性アミノ酸”変異体は、例えばオリゴヌクレオチド指図された突然変異誘発、リンカー走査突然変異誘発、ポリメラーゼ鎖反応を用いての突然変異誘発及び同様の方法により得られる(Ausubel(1995) pages8-10~8-22; 及びMcPherson(ed.), Directed Mutation: A Practical Approach (IRL Press 1991)を参照のこと)。変異体Zcytor 14ポリペプチドが、抗-Zcytor 14抗体を特異的に結合する能力により同定され得る。

【0128】

本発明のタンパク質はまた、天然に存在しないアミノ酸残基を含んで成る。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-トレオニン、メチルトレオニン、ヒドロキシエチルシステイン、ヒドロキシエチルホモシステイン、ニトログルタミン、ホモグルタミン、ピペコリン酸、チアゾリジンカルボン酸、デヒドロプロリン、3-及び4-メチルプロリン、3,3-ジメチルプロリン、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。

20

【0129】

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。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

【0130】

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。

40

【0131】

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。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、

50

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せられ得る (Wynn and Richards, Protein Sci. 2: 395 - 403, 1993)。

【 0 1 3 2 】

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、Zcytor 14アミノ酸により置換され得る。

本発明のポリペプチドにおける必須アミノ酸は、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 - 走査突然変異誘発により同定され得る (Cunningham and Wells, Science 244: 1081 - 1085, 1989; Bassなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 4498 - 502, 1991), Coombs and Corey, "Site-Directed Mutagenesis and Protein Engineering", in Proteins: Analysis and Design, Angeletti(ed.) Ppages 259 - 311(Academic Press, Inc. 1998))。

【 0 1 3 3 】

後者の技法においては、単一のアラニン突然変異が分子中のあらゆる残基で導入され、そして得られる変異体分子が、前記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、生物学的活性について試験される。また、Hiltonなど., J. Biol. Chem. 271: 4699 - 5708, 1996を参照のこと。

【 0 1 3 4 】

配列分析はZcytor 14受容体結合部位を同定するために使用され得るが、Zcytor 14受容体結合ドメインの位置はまた、推定上の接触部位アミノ酸の突然変異と共に、核磁気共鳴、結晶学、電子回折又は光親和性ラベリングのような技法により決定されるように、構造体の物理的分析によっても決定され得る。例えば、de Ves など., Science 255: 306 (1992), Smith など., J. Mol. Biol. 224: 899 (1992), 及びWlodaver など., FEBS Lett. 309:59 (1992) を参照のこと。

【 0 1 3 5 】

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. USA86:2152 - 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。

【 0 1 3 6 】

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 - 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。さらに、ピオチン又はFITCによりラベルされたZcytor 14は、インターフェロン - 受容体の発現クローニングのために使用され得る。

【 0 1 3 7 】

開示されるZcytor 14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。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 8 】

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。生物学的に活性のポリペプチド又は抗-Zcytor 14抗体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。

【 0 1 3 9 】

本発明はまた、Zcytor 14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分子を包含する。核酸分子の通常の欠失分析は、Zcytor 14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を有するDNA分子は、一連の欠失を得るためにBal3 Tヌクレアーゼにより消化され得る。

10

【 0 1 4 0 】

次に、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、そして細胞-細胞相互作用について、又はZcytor 14抗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、又は所望するフラグメ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、Zcytor 14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。

20

【 0 1 4 1 】

この一般的アプローチの例示として、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), Counailleau 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。

30

【 0 1 4 2 】

Zcytor 14ポリペプチドの機能的フラグメントの例は、トランスメンブランドメインを欠いているZcytor 14の可溶性形である。例示的なZcytor 14可溶性形は、配列番号2のアミノ酸残基1 - 452、配列番号2のアミノ酸残基21 - 452、配列番号10のアミノ酸残基1 - 435、又は配列番号10のアミノ酸残基21 - 435から成るポリペプチドを包含する。

40

【 0 1 4 3 】

本発明はまた、本明細書に開示されるアミノ配列に比較して、アミノ配列変化を有するZcytor 14遺伝子の機能的フラグメントも企画する。変異体Zcytor 14遺伝子は、上記のように、開示されるヌクレオチド及びアミノ酸配列との同一性のレベルを決定することにより、構造体に基づいて同定され得る。構造体に基づいて変異体遺伝子を同定するもう1つのアプローチは、可能性ある変異体Zcytor 14遺伝子をコードする核酸分子が、上記のように、配列番号1又は4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することができるかどうかを決定することである。

【 0 1 4 4 】

本発明はまた、本明細書に記載されるZcytor 14ポリペプチドのエピトープ - 担持の部分

50

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)。

【0145】

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を生ぜしめるために有用である。

10

【0146】

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本明細書に開示されるアミノ酸配列の少なくとも4~10個のアミノ酸、少なくとも10~15個のアミノ酸、又は約15~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、Zcytor 14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)。

20

【0147】

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。

30

【0148】

変異体及び融合タンパク質を包含するいずれかのZcytor 14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。さらに、当業者は、本明細書に記載されるヌクレオチド及びアミノ酸配列に基づいて、種々のZcytor 14変異体に標準のソフトウェアを使用することができる。従って、本発明は、次の配列、すなわち配列番号1、2、3、4、5、6、8、9、10、11及び12の少なくとも1つの配列を提供するデータ構造によりコードされるコンピューターに読み取り可能媒体を包含する。

40

【0149】

適切な形のコンピューター読み取り可能媒体は、磁気媒体及び光学的読み取り可能な媒体を包含する。磁気媒体の例は、ハード又は固定されたドライブ、ランダムアクセス記憶(RAM)チップ、フロッピーディスク、デジタルリニアテープ(DLT)、ディスクカーシ及びZIPディスクを包含する。光学的読み取り可能な媒体は、コンパクトディスク(例えば、CD-読み取りのみ記憶(ROM)、CD-再書き込みできる(RW)及びCD-再記録できる)、及びデジタル可転性/ビデオディスク(DVD)(例えば、DVD-ROM, DVD-RAM及びDVD+RW)により例示される。

【0150】

6. Zcytor 14ポリペプチドの生成:

50

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タンパク質を包含する本発明のポリペプチドは、従来の技法に従って、組換え宿主細胞において生成され得る。Zcytor 14遺伝子を発現するためには、ポリペプチドをコードする核酸分子が、発現ペプチドにおいて転写発現を制御し、そして次に、宿主細胞中に導入される調節配列に操作可能的に連結されるべきである。転写調節配列、例えばプロモーター及びエンハンサーの他に、発現ベクターは、翻訳調節配列、及び発現ベクターを担持する細胞の選択のために適切なマーカー遺伝子を包含することができる。

【 0 1 5 1 】

真核細胞において外来性タンパク質の生成のために適切である発現ベクターは、典型的には、(1)細胞宿主における発現ベクターの増殖及び選択を提供するための細菌複製起点及び抗生物質耐性マーカーをコードする真核DNA要素；(2)転写の開始を制御する真核DNA要素、例えばプロモーター；及び(3)転写体のプロセッシングを制御するDNA要素、例えば転写終結/ポリアデニル化配列を含む。上記で論じられたように、発現ベクターはまた、異種ポリペプチドを、宿主細胞の分泌経路中に方向づける分泌配列コードするヌクレオチド配列を包含する。例えば、Zcytor 14発現ベクターは、Zcytor 14遺伝子、及びいずれかの分泌された遺伝子に由来する分泌配列を含むことができる。

10

【 0 1 5 2 】

本発明のZcytor 14タンパク質は、哺乳類細胞において発現され得る。適切な哺乳類宿主細胞の例は、アフリカミドリザル腎細胞 (Vero; ATCC CRL1587)、ヒト胚腎細胞 (293-HEK; ATCC CRL1573)、子供のハムスター腎細胞 (BHK-21, BHK-570; ATCC CRL8544, ATCC CRL10314)、イヌ腎細胞 (MDCK; ATCC CCL34)、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO-K1; ATCC CCL61; CHO DG44 [Chasinなど., Som. Cell. Molec. Genet. 12: 555 (1986)]、ラット下垂体細胞 (CH1; ATCC CCL82)、HeLa S3細胞 (ATCC CCL2.2)、ラット肝癌細胞 (H-4-II-E; ATCC CRL1548)、SV40-形質転換されたモンキー腎細胞 (COS-1; ATCC CRL1650) 及びネズミ胚細胞 (NIH-3T3; ATCC CRL1658) を包含する。

20

【 0 1 5 3 】

哺乳類宿主に関しては、転写及び翻訳シグナルは、ウィルス源、例えばアデノウィルス、ウシ乳頭腫ウィルス、サルウィルス又は同様のものに由来することができ、ここで調節するシグナルは、高レベルの発現を有する特定の遺伝子に関連している。適切な転写及び翻訳調節配列はまた、哺乳類遺伝子、例えばアクチン、コラーゲン、ミコシン及びメタロチオネイン遺伝子から得られる。

30

【 0 1 5 4 】

転写調節配列は、RNA合成の開始を方向づけるために十分なプロモーター領域を含む。適切な真核プロモーターは、マウスメタロチオネインI遺伝子のプロモーター (Hamerなど., J. Molec. Appl. Genet. 1: 273 (1982))、ヘルペスウィルスのTKプロモーター (Mcknight, Cell 31: 355 (1982))、SV40初期プロモーター (Benoistなど., Nature 290: 304 (1981))、Rous肉腫ウィルスプロモーター (Gormanなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6777 (1982))、サイトメガロウィルスプロモーター (Foeckingなど., Gene 45: 101 (1980)) 及びマウス乳腫瘍ウィルスプロモーター (一般的には、Etcheverry, "Expression of Engineered Protein in Mammalian Cell Culture", in Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland など., (eds.), p. 163-181 (John Wiley & Sons, Inc. 1996)を参照のこと) を包含する。

40

【 0 1 5 5 】

他方では、原核プロモーター、例えばバクテリオファージT3 RNAポリメラーゼプロモーターは、その原核プロモーターが真核プロモーターにより調節される場合、哺乳類細胞におけるZcytor 14遺伝子発現を制御するために使用され得る (Zhouなど., Mol. Cell. Biol. 10: 4529 (1990)、及びKaukamanなど., Nucl. Acids Res. 19: 4485 (1991) を参照のこと)。

【 0 1 5 6 】

発現ベクターは、種々の標準の技法、例えばリン酸カルシウムトランスフェクション、リ

50

ポソーム - 介在性トランスフェクション、マイクロプロジェクト - 介在性供給、エレクトロポレーション及び同様のものを用いて、宿主細胞中に導入され得る。好ましくは、トランスフェクトされた細胞が選択され、そして増殖され、宿主細胞ゲノムに安定して組み込まれる発現ベクターを含んで成る組換え宿主細胞が供給される。真核細胞中にベクターを導入するための技法、及び優性選択マーカーを用いてのそのような安定した形質転換体を選択するための技法は、例えばAusubel (1995) 及びMurray (ed.), Gene Transfer and Expression Protocols (Humana Press 1991) により記載される。

【 0 1 5 7 】

例えば、1つの適切な選択マーカーは、抗生物質ネオマイシンに対する耐性を付与する遺伝子である。この場合、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。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増やすことによって実施される。

10

【 0 1 5 8 】

好ましい増幅可能選択マーカーは、メトトレキサ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

【 0 1 5 9 】

Zcytor 14ポリペプチドはまた、ウイルス供給システムを用いて、培養された哺乳類細胞により生成され得る。この目的のための典型的なウイルスは、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、ワクシニアウイルス及びアデノ関連ウイルス(AAV)を包含する。アデノウイルス、すなわち二本鎖DNAウイルスは現在、異種核酸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(Becker など., Meth. Cell Bio. 43: 161 - 89, 1994; 及びJ. T. Douglas and D.T. Curriel, Science & Medicine 4: 44 - 53, 1997 を参照のこと)。アデノウイルスシステムの利点は、比較的大きなDNA挿入体の収容、高い力価に増殖する能力、広範囲の哺乳類細胞型を感染する能力、及び異なったプロモーターを含む多数の入手できるベクターとの使用を可能にする柔軟性を包含する。

30

【 0 1 6 0 】

アデノウイルスゲノムの一部を欠失することによって、異種DNAの大きな挿入体(7kbまでの)が収容され得る。それらの挿入体は、直接的な連結により、又はトランスフェクトされたプラスミドによる相同組換えにより、ウイルスDNA中に導入され得る。EI遺伝子が宿主細胞により供給されない場合、複製の無能性をもたらす、ウイルスベクターからの必須EI遺伝子を欠失することは任意である。例えば、アデノウイルスベクター - 感染されたヒト293細胞(ATCC No. CRL - 1573, 45504, 45505)は、有意な量のタンパク質を生成するために比較的高い細胞密度で、付着細胞として、又は懸濁培養物において増殖され得る(Garnierなど., Cytotechnol. 15: 145 (1994) を参照のこと)。

40

【 0 1 6 1 】

Zcytor 14はまた、他の高等真核細胞、例えば鳥類、菌類、昆虫、酵母、又は植物細胞においても発現され得る。バキュロウイルスシステムは、昆虫細胞中に、クローン化されたZcytor 14遺伝子を導入するための効果的な手段を提供する。適切な発現ベクターは、オートグラファ・カリホルニカ(Autographa californica)核多角体病ウイルス(AcMNPV)に基づかれており、そして良く知られているプロモーター、例えばショウジョウバエ熱ショックタンパク質(hsp)70プロモーター、オートグラファ・カルホルニカ核多角体病ウイルス即時 - 初期遺伝子プロモーター(ie-1)及び遅延された初期39Kプロモーター、バキュロウイルスp10プロモーター及びショウジョウバエメタロチオネインプロモーター

50

を含む。

【0162】

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。トランスファクターを利用するこのシステムは、Bac - to - Bac™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、Zcytor 14リガンド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クター、pFastBacI™ (Life Technologies) を利用する。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Chazenbalk, G. D., and Rapoport, B., J. Biol Chem. 270: 1543 - 9, 1995 を参照のこと。

10

【0163】

さらに、トランスファクターは発現されたZcytor 14リガンドポリペプチドの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., Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 7952 - 6, 1985)。当業界において知られている技法を用いて、Zcytor 14遺伝子を含むトランスファクターにより、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る。

20

【0164】

例示的なPFASTBACベクターは、相当の程度まで修飾され得る。例えば、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Chazenbalk, G. D., and Rapoport, B., J. Biol Chem. 270: 1543 - 9, 1995 を参照のこと。

【0165】

そのようなトランスファ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Zcytor 14リガンド分泌シグナル配列を置換しているトランスファ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。

30

【0166】

組換えウィルス又はbacmidは、宿主細胞をトランスフェクトするために使用される。適切な昆虫宿主細胞は、IPLB - Sf - 21に由来する細胞系、スポドプテラフルギペルダ (Spodoptera frugiperda) さなぎ卵巣細胞系、例えばSf9 (ATCC CRL 1711)、Sf21AE及びSf21 (Invitrogen Corporation; San Diego, CA)、及びシヨウジョウバエSchneider - 2細胞、並びにトリコプルシア・ニ (Trichoplusia ni) に由来するHIGH FIVE0細胞系 (Invitrogen) を包含する (アメリカ特許第5,300,435号)。

40

【0167】

市販の血清フリー培地は、細胞の増殖及び維持のために使用され得る。適切な培地は、Sf9細胞に関しては、Sf900II™ (Life Technologies) 又はESF921™ (Expression Systems) ; 及びトリコプルシア・ニ細胞に関しては、Ex - cell10405™ (JRH Biosciences, Lenexa, KS) 又はExpress Five0™ (Life Technologies) を包含する。組換えウィルスが使用される場合、細胞は典型的には、組換えウィルスストックが0.1~10、より典型的には、約3

50

の感染の多重度 (MOI) で添加される地点で、約 $2 \sim 5 \times 10^5$ 個の細胞 $1 \sim 2 \times 10^6$ 個の細胞の接種密度で触媒される。

【 0 1 6 8 】

バキュロウイルスでの組換えタンパク質を生成するための確立された技法は、Bailey など., “Manipulation of Baculovirus Vectors”, in *Methods in Molecular Biology*, Volume 7: Gene Transfer and Expression Protocols, Murray (ed.), P. 147-168 (The Humana Press, (nc. 1991) により、Patel など., “The buculovirus expression system”, in *DNA Cloing2: Expression Systems*, 2nd Edition, Glover など., (eds.) p.205-244 (Oxford University Press 1995) により、Ausubel (1995) p.16-37 ~ 16-57により、Richardson (ed.), *Baculovirus Expression Proteocols* (The Humana Press, Inc. 1995) により、及びLucknow, “Insect Cell Expression Technology”, in *Protein Engineering: Principles and Practice*. Cleland など. (eds.), p.183-218 (John Wiley & Sons, Inc. 1996) により提供される。

10

【 0 1 6 9 】

菌類細胞、例えば酵母細胞はまた、本明細書に開示される遺伝子を発現するためにも使用され得る。これに関して、特に興味ある酵母種は、サッカロミセス・セレピシアエ (*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。酵母における発現のための適切なプロモーターは、GAL1 (ガラクトース)、PGK (ホスホグリセリンキナーゼ)、ADH (アルコールデヒドロゲナーゼ)、AOX1 (アルコールオキシダーゼ)、HIS4 (ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ) 及び同様のものからのプロモーターを包含する。

20

【 0 1 7 0 】

外因性DNAによりS. セレピ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。

【 0 1 7 1 】

サッカロミセス・セレピ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。

30

【 0 1 7 2 】

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 guillermoidii*)、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。

40

【 0 1 7 3 】

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5,162,2

50

28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。

【0174】

例えば、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、Raymond, アメリカ特許第5,716,808号、Raymond, アメリカ特許第5,736,383号、Raymondなど., Yeast 14: 11-23 (1998)、及びWIPO公開WO97/17450, WO97/17451、WO98/02536及びWO98/02565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 (AUG 1 又はAUG 2) のものであることが好ましい。

10

【0175】

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。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 - 5 - アミノイミダゾールカルボキシルーゼ (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 (AUG 1 及びAUG 2) が欠失されている宿主細胞を使用することが好ましい。

20

【0176】

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 (PEP 4 及びPRB 1) 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。

【0177】

発現ベクターはまた、植物プロトプラスト、損なわれていない植物組織又は単離された植物細胞中にも導入され得る。植物組織中に発現ベクターを導入するための方法は、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens)、マイクロプロジェクティル - 介在性供給、DNA注射、エレクトロポレーション及び同様のものによる植物組織の直接的な感染又はそれらと共にs植物細胞の同時培養を包含する。例えば、Horschなど., Science 227: 1229 (1995)、Kleinなど., Biotechnology 10: 268 (1992) 及びMikiなど., "Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants", in Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Glick など. (eds.), P.67-88 (CRC Press, 1993) を参照のこと。

30

【0178】

他方では、Zcytor 14遺伝子は、原核宿主細胞において発現され得る。原核細胞においてZcytor 14ポリペプチドを発現するために使用され得る適切なプロモーターは、当業者に良く知られており、そしてT4, T3, Sp6及びT7ポリメラーゼを認識できるプロモーター、バクテリオファージ のP_R及びP_Lプロモーター、E.コリのtrp, recA, 熱ショック、lacUV5, tac, lpp-lacSpr, phoA及びlacZプロモーター、B.スプチリスのプロモーター、バチルス のバクテリオファージのプロモーター、ストレプトミセスプロモーター、バクテリオファージ のintプロモーター、pBR322のblaプロモーター及びクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子のCATプロモーターを包含する。原核プロモーターは、Glick, J. Ind. Microbiol. 1: 277 (1987), Watsonなど., molecular Biology of the Gene, 4th Ed. (Benjamin Cummins 1987), 及びAusubelなど. (1995) により再考されている。

40

【0179】

50

例示的な原核宿主は、E. コリ及びバチルス・スプチリス (*Bacillus subtilis*) を包含する。E. コリの適切な株は、BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLysS, BL21 (DE3)pLysE, DH1, DH4, DH5, DH51, DH51F, DH51MCR, DH 10B, DH10B/p3, DH11S, C600, HB101, JM101, JM105, JM109, JM110, K38, RR1, Y1088, Y1089, CSH18, ER1451及びER1647を包含する(例えば、Brown (ed.), *Molecular Biology Labfax* (Academic Press 1991) を参照のこと)。バチルス・スプチリスの適切な株は、BR151、YB886、MI119、MI120及びBI70を包含する(例えば、Hardy, “*Bacillus Cloning Methods*”, in *DNA Cloning: A Practical Approach*, Clover (ed.) (IRL Press 1985) を参照のこと)。

【0180】

細菌、例えばE. コリにおいてZcytor 14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。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。

10

【0181】

原核宿主においてタンパク質を発現するための方法は、当業者に良く知られている(例えば、Williamsなど., “*Expression of foreign protein in E. coli using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies*” in *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2nd Edition, Glover など. (eds.), P.15 (Oxford University Press 1995), Ward など., “*Genetic Manipulation and Expression of Antibodies*” in *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, p. 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995), 及びGeorgiou, “*Expression of Proteins in Bacteria*”, in *Protein Engineering: Principles and Practice*; Cleland など. (eds.), p101 (John Wiley & Sons, Inc. 1996) を参照のこと)。

20

【0182】

細菌、酵母、昆虫及び植物細胞中に発現ベクターを導入するための標準方法は、Ausubel (1995) により提供される。哺乳類細胞系により生成される外来性タンパク質を発現し、そして回収するための一般的方法は、例えばEtcheverry, “*Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture*” in *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland など. (eds.), p163 (Wiley-Liss, Inc. 1996) により提供される。細菌系により生成されるタンパク質を回収するための標準技法は、例えばGrisshammer など., “*Purification of Over-Produced proteins from E. coli cells*” in *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2nd Edition, Glover など. (eds.), p.59-92 (Oxford University Press 1995) により提供される。

30

40

【0183】

バキュロウイルス系から組換えタンパク質を単離するための確立された方法は、Richardson (ed.), *Baculovirus Expression Protocols* (The Humana Press, Inc. 1995) により記載される。

【0184】

他方では、本発明のポリペプチドは、独占的固相合成、部分固相方法、フラグメント縮合又は従来溶液合成により合成され得る。それらの合成方法は、当業者に良く知られている(例えば、Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149 (1963), Stewart et al., “*Solid Phase Peptide Synthesis*” (2nd Edition), (Pierce Chemical Co. 1984), Bayer and Rapp, *Chem. Pept.* 3.3 (1986). Atherton など., *Solid Phase Peptide Synthesis: A*

50

Practical Approach (IRL Press 1989). Fields and Colowick, "Solid-Phase Peptide Synthesis." Methods in Enzymology Volume 289 (Academic Press 1997), 及び Lloyd-Williams など., Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins (CRC Press, Inc. 1997)を参照のこと)。

【0185】

全体的な化学合成方法、例えば“生来の化学的連結”及び“発現されたタンパク質連結”における変動性もまた標準である(例えば、Dawsonなど., Science 266: 776 (1994), Hockengなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA94: 7845 (1997), Dawson, Methods Enzymol. 287: 34 (1997), Muir など., proc. Natl. Acad. Sci. USA95: 6705 (1998), 及び Severinov and Muir, J. Biol. Chem. 273: 16205 (1998)を参照のこと)。

10

【0186】

本発明のペプチド及びポリペプチドは、配列番号2, 5, 10, 11又は12の少なくとも6個、少なくとも9個又は少なくとも15個の連続したアミノ酸残基を含んで成る。例えば、本発明は、次ぎのアミノ酸配列の15個の連続したアミノ酸を含んで成るか、又はそれらから成るポリペプチドを包含する：配列番号2のアミノ酸配列のアミノ酸残基21 - 452、配列番号10のアミノ酸配列のアミノ酸残基21 - 435、配列番号2のアミノ酸配列のアミノ酸残基474 - 677、又は配列番号10のアミノ酸配列のアミノ酸残基457 - 673。

【0187】

本発明の1つの態様においては、ポリペプチドは、それらのアミノ酸配列の20個, 30個, 40個, 50個, 100個又はそれ以上の連続した残基を含んで成る。例示のように、本発明は、次のアミノ酸配列の30又は40個の連続したアミノ酸を含んで成るか、又はそれらから成るポリペプチドを包含する：配列番号2のアミノ酸配列のアミノ酸残基21 - 452、配列番号10のアミノ酸配列のアミノ酸残基21 - 435、配列番号2のアミノ酸配列のアミノ酸残基474 - 677、又は配列番号10のアミノ酸配列のアミノ酸残基457 - 673。そのようなペプチド及びポリペプチドをコードする核酸分子は、ポリメラーゼ鎖反応プライマー及びプローブとして有用である。

20

【0188】

7. Zcytor 14融合タンパク質及び接合体の生成：

1つの一般的な種類のZcytor 14類似体は、本明細書に開示されるアミノ酸配列の突然変異であるアミノ酸配列を有する変異体である。もう1つの一般的種類のZcytor 14類似体は、下記のように、抗-イディオタイプ抗体及びそのフラグメントにより供給される。さらに、抗-イディオタイプの可変ドメインを含んで成る組換え抗体が、類似体として使用され得る(例えば、Monfardiniなど., proc. Assoc. Am. Physicians 108: 420 (1996)を参照のこと)。

30

【0189】

抗-イディオタイプZcytor 14抗体の可変ドメインはZcytor 14を模倣するので、それらのドメインは、Zcytor 14結合活性を提供することができる。、抗-イディオタイプ触媒性抗体を生成するための方法は、当業者に知られている(例えば、Joronなど., Ann. N. Y. Acad. Sci. 672:216(1992), Fribouletなど., Appl. Biochem. Biotechnol. 47:229(1994), 及びAvalleなど., Ann. N. Y. Acad. Sci. 864:118(1998)を参照のこと)。

40

【0190】

Zcytor 14類似体を同定するもう1つのアプローチは、結合ライブラリーの使用により提供される。ファージ表示及び他の結合ライブラリーを構成し、そしてスクリーニングする方法は、例えばKayなど., Phage Display of Peptide and Proteins (Academic Press 1996), Verdine, アメリカ特許第5,783,384号、Kay, など., アメリカ特許第5,747,334号及びKauffmanなど., アメリカ特許第5,723,323号号により提供される。

Zcytor 14ポリペプチドは、インピボ及びインピトロの両者において使用される。例示として、Zcytor 14の可溶形が、培養された細胞により生成されるZcytor 14リガンドの効果を阻害するために、細胞培養培地に添加され得る。

【0191】

50

Zcytor 14の融合タンパク質は、組換え宿主においてZcytor 14を発現するために、そして発現されたZcytor 14を単離するために使用され得る。下記に記載されるように、特定のZcytor 14融合タンパク質はまた、診断及び治療にも使用される。1つのタイプの融合タンパク質は、組換え宿主細胞からのZcytor 14ポリペプチドを案内するペプチドを含んで成る。Zcytor 14ポリペプチドを、真核細胞の分泌経路中に方向づけるためには、分泌シグナル配列（また、シグナルペプチド、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、Zcytor 14発現ベクターに供給される。分泌シグナル配列はZcytor 14に由来するが、適切なシグナル配列はまた、もう1つの分泌されたタンパク質から誘導されるか、又は新たに合成され得る。

【0192】

分泌シグナル配列は、Zcytor 14 - コード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ヌクレオチド配列の5'側に位置するが、但し一定の分泌シグナル配列は、興味あるヌクレオチド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）。

【0193】

Zcytor 14又は哺乳類細胞により生成されるもう1つのタンパク質（例えば、アメリカ特許第5,641,655号に記載されるような組織タイプのプラスミノーゲン活性化因子シグナル配列）は、組換え哺乳類宿主におけるZcytor 14の発現のために有用であるが、酵母シグナル配列は、酵母細胞における発現のために有用である。適切な酵母シグナル配列の例は、酵母対合現象 - 因子（MF 1 遺伝子によりコードされる）、インバーターゼ（SUC2遺伝子によりコードされる）又は酸性ホスファターゼ（PHO遺伝子によりコードされる）に由来するそれらのものである。例えば、Romanos など., “Expression of Cloned Genes in Yeast” in DNA Cloning 2: A Practical Approach, 2nd Edition, Glover and Hames (eds.), p.123-167 (Oxford University Press 1995) を参照のこと。

【0194】

細菌細胞においては、毒性を低め、安定性を高め、そして発現されたタンパク質の回収性を高めるために、異種タンパク質を融合タンパク質として発現することが、しばしば所望される。例えばZcytor 14は、グルタチオンS - トランスフェラーゼポリペプチドを含んで成る融合タンパク質として発現され得る。グルタチオンS - トランスフェラーゼ融合タンパク質は、典型的には、可溶性であり、そして固定されたグルタチオンカラム上でE. コリ融解物から容易に精製できる。類似するアプローチにおいては、マルトース結合タンパク質ポリペプチドを含んで成るZcytor 14融合タンパク質は、アミロース樹脂カラムにより単離され得、そして切断されたタンパク質A遺伝子のC - 末端を含んで成る融合タンパク質は、IgG - セファロースを用いて精製され得る。

【0195】

細菌細胞において異種ポリペプチドを、融合タンパク質として発現するために確立された技法は、Williamsなど., “Expression of Foreign Proteins in E. coli Using Plasmid Vectors and Purification of Specific Polyclonal Antibodies”, in DNA Cloning 2: A Practical Approach, 2nd Edition, Glover and Hames (Eds.), p.15-58 (Oxford University Press 1995) により記載される。さらに、市販の発現システムが利用できる。例えば、PINPOINT Xaタンパク質精製システム（Promega Corporation, Madison, WI）は、アビジンを含んで成る樹脂により、発現の間、ビオチニル化されるポリペプチドを含んで成る融合タンパク質を単離するための方法を提供する。

【0196】

原核又は真核細胞により発現される異種ポリペプチドを単離するために有用であるペプチド標識は、ポリヒスチジン標識（ニッケル - キレート樹脂に対する親和性を有する）、c-myc標識、カルモジュリン結合タンパク質（カルモジュリン親和性クロマトグラフィー

10

20

30

40

50

により単離される)、物質P、RYIRS 標識(抗-RYIRS抗体と結合する)、Gln-Gln標識及びFLAG標識(抗-FLG抗体と結合する)を包含する。例えば、Luoなど., *Srch. Biochem. Biophys.* 329: 215 (1996), Morganti など., *Biotechnol. Appl. Biochem.* 23: 67 (1996), 及びZhengなど., *Gene* 186: 55 (1997)を参照のこと。そのようなペプチド標識コードする核酸分子は、例えばSigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO) から入手できる。

【0197】

本発明はまた、分泌経路中に他のポリペプチドを方向づけるために本発明のZcytor 14ポリペプチドに含まれる分泌シグナル配列の使用を企画する。配列番号2のアミノ酸残基1~20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おり、そして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るシグナル融合ポリペプチドが製造され得る。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、分泌路中に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。

10

【0198】

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、例えば受容体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。後者に関して、典型的なポリペプチドは、医薬的活性の分子、例えば第VIIa因子、プロインスリン、インスリン、卵胞刺激ホルモン、組織タイプのプラスミノゲン活性化因子、腫瘍壊死因子、インターロイキン(例えば、インターロイキン-(IL-1)~IL-18)、コロニー刺激因子(例えば、顆粒球-コロニー刺激因子(G-CSF)及び顆粒球マクロファージ-コロニー刺激因子(GM-CSF))、インターフェロン(例えば、インターフェロン-、-、-、-、-及び-)、幹細胞増殖因子、例えば“SI因子”、エリトロポエチン及びトロンボポエチンを包含する。

20

【0199】

本発明の融合ポリペプチドに含まれるZcytor 14分泌シグナル配列は好ましくは、追加のペプチドを分泌経路中に方向づけるために、その追加のペプチドにアミノ末端融合される。Zcytor 14分泌シグナル配列を含んで成る融合タンパク質は、標準の技法を用いて構成され得る。

30

【0200】

もう1つの形の融合タンパク質は、Zcytor 14ポリペプチド、及び2又は3個の複領域ドメイン及びヒンジ領域を含むが、しかし可変領域を欠いている免疫グロブリンH鎖不変領域、典型的なFcフラグメントを含んで成る。例示のように、Chang など., (アメリカ特許第5,723,125号)は、ヒトインターフェロン及びヒト免疫グロブリンFcフラグメントを含んで成る融合タンパク質を記載する。インターフェロンのC-末端は、ペプチドリンカー成分によりFcフラグメントのN-末端に連結される。ペプチドリンカーの例は、免疫学的に不活性であるT細胞不活性配列を主に含んで成るペプチドである。典型的なペプチドリンカーは、アミノ酸配列:GGSGG SGGG S(配列番号7)を有する。

40

【0201】

融合タンパク質においては、好ましいFc成分は、溶液において安定性であり、そして活性を活性化する補体をほとんど有さないか又は完全に有さないヒト鎖である。従って、本発明はZcytor 14成分及びヒトFcフラグメントを含んで成るZcytor 14融合タンパク質を企画し、ここで前記Zcytor 14成分のC-末端は、ペプチドリンカー、例えば配列番号7のアミノ酸配列から成るペプチドを通してFcフラグメントのN-末端に結合される。Zcytor 14成分は、Zcytor 14分子又はそのフラグメントであり得る。例えば、融合タンパク質は、細胞外ドメイン(例えば、可溶性Zcytor 14受容体)を含むZcytor 14のフラグメント及びFcフラグメント(例えば、ヒトFcフラグメント)を含んで成る。

【0202】

50

もう一つの態様においては、Zcytor 14融合タンパク質は、IgG配列、IgG Zcytor 14のアミノ酸末端に共有結合されるZcytor 14成分、及びZcytor 14のアミノ酸末端に共有結合されるシグナルペプチドを含んで成り、ここで前記IgG配列は、次の順序での次の要素から成る：CH₂ドメイン及びCH₃ドメイン。従って、IgG配列はCH₁ドメインを欠いている。Zcytor 14成分は、本明細書に記載されるように、Zcytor 14活性、例えばZcytor 14リガンドと結合する能力を示す。抗体及び非抗体部分の両者を含んで成る融合タンパク質を生成するこの一般的なアプローチは、LaRocheなど、ヨーロッパ特許第742830号（WO95/21258号）により記載されている。

【0203】

Zcytor 14成分及びFc成分を含んで成る融合タンパク質は、インビトロアッセイ手段として使用され得る。例えば生物学的サンプルにおけるZcytor 14リガンドの存在は、Zcytor 14-免疫グロブリン融合タンパク質を用いて検出され得、ここでZcytor 14成分は、前記リガンド、及び高分子、例えばタンパク質A又は抗-Fc抗体を結合するために使用され、すなわち固体支持体に融合タンパク質を結合するために使用される。さらに、そのようなシステムは、Zcytor 14リガンドのその受容体への結合を妨害するアゴニスト及びアンタゴニストを同定するために使用され得る。

10

【0204】

抗体融合タンパク質の他の例は、抗原-結合ドメイン、及びZcytor 14細胞外ドメインを含むZcytor 14フラグメントを含んで成るポリペプチドを包含する。そのような分子は、Zcytor 14結合活性の有益性のための特定の組織を標的化するために使用され得る。

20

【0205】

本発明はさらに、種々の他のポリペプチド融合体を提供する。例えば、生物学的機能を付与するドメインの一部又はすべては、サイトカイン受容体ファミリーの他のメンバーからの機能的に同等のドメインにより本発明のZcytor 14間で置換され得る。ポリペプチド融合体は、Zcytor 14融合類似体を生成するために、組換え宿主細胞において発現され得る。Zcytor 14ポリペプチドは、複数の成分又はドメイン、例えば精製の親和性標識及び標的化ドメインに融合され得る。ポリペプチド融合体はまた、特にドメイン間での1又は複数の切断部位を含むことができる。例えば、Tuanなど、Connective Tissue Research 34; 1(1996)を参照のこと。

【0206】

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。融合タンパク質の酵素的及び化学分解のための一般的な方法は、例えばAusubel (1995)、p. 16-19~16-25により記載される。

30

【0207】

Zcytor 14ポリペプチドは、Zcytor 14リガンドを同定し、そして単離するために使用される得る。Zcytor 14細胞外ドメイン（例えば、配列番号2のアミノ酸残基1-425、又は21-452）及び可溶性Zcytor 14受容体の他の形が、特にそれらの方法のために有用である。例えば、本発明のタンパク質及びペプチドが、カラム上に固定され、そしてカラム上で作動する生物学的サンプルからのリガンドを結合するために使用され得る（Hermansonなど、(eds.), Immobilized Affinity Ligand Techniques, P. 195-202 (Academic Press 1992)）。

40

【0208】

受容体リガンドとして、Zcytor 14ポリペプチドの活性が、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、珪素に基づくバイオセンサーの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 Devices, Sunnyvale, CAにより製造されるCytosensorTM マイクロフィジオメーターである。種々の細胞応答、例えば細胞増殖、イオン輸送、エネルギー生成、炎症応答、調節

50

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。

【0209】

例えば、McConnell, H.M.など., *Science* 257: 1906-1912, 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。さらに、マイクロフィジオメーターは、付着性又は非付着性真核又は原核細胞をアッセイするために使用され得る。時間にわたっての細胞培地における細胞外酸性化変化を測定することによって、マイクロフィジオメーターは、種々の刺激に対する細胞応答、例えば Zcytor 14のアゴニスト、リガンド又はアンタゴニストを直接的に測定する。

【0210】

マイクロフィジオメーターは、Zcytor 14ポリペプチドを発現しない対照の真核宿主に比較して、Zcytor 14 - 発現真核細胞の応答を測定するために使用され得る。Zcytor 14 - 調節刺激に対して応答性の適切な細胞は、Zcytor 14発現バクターを含んで成る組換え宿主細胞、及び天然においてZcytor 14を発現する細胞を包含する。細胞外酸性化は、Zcytor 14 - 調節された細胞応答についての1つの測定を提供する。

【0211】

さらに、このアプローチは、Zcytor 14リガンド、そのアゴニスト及びアンタゴニストを同定するために使用され得る。例えば、分子は、Zcytor 14ポリペプチドを発現する細胞を供給し、前記細胞の第1部分を、試験化合物の不在下で培養し、前記細胞の第2部分を、試験化合物の存在下で培養し、そして前記第1部分と比較して、前記第2部分が細胞応答を示すかどうかを決定することによって、Zcytor 14リガンドのアゴニストとして同定され得る。

【0212】

他方では、固相システムが、Zcytor 14リガンド、Zcytor 14リガンドのアゴニスト又はアンタゴニストを同定するために使用され得る。例えば、Zcytor 14ポリペプチド又はZcytor 14融合タンパク質が、市販のバイオセンサー装置の受容体チップの表面上に固定され得る (BLACORE, Biacore AB; uppsala, Sweden)。この装置の使用は、例えばkarlsson, *Immunol. Methods* 145:229 (1991)、及びCunningham and Wells, *J. Mol. Biol.* 234:554 (1993) により開示される。

【0213】

手短には、Zcytor 14ポリペプチド又は融合タンパク質は、流動細胞内の金フィルムに結合されるデキストラン繊維に、アミン又はスルフヒドリル化学を用いて、共有結合される。次に、試験サンプルが、細胞を通して通される。リガンドがサンプルに存在する場合、それは固定されたポリペプチド又は融合タンパク質に結合し、培地の屈折率の変化を引き起こし、これが金フィルムの表面プラズモン共鳴の変化として検出される。このシステムは、結合親和性が計算され得るオン - 及びオフ - 速度の測定、及び結合の化学量論の評価を可能にする。このシステムはまた、抗体 - 抗原相互作用、及び他の補体/抗 - 補体対の相互作用を試験するためにも使用され得る。

【0214】

Zcytor 14結合ドメインはさらに、Zcytor 14リガンドアゴニストの推定上の接触部位アミノ酸の突然変異に関連して、核磁気共鳴、結晶学、電子回折又は光親和性ラベリングのような技法により決定されるように、耕造体の物理的分析により特徴づけられ得る。例えば、de Vosなど., *Science* 255:306 (1992), Smithなど., *J. Mol. Biol.* 224:899 (1992), 及びWlodaverなど., *FEBS Lett.* 309: 59 (1992) を参照のこと。

【0215】

本発明はまた、Zcytor 14ポリペプチドがポリマーにより連結される、化学的に修飾されたZcytor 14組成物を企画する。例示的なZcytor 14ポリペプチドは、機能的なトランスメンブランドメインを欠いている可溶性ポリペプチドである。典型的には、前記ポリマーは、Zcytor 14結合体が水性環境、例えば生理学的環境において沈殿しないよう水溶性である。適切なポリマーの例は、単一の反応基、例えばアシル化のための活性エステル、又は

10

20

30

40

50

アルキル化のためのアルデヒドを有する修飾されている1つのポリマーである。

【0216】

この場合、重合化の程度は調節され得る。反応性アルデヒドの例は、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド、又はモノ-($C_1 - C_{10}$)アルコキシ、又はそれらのアリールオキシ誘導体である(例えば、Harrisなど., アメリカ特許第5,252,714号を参照のこと)。ポリマーは枝分かれ鎖であっても、又は枝分かれ鎖でなくても良い。さらに、ポリマーの混合物がZcytor 14接合体を生成するために使用され得る。

【0217】

治療のために使用され得るZcytor 14接合体は、医薬的に許容できる水溶性ポリマー成分を含むことができる。適切な水溶性ポリマーは、ポリエチレングリコール(PEG)、モノメトキシ-PEG、モノ-($C_1 - C_{10}$)アルコキシ-PEG、アリールオキシ-PEG、ポリ-(N-ビニルピロリドン)PEG、トレスルモノメトキシPEG、PEGプロピオンアルデヒド、ビス-スクシンイミジルカーボネートPEG、プロピレングリコールホモポリマー、酸化ポリプロピレン/酸化エチレンコポリマー、ポリオキシエチル化されたポリオール(例えば、グリセロール)、ポリビニルアルコール、デキストラン、セルロース又は他の炭水化物基材のポリマーを包含する。適切なPEGは、約600~約60,000、例えば5,000、12,000及び25,000の分子量を有することができる。Zcytor 14接合体はまた、そのような水溶性ポリマーの混合物も含むことができる。

【0218】

Zcytor 14接合体の1つの例は、Zcytor 14成分、及びZcytor 14成分のN-末端に結合される酸化ポリアルキル成分を含んで成る。PEGは、1つの適切な酸化ポリアルキルである。例示として、Zcytor 14は、PEG、すなわち“PEG化”として知られている方法により修飾され得る。Zcytor 14のPEG化は、当業界において知られているPEG化反応のいずれかにより行われ得る(例えば、ヨーロッパ特許第0154316号、Delgadoなど., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9: 249 (1992), Duncan and Spreafico, Clin. Pharmacokinetics 27: 290 (1994) 及びFrancis など., Int. J. Hematol. 68: 1 (1998) を参照のこと)。

【0219】

例えば、PEG化は反応性ポリエチレングリコール分子によるアシル化反応又はアルキル化反応により行われ得る。他のアプローチにおいては、Zcytor 14接合体は、PEGの末端ヒドロキシ又はアミノ基が活性化されたリンカーにより置換されている活性化されたPEGを縮合することによって形成される(例えば、Karasiewiczなど., アメリカ特許第5,382,657号を参照のこと)。

【0220】

アシル化によるPEG化は典型的には、Zcytor 14ポリペプチドとPEGの活性エステル誘導体との反応を必要とする。活性化されたPEGエステルの例は、N-ヒドロキシスクシンイミドにエステル化されたPEGである。本明細書において使用される場合、用語“アシル化”とは、Zcytor 14と水溶性ポリマー間のタイプの結合を包含する：アミド、カルバメート、ウレタン及び同様のもの。

【0221】

アシル化によるPEG化されたZcytor 14の調製方法は、典型的には、(a) Zcytor 14ポリペプチドとPEG(例えば、PEGのアルデヒド誘導体の反応性エステル)とを、1又は複数のPEG基がZcytor 14に結合する条件下で反応せしめ、そして(b)その反応生成物を得る段階を含んで成る。一般的に、アシル化反応のための最適な反応条件は、既知のパラメーター及び所望する結果に基づいて決定されるであろう。例えば、PEG:Zcytor 14の比が高いほど、ポリPEG化されたZcytor 14生成物の%が高くなる。

【0222】

アシル化によるPEG化の生成物は典型的には、リシン - アミノ基がアシル結合を通してPEG化されるポリPEG化されたZcytor 14生成物である。典型的には、その得られるZcytor 14は、少なくとも95%、モノ-、ジ-又はトリ-ペルギレートされるが、但し高い程度

10

20

30

40

50

EG化を有するいくつかの種は、その反応条件に依存して形成され得る。PEG化された種は、標準の精製方法、例えば透析、限外濾過、イオン交換クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー及び同様のものを用いて、接合されていないZcytor 14ポリペプチドから分離され得る。

アルキル化によるPEG化は一般的に、還元剤の存在下で、Zcytor 14と、PEGの末端アルデヒド誘導体との反応を包含する。PEG基は好ましくは、 $-CH_2-NH$ 基を通してポリペプチドに結合される。

【0223】

モノPEG化された生成物を生成するためへの還元性アルキル化を通しての誘導体化は、誘導体化のために利用できる異なったタイプの第1アミノ基の示差反応性を利用する。典型的には、前記反応は、リシン残基の α -アミノ基とタンパク質のN-末端残基の ϵ -アミノ基との間のpKa差異の利用を可能にするpHで行われる。そのような選択的誘導体化により、反応性基、例えばアルデヒドを含む水溶性ポリマーのタンパク質への結合が調節される。ポリマーとの接合は、他の反応性基、例えばリシン側鎖アミノ基の有意な修飾を伴わないで、タンパク質のN-末端で優先的に生じる。本発明は、Zcytor 14モノポリマー接合体の実質的な調製物を提供する。

10

【0224】

モノポリマー-Zcytor 14接合体分子の実質的に均質な集団を生成するための還元性アルキル化は、(a) Zcytor 14のアミノ末端での ϵ -アミノ基選択的修飾を可能にするために適切なpHでの還元性アルキル化条件下で反応性PEGとZcytor 14ポリペプチドとを反応せしめ、そして(b) 反応生成物を得る段階を含んで成る。還元性アルキル化のために使用される還元剤は、水溶液において安定性であり、そして好ましくは、還元性アルキル化の初期工程において形成されるSchiff塩基のみを還元できるべきである。好ましくは還元剤は、硼水素化ナトリウム、シアノ硼水素化ナトリウム、ジメチルアミンボラン、トリメチルアミンボラン及びピリジンボランを包含する。

20

【0225】

モノポリマー-Zcytor 14接合体の実質的に均質な集団に関しては、還元性アルキル化反応条件は、Zcytor 14のN-末端への水溶性ポリマーの成分の結合を可能にするそれらの条件である。そのような反応条件に、N-末端での ϵ -アミノ基とリシンアミノ基との間のpKa差異を提供する。pHはまた、使用されるポリマー：タンパク質の比にも影響を及ぼす。一般的に、pHが低い場合、タンパク質よりも過剰量のポリマーが、N-末端 ϵ -基が反応性であるほど、より多くのポリマーが最適な条件を達成するために、必要とされるので、所望される。pHが高い場合、ポリマー：Zcytor 14は、より多くの反応性基が利用できるため、高くある必要はない。典型的には、pHは、3~9又は3~6の範囲内であろう。

30

【0226】

考慮すべきもう1つの因子は、水溶性ポリマーの分子量である。一般的に、ポリマーの分子量が高いほど、より少数のポリマー分子がタンパク質に結合され得る。PEG化反応に関しては、典型的な分量は、約2kDa~約100kDa、約5kDa~約50kDa又は約12kDa~約25kDaである。水溶性ポリマー：Zcytor 14のモル比は、一般的に、1：1~100：1の範囲であろう。典型的には、水溶性ポリマー：Zcytor 14のモル比は、ポリPEG化に関して、1：1~20：1であり、そしてモノPEG化に関しては、1：1~5：1であろう。

40

【0227】

ポリペプチド及び水溶性ポリマー成分を含んで成る接合体を生成するための一般的な方法は当業界において知られている。例えば、Karasiewiczなど、アメリカ特許第5,382,657号、Greewaldなど、アメリカ特許第5,738,846号、Nieforthなど、Clin. Pharmacol. Ther. 59: 636 (1996)、Monkarsh など、Anal. Biochem. 247: 434 (1997) を参照のこと。

本発明は、本明細書に記載されるペプチド又はポリペプチドを含んで成る組成物を企画する。そのような組成物はさらに、キャリアーを含むことができる。前記キャリアーは、従来の有機又は無機キャリアーであり得る。キャリアーの例は、水、緩衝液、アルコール、

50

ポリエチレングリコール、マクロゲル、ゴマ油、トウモロコシ油及び同様のものを包含する。

【0228】

8. Zcytor 14ポリペプチドの単離：

本発明のポリペプチドは、汚染性高分子、特に他のタンパク質及び核酸に対して、少なくとも約80%の純度、少なくとも約90%の純度、少なくとも約95%の純度、又は95%以上の純度に精製することが好ましく、そして感染性及び発熱性剤を有さない。本発明のポリペプチドはまた、99.9%以上の純度である医薬的に純粋な状態に精製され得る。特定の製剤においては、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。

10

【0229】

分別及び/又は従来精製方法は、天然源（例えば、前立腺又は甲状腺組織）から精製されたZcytor 14、合成Zcytor 14ポリペプチド、及び組換え宿主細胞から精製された組換えZcytor 14ポリペプチド及び融合Zcytor 14ポリペプチドの調製物を得るために使用される。一般的に、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。

【0230】

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。

20

【0231】

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。ポリペプチド単離及び精製の特定方法の選択は、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: Principles & Methods, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden, 1988、及びDoonan, Protein Purification Protocols (The Humana Press 1996)を参照のこと。

30

【0232】

Zcytor 14単離及び精製における追加の変動は、当業者により調節され得る。例えば、下記のようにして得られる抗 - Zcytor 14抗体は、免疫親和性精製により多量のタンパク質を単離するために使用され得る。

40

【0233】

本発明のポリペプチドは、アニオン及びカチオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除、及び親和性クロマトグラフィーを包含する方法の組み合わせより単離され得る。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。手短かに言及すれば、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)。

50

【0234】

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。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を包含する (M. Deutscher, (ed.), *Methods Enzymol.* 182, 529(1990))。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 - 結合タンパク質、FLAG標識、Glu-Gku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。

【0235】

Zcytor 14ポリペプチド又はそのフラグメントはまた、下記のようにして、化学合成を通して調製され得る。Zcytor 14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；PEG化されても、又はPEG化されなくても良く；そして初期メチオニンアミノ酸残基を含むことができるか、又は含まなくても良い。

【0236】

9. Zcytor 14タンパク質に対する抗体の生成：

Zcytor 14に対する抗体は、例えば抗原として、Zcytor 14発現ベクターの生成物又は天然源から単離されたZcytor 14を用いて得られる。特に有用な抗-Zcytor 14抗体は、Zcytor 14を、“特異的に結合する”。抗体は、その抗体が次の2つの性質の少なくとも1つを示す場合、特異的に結合すると思われる：(1) 抗体が限界レベルの結合活性を伴って、Zcytor 14に結合し、そして(2) 抗体がZcytor 14に関連するポリペプチドと有意に交差反応しない場合。

【0237】

第1の特徴に関しては、抗体は、それらが、 $10^6 M^{-1}$ 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) を伴って、Zcytor 14ポリペプチド、ペプチド又はエピトープに結合する場合、特異的に結合する。抗体の結合親和性は、Scatchard 分析 (Scatchard, *Ann. NY Acad. Sci.* 51: 660 (1949)) により、当業者により容易に決定され得る。第2の特徴に関しては、抗体は、それらが、標準のウェスタンブロット分析を用いて、Zcytor 14を検出するが、しかし現在知られているポリペプチドを検出しない場合、関連するポリペプチドと有意に交差反応しない。既知の関連するポリペプチドの例は、既知のサイトカイン受容体である。

【0238】

抗-Zcytor 14抗体は、抗原性Zcytor 14エピトープ - 担持ペプチドを用いて生成され得る。本発明の抗原性エピトープ - 担持ペプチド及びポリペプチドは、配列番号2内に含まれる、少なくとも9個、又は15~約30個のアミノ酸の配列、又は本明細書に開示されるもう1つのアミノ酸配列を含む。しかしながら、30~50個のアミノ酸、又は本発明のポリペプチドの全アミノ酸配列までのいずれかの長さのアミノ酸を含む、本発明のアミノ酸配列の大きな部分を含んで成るペプチド又はポリペプチドはまた、Zcytor 14と結合する抗体を誘発するためにも有用である。所望には、エピトープ担持ペプチドのアミノ酸配列は、水性溶媒において実質的な溶解性を提供するように選択される (すなわち、前記配列は、比較的親水性の残基を包含し、そして疎水性残基は好ましくは、回避される)。さらに、プロリン残基を含むアミノ酸配列がまた、抗体生成のために所望される。

【0239】

例示のように、Zcytor 14における可能性ある抗原性部位が、LASERGENE (DNASTAR; Madison, WI) のPROTEANプログラム (バージョン3.14) により実効されるように、Jameson-Wolf method, Jameson and Wolf, *CABIOS* 4: 181, (1988) を用いて、同定された。デフォルトパラメーター (default parameter) が、この分析に使用された。

【0240】

10

20

30

40

50

Jameson - Wolf方法は、タンパク質構造予測のために6種の主要サブドメインを組合すことによつて、可能性ある抗原決定基を予測する。手短には、Hopp - Woods方法、Hoppなど、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 3924 (1981) が最初に、最大の局部親水性の領域を表すアミノ酸配列を同定するために使用された(パラメーター: 平均7個の残基)。第2段階においては、Emini方法、Eminiなど、J. Virolgy 55: 836 (1985) が、表面確立を計算するために使用された(パラメーター: 表面決定限界値(0.6) = 1)。第3に、Karplus - Schultz方法、Karplus and Schultz, Naturwissenschaften 72: 212 (1985) が、主鎖柔軟性を予測するために使用された(パラメーター: 柔軟性限界値(0.2) = 1)。

【0241】

分析の第4及び第5段階においては、二次構造の予測が、Chou-Fasmanの方法、Chou, "Prediction of Protein Structural Classes from Amino Acid Composition", in Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation, Fasman (ed.), p.549-586 (1978) を用いて、データに適用された(Chou-Fasman パラメーター: コンホメーション表 = 64タンパク質; 領域限界値 = 105; Grnner-Robsonパラメーター: 及び 決定パラメーター = 0)。

【0242】

第6のサブドメインにおいては、柔軟性パラメーター及び水治療/溶媒接近性因子が、“抗原指数”として呼ばれる表面輪郭値を決定するために組合された。最終的に、ピーク拡大機能が、抗原指数に適用され、内部領域に対する表面領域の移動度に由来する追加の自由エネルギーを計算するために、それぞれのピーク値の20, 40, 60又は80%を付加することによつて主用表面ピークを拡大する。しかしながら、この計算は、ヘリカル領域がほとんど柔軟性になる傾向がないので、ヘリカル領域に存在するいずれかの主用ピークにも適用されなかった。

【0243】

この分析の結果は、配列番号2の次のアミノ酸配列が適切な抗原性ペプチドを提供することを示した: アミノ酸26 - 33 (“抗原性ペプチド1”)、アミノ酸41-46 (“抗原ペプチド2”)、アミノ酸74 - 81 (“抗原性ペプチド3”)、アミノ酸95 - 105 (“抗原性ペプチド4”)、アミノ酸109 - 119 (“抗原ペプチド5”)、アミノ酸95 - 119 (“抗原性ペプチド6”)、アミノ酸178 - 185 (“抗原ペプチド”)、アミノ酸200 - 206 (“抗原ペプチド8”)及びアミノ酸231 - 238 (“抗原性ペプチド9”)、アミノ酸231 - 241 (“抗原性ペプチド10”)、アミノ酸264 - 270 (“抗原性ペプチド11”)、

【0244】

アミノ酸274 - 281 (“抗原性ペプチド12”)、アミノ酸317 - 324 (“抗原性ペプチド13”)、アミノ酸357 - 363 (“抗原性ペプチド14”)、アミノ酸384 - 392 (“抗原性ペプチド15”)、アミノ酸398 - 411 (“抗原性ペプチド16”)、アミノ酸405 - 411 (“抗原性ペプチド17”)、アミノ酸423 - 429 (“抗原性ペプチド18”)、及びアミノ酸434 - 439 (“抗原性ペプチド19”)。本発明は、Zcytor 14に対する抗体を生成するために抗原性ペプチド1 - 19のいずれか1つの使用を企画する。

本発明はまた、抗原性ペプチド1 - 19の少なくとも1つを含んで成るポリペプチドを企画する。

組換えZcytor 14タンパク質、又は天然源から単離されたZcytor 14に対するポリクローナル抗体は、当業者に良く知られている方法を用いて調製され得る。例えば、Green など、"Production of polyclonal Antisera," in Immunochemical Protocols (Manson, ed.), pages 1-5 (Humana Press 1992), 及びWilliams など、"Expression of foreign proteins in E. coli using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies," in DNA Cloning 2: Expression Systems, 2nd Edition, Glover など、(eds.), page 15 (Oxford University press 1995を参照のこと)。

【0245】

Zcytor 14ポリペプチドの免疫原性は、アジュバント、例えばみょうばん(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を通して高められ得る。免疫

10

20

30

40

50

化のために有用なポリペプチドはまた、融合ポリペプチド、例えばZcytor 14又はその一部と、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、そのような部分は好都合には、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）に結合されるか又は連結され得る。

【0246】

ポリクローナル抗体は典型的には、動物、例えば馬、牛、犬、鶏、ラット、マウス、ウサギ、テンジクネズミ、ヤギ又は羊において生ぜしめられるが、本発明の抗-Zcytor 14抗体はまた、ヒトに近い霊長類抗体から誘導され得る。ヒトにおいて診断的に及び治療的に有用な抗体を生ぜしめるための一般的な技法は、例えばGoldenbergなど、国際特許出願番号WO91/11465号及びLosmanなど、Int. J. Cancer 46: 310, 1990に見出され得る。

10

【0247】

他方では、モノクローナル抗-Zcytor 14抗体が生成され得る。特定抗原に対する嚙歯動物モノクローナル抗体は、当業者に知られている方法により得られる（例えば、Kohlerなど、Nature 256: 495 (1975), Coliga など、(eds.), Current Protocols in Immunology, Vol. 1, page 2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991), Picklesley など、"Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in E. coli," in DNA Cloning 2: Expression Systems, 2nd Edition, Glover など、(eds.), page 93 (Oxford University Press 1995を参照のこと)。

20

【0248】

手短には、モノクローナル抗体は、Zcytor 14遺伝子生成物を含んで成る組成物をマウスに注射し、血清サンプルを除去することにより抗体生成の存在を確かめ、B-リンパ球を得るために脾臓を除去し、ハイブリドーマを生成するために前記リンパ球を骨髄腫細胞により融合し、ハイブリドーマをクローニングし、抗原に対する抗体を生成する陽性クローンを選択し、抗原に対する抗体を生成するクローンを培養し、そしてハイブリドーマ培養物から抗体を単離することに得られる。

【0249】

さらに、本発明の抗-Zcytor 14抗体は、ヒトモノクローナル抗体から誘導され得る。ヒトモノクローナル抗体は、抗原攻撃にตอบสนองして特定のヒト抗体を生成するよう構築されたトランスジェニックマウスから得られる。この技法においては、ヒトH鎖及びL鎖遺伝子座の要素が、内因性H鎖及びL鎖遺伝子座の標的化された破壊を含む胚幹細胞系に由来するマウス株中に導入される。トランスジェニックマウスは、ヒト抗原に対して特異的なヒト抗体を合成することができ、そして前記マウスはヒト抗体-分泌性ハイブリドーマを生成するために使用され得る。トランスジェニックマウスからヒト抗体を得るための方法は、Greenなど、Nat. Genet. 7: 13, 1994, Lonberg など、Nature 368: 856, 1994, 及びTaylorなど、Inc. Immun. 6: 576, 1994により記載される。

30

【0250】

モノクローナル抗体は、種々の十分に確立された技法により、ハイブリドーマ培養物から単離され、そして精製され得る。そのような単離技法は、プロテイン-Aセファロースによる親和性クロマトグラフィー、サイズ排除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を包含する（例えば、Coligan, page 2.7.1-2.7.12及びpage 2.9.1²-2.9.3; Bainesなど、"Purification of Immunoglobulin G (IgG)", Methods in Molecular Biology, vol. 10, p. 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992)を参照のこと)。

40

【0251】

特定の用途に関しては、抗-Zcytor 14抗体のフラグメントを調製することが所望される。そのような抗体フラグメントは、例えば抗体のタンパク質加水分解により得られる。抗体フラグメントは、従来の方法による完全な抗体のペプシン又はパバイン消化により得られる。例示のように、抗体フラグメントは、F(ab')₂として示される5Sフラグメントを供給するためにペプシンによる抗体の酵素分解により生成され得る。このフラグメントは

50

さらに、3.5S Fab' 単価フラグメントを生成するためにチオール還元剤を用いて分解され得る。

【0252】

任意には、その分解反応は、ジスルフィド結合の分解に起因するスルフヒドリル基に関するブロッキング基を用いて行われ得る。他の手段としては、ペプシンを用いての酸素分解が2種の単位Fabフラグメント及びFcフラグメントを直接的に生成する。それらの方法は、例えば、Goldenberg, アメリカ特許第4,331,647号、Nisonoff など., *Archg Biochem. Biophys.* 89: 230, 1960, Porter, *Biochem. J.* 73: 119, 1959, Edelman など., in *Methods in Enzymology* vol. 1, p. 422 (Academic Press 1967), 及びColigan, p. 2.8.1-2.8.10及び2.10-2.10.4により記載される。

10

【0253】

抗体を分解する他の方法、例えば単価L-H鎖フラグメントを形成するためへのH鎖の分解、フラグメントの追加の分解、又は他の酵素的、化学的又は遺伝的技法がまた、そのフラグメントが損なわれていない抗体により認識される抗原に結合する限り、使用され得る。例えば、Fvフラグメントは、 V_H 及び V_L 鎖の会合を含んで成る。この会合は、Inbar など., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 2659, 1972により記載のように、非共有的であり得る。他方では、可変鎖は、分子間ジスルフィド結合により連結され、又は化学物質、例えばグルテルアルデヒドにより交差結合され得る(例えば、Sandhu, *Crit. Rev. Biotech.* 12: 437, 1992を参照のこと)。

【0254】

Fvフラグメントは、ペプチドリンカーにより連結される V_H 及び V_L 鎖を含んで成る。それらの一本鎖抗原結合タンパク質(scFv)は、オリゴヌクレオチドにより連結される V_H 及び V_L ドメインをコードするDNA配列を含んで成る構造遺伝子を構成することによって調製される。構造遺伝子が、続いて、宿主細胞、例えばE.コリ中に導入される発現ベクター中に挿入される。組換え宿主細胞は、2種のVドメインを架橋するリンカーペプチドを有する単鎖ポリペプチドを合成する。ScFvを生成するための方法は、例えばWhitlow など., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:97, 1991により記載される。Bird など., *Science* 242:423, 1988, Ladner など., アメリカ特許第4,946,778号、Packなど., *Bio/Technology* 11: 1271, 1993及びSandhu, 前記も参照のこと。

20

【0255】

例示のように、scFvは、インビトロで、Zcytor 14ポリペプチドにリンパ球を暴露し、そしてファージ又は類似するベクターにおける抗体表示ライブラリーを選択すること(例えば、固定された又はラベルされたZcytor 14タンパク質又はペプチドの作用を通して)によって得られる。可能性あるZcytor 14ポリペプチド結合ドメインを有するポリペプチドをコードする遺伝子は、ファージ(ファージ表示)又は細菌、例えばE.コリ上に表示されるランダムペプチドライブラリーをスクリーニングすることによって得られる。前記ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、多くの手段、例えばランダム突然変異誘発及びランダムポリヌクレオチド合成を通して得られる。

30

【0256】

それらのランダムペプチド表示ライブラリーは、タンパク質又はポリペプチドであり得る既知の標的物、例えばリガンド又は受容体、生物学的又は合成高分子、又は有機又は無機物質と相互作用するペプチドについてスクリーンするために使用され得る。そのようなランダムペプチド表示ライブラリーを創造し、そしてスクリーニングするための技法は、当業界において知られており(Ladner など., アメリカ特許第5,223,409号; Ladner など., アメリカ特許第4,946,778号; Ladner など., アメリカ特許第5,403,484号及びLadner など., アメリカ特許第5,571,698号、及びKayなど., *Phage Display of Peptides and Proteins* (Academic Press, Inc. 1996))、そしてランダムペプチド表示ライブラリー及びそのようなライブラリーをスクリーニングするためのキットは、例えばClontech (Palo Alto, CA), Invitrogen Inc. (San Diego, CA), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) 及びPharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ) から市販されてい

40

50

る。ランダムペプチド表示ライブラリーは、Zcytor 14に結合するタンパク質を同定するために、本明細書に開示されるZcytor 14配列を用いてスクリーンされ得る。

【0257】

抗体フラグメントのもう1つの形は、単一の相補性 - 決定領域 (CDR) をコードするペプチドである。CDRペプチド (“ 最小認識単位 ”) は、興味ある抗体のDCRをコードする遺伝子を構成することによって得られる。そのような遺伝子は、例えば抗体 - 生成細胞のRNAから可変領域を合成するためにポリメラーゼ鎖反応を用いることによって調製される (例えば、Larrick など., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:106, (1991), Courtenay-Luck, “Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies,” in *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application*, Ritter など., (eds.), page 166 (Cambridge University Press 1995), 及びWard など., “Genetic Manipulation and Expression of Antibodies,” in *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch など., (eds.), page 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995)を参照のこと)。

10

【0258】

他方では、抗 - Zcytor 14抗体は、“ヒト適合された”モノクローナル抗体から誘導され得る。ヒト適合されたモノクローナル抗体は、マウス免疫グロブリンH及びL可変鎖からのマウス相補的決定領域を、ヒト可変ドメイン中に移行することにより生成される。次に、ヒト抗体の典型的な残基がネズミ相対物の骨格領域において置換される。ヒト適合されたモノクローナル抗体に由来する抗体成分の使用は、ネズミ不変領域の免疫原性に関連する可能性ある問題を回避する。ネズミ免疫グロブリン可変ドメインをクローン化するための一般的な技法は、例えば、Orlandiなど., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3833, 1989により記載される。

20

【0259】

ヒト適合されたモノクローナル抗体を生成するための技法は、例えば、Jones など., *Nature* 321:522, 1986, Carter など., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4285, 1992, Sandhu, *Crit. Rev. Biotech.* 12: 437, 1992, Singer など., *J. Immunol.* 150: 2844, 1993, Sudhir (ed.), *Antibody Engineering Protocols* (Humana Press, Inc. 1995), Kelley, “Engineering Therapeutic Antibodies,” in *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland など. (eds.), pages 399-434 (John Wiley & Sons, Inc. 1996), 及びQueen など., アメリカ特許第5,693,762号 (1997)により記載される。

30

【0260】

ポリクローナル抗 - イディオタイプ抗体は、標準技法を用いて、抗 - Zcytor 14抗体又は抗体フラグメントにより動物を免疫化することにより調製され得る。例えば、Greenなど., “Production of Polyclonal Antisera” in *Methods in Molecular Biology: Immunohemical Protocols*, Manson (ed.), P. 1-2 (Humana Press 1992)を参照のこと。また、Coligan, 前記、p.2.4.1-2.4.7も参照のこと。

【0261】

他方では、モノクローナル抗 - イディオタイプ抗体は、上記の技法により、抗 - Zcytor 14抗体又は抗体フラグメントを免疫原として用いて調製され得る。もう1つの方法として、ヒト適合された抗 - イディオタイプ抗体又は人間に近い霊長類抗 - イディオタイプ抗体が、上記技法を用いて調製され得る。抗 - イディオタイプ抗体を調製するための方法は、例えばIrie, アメリカ特許第5,208,146号, Greeneなど., アメリカ特許第5,637,677号、及びVarthakovi and Minocha, *J. Gen. Virol* 77: 1875, 1996により記載される。

40

【0262】

10 . 遺伝子発現及び遺伝子構造を検出するためへのZcytor 14ヌクレオチド配列の使用

核酸分子は、生物学的サンプルにおけるZcytor 14遺伝子の発現を検出するために使用され得る。一定のプローブ分子は、配列番号1又は4のヌクレオチド配列、又はその一部を含んで成る二本鎖核酸分子、及び配列番号1又は4のヌクレオチド配列の補体、又はその

50

一部を有する1本鎖核酸分子を包含する。本明細書において使用される場合、用語“一部”とは、少なくとも8個のヌクレオチド～少なくとも20個又はそれ以上のヌクレオチドを言及する。一定のプローブは、他のサイトカイン受容体遺伝子における相当の領域に対して低い配列類似性を有する、Zcytor 14遺伝子の領域と結合する。

【0263】

基本的アッセイにおいては、一本鎖プローブ分子が、プローブと標的Zcytor 14 RNA種との間の塩基対合を促進する、温度及びイオン強度の条件下で、生物学的サンプルから単離されたRNAと共にインキュベートされる。未結合のプローブをハイブリダイズされた分子から分離した後、ハイブリッドの量が検出される。

【0264】

RNA検出の十分に確立されたハイブリダイゼーション方法は、ノザン分析及びドット/スロットプロットハイブリダイゼーションを包含する(例えば、Ausubel 前記、p4 - 1 ~ 4 - 27、及びWuなど、(eds.)、"Analysis of Gene Expression at the RNA Level", in Methods in Gene Biotechnology, p. 225-39, CRC Press, Inc., 1997を参照のこと)。核酸プローブは、放射性同位体、例えば³²P又は³⁵Sにより検出できるようラベルされ得る。他方では、Zcytor 14 RNAは、非放射性ハイブリダイゼーション方法により検出され得る(例えば、Isaac (ed.), Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes, Humana Press, Inc., 1993を参照のこと)。

【0265】

典型的には、非放射能性検出は、クロモゲン又は化学ルミネセンス基質の酵素転換により達成される。例示的な非放射性成分は、ピオチン、フルオレセイン及びジゴキシゲニンを包含する。

Zcytor 14オリゴヌクレオチドプローブはまた、インビボ診断のためにも有用である。例示として、¹⁶F - ラベルされたオリゴヌクレオチドが対象に投与され、そして陽電子射出断層撮影法により可視可され得る(Tavitian など., Nat. Med. 4: 467, 1998)。

【0266】

多くの診断方法は、検出方法の感度を高めるために、ポリメラーゼ鎖反応(PCR)を利用する。PCRを実施するための標準技法は良く知られている(一般的には、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; Hanausek and Wala szed (eds.), Tumor Marker Protocols, Humana Press, Inc., 1998; Lo (ed.), Clinical Applications of PCR, Humana Press, Inc., 1998及びMeltzer (ed.), PCR in Bioanalysis, Humana Press, Inc., 1998を参照のこと)。

【0267】

PCRプライマーは、他のタンパク質、例えば、他のサイトカイン受容体タンパク質における相当の領域に対して低い配列類似性を有するZcytor 14遺伝子の一部を増幅するよう企画される。

診断アッセイについてのPCRの1つの変法は、逆転写酵素 - PCR (RT - PCR) である。RT - PCR技法においては、RNAが生物学的サンプルから単離され、cDNAに逆転写され、そしてそのcDNAがZcytor 14プライマーと共にインキュベートされる(例えば、Wuなど、(eds.)、"Rapid Isolation of Specific cDNA or Genes by PCR", in Methods in Gene Biotechnology, P. 15-28, CRC Press, Inc. 1997を参照のこと)。次に、PCRが行われ、そして生成物が標準技法を用いて分析される。

【0268】

例示のように、RNAは、例えば上記グアニジニウム - チオシアネート細胞溶解を用いて、生物学的サンプルから単離される。他方では、固相技法が、細胞溶解物からmRNAを単離するために使用され得る。逆転写反応は、ランダムオリゴヌクレオチド、dTの短いホモポリマー、又はZcytor 14アンチセンスオリゴマーを用いて、単離されたRNAにより感作され得る。オリゴ - dTプライマーは、対照の標的配列を提供することができる種々のmRNAヌクレ

10

20

30

40

50

オチド配列が増幅される利点を提供する。Zcytor 14配列は、典型的には20個の長さの塩基である2種のフランキングオリゴヌクレオチドプライマーを用いてポリメラーゼ鎖反応により増幅される。

【0269】

PCR増幅方法は、種々のアプローチを用いて検出され得る。例えば、PCR生成物は、ゲル電気泳動により分別され、そして臭化エチジウム染色により可視化される。他方では、分別されたPCR生成物は、膜に移行され、検出できるようにラベルされたZcytor 14プローブによりハイブリダイズされ、そしてオートラジオグラフィーにより試験され得る。追加の他のアプローチは、化学ルミネセンス検出及びC-TRAK比色アッセイを提供するために、ジゴキシゲニンによりラベルされたデオキシリボ核酸三ミリ酸の使用を包含する。

10

【0270】

Zcytor 14発現の検出のためのもう1つのアプローチは、サイクリングプローブ技法(CDT)であり、ここで一本鎖DNA標的物が過剰のDNA-RNA-DNAキメラプローブと結合し、複合体を形成し、RNA部分がRNアーゼHにより分化され、そして分解されたプローブの存在が検出される(例えば、Beggsなど., J. Clin. Microbiol. 34: 2985, 1996, 及び Bekkuoui など., Biotechniques 20: 240, 1996を参照のこと)。

【0271】

Zcytor 14配列番号の検出のための他の方法は、核酸配列に基づく増幅(NASBA)、交差ハイブリダイゼーションによる鋳型の協同増幅(CATCH)及びリガーゼ鎖反応(LCR)のようなアプローチを利用することができる(例えば、Marshallなど., アメリカ特許第5,686,272号(1997)、Dyerなど., J. Virol. Methods 60: 161, 1996; Ehrichtなど., Eur. J. Biochem. 243: 358, 1997; 及びChadwickなど., J. Viro. Methods 70:59, 1998を参照のこと)。他の標準方法も当業者に知られている。

20

【0272】

Zcytor 14プローブ及びプライマーはまた、組織サンプルにおけるZcytor 14遺伝子発現を検出し、そして位置決定するためにも使用され得る。そのような現場ハイブリダイゼーションのための方法は、当業者に良く知られている(例えば、Choo (ed.), In situ Hybridization Protocols, Humana Press, Inc., 1994; We など. (eds.), "Analysis of Cellular DNA or Abundance of mRNA by Radioactive In Situ Hybridization (RISH)," in Methods in Gene Biotechnology, pages 259-278, CRC Press, Inc., 1997; 及びWuなど. (eds.), "Localizaion of DNA or Abundance of mRNA by Fluorescence In Situ Hybridization (RISH)," in Methods in Gene Biotechnology, pages 279-289, CRC Press, Inc., 1997を参照のこと)。

30

【0273】

種々の追加の診断アプローチも当業者に良く知られている(例えば、Mathew (ed.), Protocols in Human Molecular Genetics, Humana Press, Inc., 1991; Coleman and Tsongalis, Molecular Diagnostics, Humana Press, Inc., 1996; 及びElles, molecular Diagnosis of Genetics Diseases, Humana Press Inc., 1996を参照のこと)。適切な試験サンプルは、血液、尿、唾液、組織、生検及び検死を包含する。

【0274】

Zcytor 14遺伝子は、ヒト染色体3p25 - 3p24に存在する。この領域は、種々の障害、例えば色素性乾皮症、Marfan - 様結合組織障害、心筋脂肪症、糖尿病、ファンコーニ貧血症、腎細胞癌、Marfan症候群、Von Hippel - Lindau症候群及び瞼裂縮小に関連している。さらに、サイトカイン受容体の突然変異は特定の疾病に関連している。例えば、サイトカイン受容体の多形現象は、肺胞タンパク質症、家族性周期性発熱及び赤白血病に関連している。

40

【0275】

従って、Zcytor 14ヌクレオチド配列は、種々の疾病についての連鎖に基づく試験において、及び対象の染色体がZcytor 14遺伝子に突然変異を含むかどうかを決定するために使用され得る。Zcytor 14遺伝子座での検出できる染色体逸脱は、異数性、遺伝子コピー数

50

変化、挿入、欠失、制限部位変化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。Zcytor 14遺伝子を不活性化する遺伝子変更が特に興味の対象である。

【0276】

Zcytor 14遺伝子座に関連する逸脱は、分子遺伝子技法、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

【0277】

タンパク質切断試験はまた、翻訳 - 終結突然変異がコードされたタンパク質の一部のみを生成する、遺伝子の不活性化を検出するために有用である（例えば、Stoppa-Lynnet など., *Blood* 91: 3920 (1998) を参照のこと)。このアプローチによれば、RNAが生物学的サンプルから単離され、そしてcDNAを合成するために使用される。次に、PCRが、Zcytor 14標的物配列を増幅し、そしてRNAポリメラーゼプロモーター、翻訳開始配列及びインフレーションATGトリプレットを導入するために使用される。

20

【0278】

PCR生成物が、RNAポリメラーゼを用いて転写され、そして転写体がT7 - 結合された網様体溶解物システムによりインビトロで翻訳される。次に、翻訳生成物が、その翻訳生成物の長さを決定するために、SDS - PAGEにより分別される。タンパク質切断試験は、例えば、Dracopoliなど. (eds.), *Current Protocols in Human Genetics*, p.9.11.1-9.11.18 (John Wiley & Sons 1998) により記載される。

30

【0279】

本発明はまた、Zcytor 14遺伝子発現のための診断アッセイを行うための又はZcytor 14遺伝子における突然変異を検出するためのキットも企画する。そのようなキットは、核酸プローブ、例えば配列番号1又は4のヌクレオチド配列又はその一部を含んで成る二本鎖分子、及び配列番号1又は4のヌクレオチド配列の補体又はその一部を有する一本鎖核酸分子を含んで成る。プローブ分子は、DNA、RNA、オリゴヌクレオチド及び同様のものであり得る。キットは、PCRを行うための核酸プライマーを含んで成る。

【0280】

そのようなキットは、上記核酸診断アッセイを行うためのすべての必要な要素を含むことができる。キットは、Zcytor 14プローブ又はプライマーを含んで成る少なくとももう一つの容器を含むであろう。キットはまた、Zcytor 14配列の存在を示すことができる1又は複数の試薬を含んで成る第2容器を含むことができる。そのようなインジケータ試薬の例は、検出できるラベル、例えば放射性ラベル、蛍光色素、化学ルミネセント剤、及び同様のものを包含する。

40

【0281】

キットはまた、Zcytor 14プローブ及びプライマーがZcytor 14遺伝子発現を検出するために使用される、使用者に知られるための手段を含んで成る。例えば、文書の説明書は、封入されている核酸分子が、Zcytor 14をコードする核酸分子、又はZcytor 14コードのヌクレオチド配列に対して相補的であるヌクレオチド配列を有する核酸分子のいずれかを検出するために使用され得ることを記載する。その文書の材料は、容器に直接的に適用され、

50

又は文書の材料は、パッケージング挿入体の形で提供され得る。

【0282】

11. Zcytor 14を検出するためへの抗-Zcytor 14抗体の使用：

本発明は、Zcytor 14の存在についてインビトロで生物学的サンプルをスクリーンするためへの抗-Zcytor 14抗体の使用を企画する。1つのタイプのインビトロアッセイにおいては、抗-Zcytor 14抗体が液相において使用される。例えば、生物学的サンプルにおけるZcytor 14の存在は、生物学的サンプルと、微量のラベルされたZcytor 14及び抗-Zcytor 14抗体とを、Zcytor 14とその抗体との間の結合を促進する条件下で混合することによって試験され得る。

【0283】

サンプルにおけるZcytor 14及び抗-Zcytor 14の複合体が、前記複合体を、抗体、例えばFc抗体又はスタフィロコカスタンパク質Aと結合する同定されたタンパク質とを接触することによって、反応混合物から分離され得る。生物学的サンプルにおけるZcytor 14の濃度は、抗体に結合されるラベルされたZcytor 14の量に反比例し、そして遊離ラベルにされたZcytor 14の量に直接的に関連する。例示的な試験サンプルは、血液、尿、唾液、組織生検及び検死材料を包含する。

【0284】

他方では、抗-Zcytor 14抗体が固相キャリアーに結合されるインビトロアッセイが行われ得る。例えば、抗体が、不溶性支持体、例えばポリマー-被覆されたビーズ、プレート又は管に抗体を結合するために、ポリマー、例えばアミノデキストランに結合され得る。他の適切なインビトロアッセイは、当業者に明らかであろう。

【0285】

もう一つのアプローチにおいては、抗-Zcytor 14抗体が、生検検体から調製された組織切片においてZcytor 14を検出するために使用され得る。そのような免疫化学的検出が、比較的多くのZcytor 14を決定するために、及び試験される組織におけるZcytor 14の分布を決定するために使用され得る。一般的な免疫化学的技法は、十分に確立されている（例えば、Ponder, "Cell Marking Techniques and Their Application." in *Mammalian Development: A Practical Approach*, Monk (ed.), pages 115-38 (IRL Press 1987), Coligan at pages 5.8.1-5.8.8, Ausubel (1995) at pages 14.6.1 to 14.6.13 (Wiley interscience 1990), and Manson (ed.), *Methods In Molecular Biology. Vol. 10: Immunochemical Proteocols* (The Humana Press. Inc. 1992) を参照のこと）。

【0286】

免疫化学的検出は、生物学的サンプルと抗-Zcytor 14抗体とを接触し、そして次に、前記生物学的サンプルと、抗体に結合する検出できるラベルされた分子とを接触せしめることによって行われ得る。例えば、前記検出できるラベルされた分子は、抗-Zcytor 14抗体に結合する抗体成分を含んで成る。他方では、抗-Zcytor 14抗体は、アビジン/ストレプトアビジン（又はビオチン）により接合され、そして検出できるラベルされた分子はビオチン（又はアビジン/ストレプトアビジン）を含むことができる。この基本的技法の多くの変法は、当業者に良く知られている。

【0287】

他方では、抗-Zcytor 14抗体が、抗-Zcytor 14免疫接合体を形成するために、検出できるラベルにより接合され得る。適切な検出できるラベルは、例えば放射生同位体、蛍光ラベル、化学ルミネセンスラベル、酵素ラベル、生物ルミネセンスラベル又はコロイド状金を包含する。そのような検出できるラベルされた免疫接合体の製造及び検出方法は、当業者に良く知られており、そして下記により詳細に記載される。

検出できるラベルは、オートラジオグラフィーにより検出される放射性同位体であり得る。本発明のために特に有用である同位体は、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 及び ^{14}C である。

【0288】

抗-Zcytor 14免疫接合体はまた、蛍光化合物によりラベルされ得る。蛍光ラベルされた抗体の存在は、適切な波長の光に免疫接合体を暴露し、そして得られる蛍光を検出するこ

10

20

30

40

50

とによって決定される。蛍光ラベル化合物は、フルオレセインイソチシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、*o*-フタルアルデヒド及びフルオレサミンを包含する。

【0289】

他方では、抗-Zcytor 14免疫接合体は、化合物ルミネセンス化合物に抗体化合物を接合することによって、検出的にラベルされ得る。化学ルミネセンス-標識された免疫接合体の存在は、化学反応の間に生じるルミネセンスの存在を検出することによって決定される。化学ルミネセンスラベリング化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩及びオキサレートエステルを包含する。

10

【0290】

同様に、化学ルミネセンス化合物は、本発明の抗-Zcytor 14免疫接合体をラベルするために使用され得る。生物発光は、触媒タンパク質が化学ルミネセンス反応の効率を高める生物学的システムに見出されるタイプの化学ルミネセンスである。生物ルミネセンスタンパク質の存在は、ルミネセンスの存在を検出することによって決定される。ラベリングのために有用である生物ルミネセンス化合物は、ルシフェリン、ルシフェラーゼ及びエクオリンを包含する。

【0291】

他方では、抗-Zcytor 14免疫接合体は、酵素に抗-Zcytor 14抗体化合物を接合することによって検出できるようラベルされ得る。抗-Zcytor 14-酵素接合体が適切な基質の存在下でインキュベートされる場合、酵素成分は、分光光度、蛍光又は可視手段により検出され得る化学成分を生成するために基質と反応する。多くの特異的免疫接合体を検出できるようにラベルするために使用され得る酵素の例は、 β -ガラクトシダーゼ、グルコキシダーゼ、ペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼを包含する。

20

【0292】

当業者は、本発明に従って使用され得る他の適切なラベルを知っているであろう。抗-Zcytor 14抗体へのマーカー成分の結合は、当業界において知られている標準技法を用いて達成され得る。これに関しての典型的な方法論は、Kennedyなど., *Clin. Chim. Acta* 70:1 (1976), Schursなど., *Clim. Acta* 81:1 (1977), Shihなど., *Int'l. J. Cancer* 46:1101 (1990), steinなど., *Cancer Res.* 50:1330 (1990), 及びColigan、前期により記載される。

30

【0293】

さらに、免疫化学的検出の便利さ及び多様性は、アビジン、ストレプトアビジン及びビオチンにより接合された抗-Zcytor 14抗体を用いることによって増強され得る(例えば、Wilchek など., (eds.), "Avidin-Biotin Technology," *Methods In Enzymology*, Vol. 184 (Academic Press 1990), and Bayer など., "Immunochemical Applications of Avidin-Biotin Technology," in *Methods In Molecular Biology*, Vol. 10, Manson (ed.) pages 149-162 (The Humana Press. Inc. 1992) を参照のこと)。

【0294】

イムノアッセイを行うための方法は十分に確立されている。例えば、Cook and Self, "Monoclonal Antibodies in Diagnostic Immunoassays," in *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application*, Ritter and Ladyman (eds.), Pages 180-208. (Cambridge University Press, 1995), Perry, "The Role of Monoclonal antibodies in the Advancement of Immunoassay Technology", in *Monoclonal Antibodies; Principles and applications*, Birch and Lennox (eds.), pages 107-120 (Wiley-Liss, Inc. 1995), and Diamandis, *Immunoassay* (Academic Press, Inc. 1996) を参照のこと。

40

【0295】

本発明はまた、Zcytor 14遺伝子発現についての免疫学的診断アッセイを行うためのキットも企画する。そのようなキットは、抗-Zcytor 14抗体又は抗体フラグメントを含んで

50

成る少なくとも1つの容器を含んで成る。キットはまた、Zcytor 14抗体又は抗体フラグメントの存在を示すことができる1又は複数の試薬を含んで成る第2容器を含むことができる。そのようなインジケータ試薬の例は、検出できるラベル、例えば放射性ラベル、蛍光ラベル、化学ルミネセンスラベル、酵素ラベル、生物ルミネセンスラベル、コロイド状金及び同様のものを包含する。

【0296】

キットはまた、Zcytor 14抗体又は抗体フラグメントが、Zcytor 14タンパク質を検出するために使用される、使用者に伝達するための手段を含んで成る。例えば、文書の説明書は、封入される抗体又は抗体フラグメントが、Zcytor 14を検出するために使用され得ることを言及する。文書の材料は容器に直接的に適用され、又は文書の材料は、パッケージング挿入体の形で提供され得る。

10

【0297】

12. Zcytor 14活性を有するポリペプチドの治療的使用：

本発明は、Zcytor 14活性を有するタンパク質、ポリペプチド及びペプチド（例えば、Zcytor 14ポリペプチド（例えば、Zcytor 14ポリペプチド（例えば、Zcytor 14の可溶性形）、Zcytor 14類似体（例えば、抗-Zcytor 14抗-イディオタイプ抗体）、及びZcytor 14融合タンパク質））の、適切な量のこのポリペプチドを欠いている対象への使用を包含する。対照的に、Zcytor 14アンタゴニスト（例えば、生物学的に不活性である抗-Zcytor 14抗体は又は抗-Zcytor 14抗-イディオタイプ抗体）が、過剰のZcytor 14を生成する対象を処理するために使用され得る。

20

【0298】

例示のように、Zcytor 14は、ヒトインターロイキン-17受容体と類似性を共有するアミノ酸配列を有する。研究によれば、インターロイキン-17は免疫応答の開始又は維持において中枢的な役割を演じることが示されている（例えば、Jovanovicなど、*J. Immunol.* 160: 3513 (1998) を参照のこと）。さらに、インターロイキン-17が滑液細胞により炎症メディエーターの生成を活性化し、そしてインターロイキン-17がリウマチ様関節炎の特徴である前炎症パターンに寄与する証拠が存在する（Chabaudなど、*J. Immunol.* 161: 409 (1998) ; Chabaudando など、*Arthritis Rheum.* 42: 963 (1999)）。従って、Zcytor 14活性を有するポリペプチド（例えば、Zcytor 14ポリペプチド、Zcytor 14の機能的フラグメント、例えば可溶性Zcytor 14受容体、抗-Zcytor 14抗-イディオタイプ抗体、等）が、炎症及び炎症に関連する状態、例えばリウマチ様関節炎を処理するために使用され得る。

30

【0299】

一般的に、投与されるZcytor 14（又はZcytor 14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、一般的な医学的状態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Zcytor 14の用量（但し、それよりも低いか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。

【0300】

Zcytor 14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、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。

40

【0301】

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,

50

Adv. Drug Deliv. Rev. 35: 199 (1997) を参照のこと)。

【0302】

Zcytor 14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、Zcytor 14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))。

10

【0303】

Zcytor 14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。

20

【0304】

治療のためには、Zcytor 14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。Zcytor 14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ず場合、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。

【0305】

Zcytor 14(又はZcytor 14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、エーロゾル、又は固体形で維持され得る。液体形は、注射用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))。

30

40

【0306】

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)。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。

50

【0307】

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、Macky 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。

【0308】

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、封入された剤をゆっくりと開放する。他方では、吸収されたりポソームは、食細胞性である細胞によりエンドサイト - シス化され得る。エンドサイト - 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。

10

【0309】

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)）。

20

【0310】

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りポソームが、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)）。

30

【0311】

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)）。

【0312】

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ジ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、アジ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りポソーム結晶半減期を導き、そしてアジアロフェチュイン - ラベルされたり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。

40

【0313】

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、

50

アジアロフェチインの前注入により阻害され得る (Murahashiなど., Biol. Pharm. Bul. 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。

【0314】

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、ピオチニル化された抗体によりプレラベルされる (Harasymなど., Adv. Drug Deliv. Rev. 32: 99 (1998))。遊離抗体の血漿排除の後、ストレプトタビジン - 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、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))。

10

【0315】

Zcytor 14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、治療的に有用なりポソームは、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))。

20

【0316】

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 Maszkiewicz, "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)。

30

【0317】

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、Zcytor 14活性を有する化学的に変性されたポリペプチド及びZcytor 14アンタゴニストを企画する。

40

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。

【0318】

例示のように、医薬組成物は、Zcytor 14細胞外ドメイン又はZcytor 14アンタゴニスト(例えば、Zcytor 14ポリペプチドを結合する抗体又は抗体フラグメント)と共に1つのポリペプチド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

50

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、液体エア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、Zcytor 14組成物が、Zcytor 14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。

【 0 3 1 9 】

1 3 . Zcytor 14ヌクレオチド配列の治療的使用：

本発明は、Zcytor 14を、そのような処理の必要な対象に供給するためへのZcytor 14ヌクレオチド配列の使用を包含する。さらに、Zcytor 14遺伝子発現を阻害する治療用発現ベクター、例えばアンチセンス分子、リボザイム又は外部案内配列分子が供給され得る。

10

【 0 3 2 0 】

Zcytor 14を発現する組換え宿主細胞の使用、Zcytor 14をコードする裸の核酸の供給、Zcytor 14をコードする核酸分子と共にカチオン性脂質キャリアーの使用、及びZcytor 14を発現するウイルス、例えば組換えレトロウイルス、組換えアデノ - 関連ウイルス、組換えアデノウイルス、及び組換えヘルペス単純ウイルス (HSV) の使用を包含する、Zcytor 14遺伝子を対象に導入するための多くのアプローチが存在する (例えば、Mulligan, Science 260: 926 (1993), Rosenberg など., Science 242: 1575 (1988), LaSalle など., Science 250: 988 (1993), Wolffなど., Science 247: 1465 (1990), Breakfield and Deluca, The New Biologist 3: 203 (1991) を参照のこと)。エクスピボアプローチにおいては、細胞が対象から単離され、Zcytor 14遺伝子を発現するベクターによりトランスフェクトされ、そして次に、対象中に移植される。

20

【 0 3 2 1 】

Zcytor 14遺伝子の発現をもたらすために、Zcytor 14遺伝子をコードするヌクレオチド配列が、遺伝子転写を制御するために、コアプロモーター及び任意には、調節要素に操作可能的に連結される発現ベクターが構成される。発現ベクターの一般的な必要性は、上記に記載されている。

【 0 3 2 2 】

他方では、Zcytor 14遺伝子は、組換えウイルスベクター、例えばアデノウイルスベクター (例えば、Kass-Eister など., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90: 11498 (1993), Kolis など., proc. Nat'l Acad. Sci. USA 91: 215 (1994), Liなど., Hum. Gene Ther. 4:403 (1993), Vincent など., Nat. Genet. 5:130 (1993), and Zabner など., Cell 75: 207 (1993))、アデノウイルス - 関連ウイルスベクター (Flotteなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10613 (1993))、アルファウイルス、例えば "Semliki Forest ウィルス及びSindbisウィルス (Hertz and Huang, J. Vir. 66: 857 (1992), Raju and Huang, J.vir. 65:2501 (1991), 及びXiongなど., Science 243: 1188 (1989))、ヘルペスウイルスベクター (Koeringなど., Hum. Gene. Therap. 5: 457 (1994))、

30

【 0 3 2 3 】

ポックスウイルスベクター (Ozakiなど., Biochem. Biophys. Res. Comm. 193: 653 (1993), Panicali and Paoietti, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 4927 (1982))、ポックスウイルス、例えばカナリヤポックスウイルス又はワクシニアウイルス (Fisher-Hochなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 317 (1989) 及びFlexner など., Ann. N. Y. Acad. Sci. 569: 86 (1989))、及びレトロウイルス (Baba など., J. Neurosurg 79: 729 (1993), Ram など., Cancer Res. 53:83 (1993), Takamiyaなど., J. Neurosci. Res. 33: 493 (1992), Vile and Hart, Cancer Res. 53: 962 (1993), Vile and Hart, Cancer Res. 53: 3860 (1993) 及びAndersonなど., アメリカ特許第5,399,346号) を用いて供給され得る。種々の態様においては、ウイルスベクター自体又はウイルスベクターを含むウイルス粒子のいずれかが、下記に記載される方法及び組成物に使用され得る。

40

【 0 3 2 4 】

1 つシステムの例示として、アデノウイルス、すなわち二本鎖DNAウィルスは、異種核酸

50

分子の供給のための十分に特徴づけられた遺伝子トランスファーベクターである (Becker など., *Meth. Cell Biol.* 43:161 (1994); Douglas and Curiel, *Science & Medicine* 4: 44 (1997))。アデノウイルスシステムは、次のいくつかの利点を提供する: (i) 比較的大きなDNA挿入体を収容する能力、(ii) 高い力価に増殖する能力、(iii) 広範囲の哺乳類細胞型を感染する能力、及び(iv) 多くの異なったプロモーター、例えば遍在性で、組織特異的な、及び調節できるプロモーターと共に使用される能力。さらに、アデノウイルスは、そのウイルスが血流において安定しているため、静脈内注射により投与され得る。

【0325】

アデノウイルスゲノムの一部が欠失されているアデノウイルスベクターを用いて、挿入体は、直接的な連結により、又は同時トランスフェクトされたプラスミドによる相同組換えにより、ウイルスDNA中に組み込まれる。典型的なシステムにおいては、必須E1遺伝子がウイルスベクターから欠失され、そしてウイルスは、E1遺伝子が宿主細胞により供給されない場合、複製しないであろう。損なわれていない動物に静脈内供給される場合、アデノウイルスは主に、肝臓を標的化する。E1遺伝子欠失を有するアデノウイルス供給システムが宿主細胞において複製しない場合、宿主の組織は、コードされた異種タンパク質を発現し、そしてプロセッシングするであろう。宿主細胞はまた、その対応する遺伝子が分泌シグナル配列を含む場合、異種タンパク質を分泌するであろう。分泌されたタンパク質は、異種遺伝子を発現する組織 (例えば、高く血管化された肝臓) から循環に侵入するであろう。

【0326】

さらに、ウイルス遺伝子の種々の欠失を含むアデノウイルスベクターは、そのベクターに対する免疫応答を低めるか又は排除するために使用され得る。そのようなアデノウイルスは、E1 - 欠失され、そしてさらに、E2A又はE4の欠失を含む (Lusky など., *J. Virol.* 72: 2022 (1998); Raper など., *Human Gene Therapy* 9: 671 (1998))。E2bの欠失はまた、免疫応答を低めることが報告されている (Amalfitano など., *J. Virol.* 72:926 (1998))。完全なアデノウイルスゲノムを欠失することによって、異種DNAの非常に大きな挿入体が収容され得る。すべてのウイルス遺伝子が欠失されている、いわゆる“不活性 (gutless)”アデノウイルスの生成は、異種DNAの大きな挿入体の挿入のために特に好都合である (Yeh and Perricaudet, *FASEB J.* 11: 615 (1997) を参照のこと)。

【0327】

治療用遺伝子を発現できる組換えウイルスの高い力価のストックが、標準方法を用いて、感染された哺乳類細胞から得られる。例えば、組換えHSVは、Vero細胞において、Brandt など., *J. Gen. Virol.* 72: 2043 (1991), Herold など., *J. Gen. Virol.* 75:1211 (1994), Visalli and Brandt, *Virology* 185:419 (1991), Grau など., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 30: 2474 (1989), Brandi など., *J. Virol. Meth.* 36:209 (1992), 及びBrawn and MacLean (eds.), *HSV Virus Protocols* (Human Press 1997) により記載のようにして、調製され得る。

【0328】

他方では、Zcytor 14遺伝子を含んで成る発現ベクターは、リポソームを用いてのインビボリポフェクションにより、対象の細胞に導入され得る。合成カチオン脂質が、マーカ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ポ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)。

【0329】

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、例えば膵臓、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化学的に得られる。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)、タンパク質、例えば抗体又は非ペプチド分子は、

10

20

30

40

50

化学的にリボソームに結合され得る。

【0330】

エレクトロポレーションは、投与のもう1つの態様である。例えば、Aihara and Miyazaki, *Nature Biotechnology* 16: 867 (1998) は、筋肉中への遺伝子トランスファーのためへのインビボエレクトロポレーションの使用を示している。遺伝子療法へのもう1つのアプローチにおいては、治療用遺伝子は、Zcytor 14の発現を阻害するZcytor 14アンチセンスRNAをコードすることができる。アンチセンス分子のための適切な配列は、本明細書に開示されるZcytor 14のヌクレオチド配列から誘導され得る。

【0331】

他方では、調節要素がリボザイムをコードするヌクレオチド配列に操作可能的に連結される発現ベクターが構成され得る。リボザイムは、mRNA分子における一定の標的配列に向けられるエンドヌクレアーゼ活性を発現するよう企画され得る（例えば、Draper and Macejak, アメリカ特許第5,496,698号、McSwiggen, アメリカ特許第5,525,468号、Chowrira and McSwiggen, アメリカ特許第5,631,369号及びRobertson and Goldberg, アメリカ特許第5,225,337号を参照のこと）。本発明においては、リボザイムはZcytor 14 mRNAと結合するヌクレオチド配列を包含する。

10

【0332】

もう1つのアプローチにおいては、調節要素がZcytor 14遺伝子をコードするmRNA分子のRNアーゼP-介在性切断を促進できるRNA転写体の生成を方向づける発現ベクターが構成され得る。このアプローチによれば、外部案内配列が、細胞リボザイムにより続いて切断される、特定種の細胞内mRNAに内因性リボザイム、すなわちRNアーゼPを向けるために構成され得る（例えば、Altmanなど., アメリカ特許第5,168,053号、Yuanなど., *Science* 263: 1269 (1994), Paceなど., WO96/18733号、Georgeなど., WO96/21731号及びWemerなど., WO97/33991号を参照のこと）。

20

【0333】

好ましくは、前記外部案内配列は、Zcytor 14 mRNAに対して相補的な10~15個のヌクレオチド配列、及び3'-NCCAヌクレオチド配列（ここで、Nは好ましくはプリンである）を含んで成る。外部案内配列転写体は、mRNAと相補的外部案内配列との間での塩基対の形成により、標的化されたmRNA種に結合し、従って、前記塩基対合された領域の5'側に位置するヌクレオチドでのRNアーゼPによるmRNAの切断を促進する。

30

【0334】

一般的に、Zcytor 14ヌクレオチド酸配列を有する治療用ベクター、例えば組換えウィルスを含んで成る組成物の用量は、対照の年齢、体重、身長、性別、一般的な医学的状態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。治療用ベクターの適切な投与経路は、静脈内注射、動脈内注射、腹腔内注射、筋肉内注射、腫瘍内注射、及び腫瘍を含む腔中への注射を包含する。例示のように、Hortonなど., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1553 (1999)は、インターフェロン- β をコードするプラスミドDNAの筋肉内注射がネズミモデルにおいて一次及び転移性腫瘍に対する可能性ある抗腫瘍効果を生成することを示す。

【0335】

本発明のウィルスベクター、非ウィルスベクター又はウィルス及び非ウィルスベクターの組み合わせを含んで成る組成物は、医薬的に有用な組成物を調製するための既知方法に従って配合され得、それによれば、ベクター又はウィルスは、医薬的に許容できるキャリアーと共に混合される。上記で示されるように、組成物、例えばリン酸緩衝溶液は、その投与が受容体対象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。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、Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 19th Ed. (Mack Publishing Co. 1995), 及びGilman's *the Pharmacological Basis of Therapeutics*, 7th Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985)を参照のこと）。

40

【0336】

50

治療のためには、治療用遺伝子ベクター、又はそのようなベクターを含んで成る組換えウイルス、及び医薬的に許容できるキャリアーが、治療的有效量で対象に投与され得る。発現ベクター（又はウイルス）及び医薬的に許容できるキャリアーの組み合わせは、投与される量が生理学的に有意である場合、“治療的有效量”で投与されると言われる。剤は、その存在が受容体対象の生理学において検出でき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。

【0337】

治療用遺伝子発現ベクター又は組換えウイルスにより処理される対象がヒトである場合、治療は好ましくは、体細胞遺伝子治療である。すなわち、治療用遺伝子発現ベクター又は組換えウイルスによるヒトの好ましい処理は、ヒト生殖細胞系の一部を形成し、そして次の世代に通され得る核酸分子を細胞中に導入すること（すなわち、ヒト生殖系遺伝子治療）を必要としない。

10

【0338】

14. トランスジェニックマウスの生成：

トランスジェニックマウスは、すべての組織において、又は組織 - 特異的又は組織に好ましい調節要素の制御下で、Zcytor 14遺伝子を過剰発現するよう構築され得る。Zcytor 14のそれらの過剰生成体は、過剰発現に起因する表現型を特徴づけるために使用され得、そしてトランスジェニック動物は過剰Zcytor 14により引き起こされるヒト疾病のためのモデルとして作用することができる。Zcytor 14を過剰発現するトランスジェニックマウスはまた、大きな動物の乳汁又は血液におけるZcytor 14、例えば可溶性Zcytor 14の生成のためのモデル生物反応体を提供する。

20

【0339】

トランスジェニックマウスを生成するための方法は、当業者に良く知られている（例えば、Jacob, “Expression and Knockout of interferons in Transgenic Mice,” in Overexpression and Knockout of Cytokines in Transgenic Mice, Jacob (ed.), Pages 111-124 (Academic Press, Ltd. 1994), Monastersky and Robl (eds.), Strategies in Transgenic Animal Science (ASM Press 1995), and Abbud and Nilson, “Recombinant Protein Expression in Transgenic Mice,” in Gen Expression Systems: using Nature for the Art of Expression, Fernandez and Hoeffler (eds.), pages 367-397 (Academic Press, Inc. 1999)を参照のこと）。

30

【0340】

例えば、Zcytor 14遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを生成するための方法は、成熟した受精能雄（種マウス）（B6C3f1, 生後2 - 8ヶ月（Tacomis Farms, Germantown, NY））、精管切除された雄（duds）（B6D2f1, 2 - 8ヶ月（Taconic Farms））、思春期直前受胎能雌（ドナー）（B6C3f1, 4-5週（Taconic Farms））、及び成熟した受胎能雌（受容体）（B6D2f1, 2 - 4ヶ月（taconic farms））により開始することができる。

【0341】

ドナーは、1週間、気候順応化され、そして次に、約8 IU/マウスのPregnant Mare's Serum Gonadotropin（Sigma Chemical Company, St. Louis, MO）I.P.により、及び46 - 47時間後、8 IU/マウスのヒトChorionic Gonadotropin（hCG（Sigma））L.P.により注射され、過剰排卵を誘発された。ドナーが、ホルモン注射に続いて、種マウスにより交配される。排卵は一般的に、hCG注射の13時間以内に生じる。交配は、交配の次の朝、膣栓の存在により確認される。

40

【0342】

受精された卵を手術用スコープ下で集める。卵管を集め、そして卵を、ヒアルロニダーゼ（Sigma）を含む尿検査用スライド中に開放する。卵を、1度、アヒルロニダーゼにより洗浄し、そして2度、Whitten's W640媒体（Menino and O'cloray, Biol. Reprod. 77: 159 (1986), 及びDienhart and Downs, Zygote 4: 129 (1996)により記載される）により洗浄し、これを5%CO₂、5%O₂及び90%N₂と共に37°Cでインキュベートする。次に、

50

卵を、マイクロインジェクションまで、37 /5%CO₂のインキュベーターに貯蔵する。

【0343】

Zcytor 14コード配列を含むプラスミドDNA10~12 µgを、線状化し、ゲル精製し、そしてマイクロインジェクションのために5 - 10ng/ µlの最終濃度で、10mMのトリス - HCl (pH7.4), 0.25mMのEDTA (pH8.0)の溶液に再懸濁する。例えば、Zcytor 14コード配列は、配列番号2のアミノ酸残基をコードすることができる。

プラスミドDNAを、暖かな、CO₂平衡化された鉱油により被覆された1度のW640媒体に含まれる、収穫された卵中にマイクロインジェクトする。DNAを注射用針中に吸い込み(0.75mmのID, 1mmのOD硼珪酸塩ガラス細管から引き抜かれる)、そして個々の卵中に注入する。注射用針により、個々の卵の、ハプロイド前核の1つ又は両者中に貫通する。

10

【0344】

数ピコリットルのDNAを前核中に注入し、そして注射用針を、核と接触しないよう引き抜く。前記方法を、すべての卵が注入されるまで、反復する。都合良くマイクロインジェクトされた卵を、前もってガス抜きされたW640媒体を有する器官組織 - 培養皿中に移し、37 /5%CO₂のインキュベーターにおいて一晩、貯蔵する。

【0345】

次の日、2細胞の胚を、偽妊娠受容体中に移す。受容体は、精管切除されたdudsとの交配の後、膈栓の存在により同定される。受容体に麻酔をし、そして背面左側上の毛を剃り、そして手術用顕微鏡に移す。切開を、皮膚において、及び胸郭、背部及び後脚により概略される腹部の中央、すなわち膝と脾臓との間の中途まで筋肉壁を通して行う。生殖器官を、小さな手術用ドレープ上に切除する。脂肪パッドを、手術用ドレープ上に広げ、そして子供用止血小鉗子 (Roboz, Rockville, MD) を、脂肪パッドに取り付け、そしてマウスの背部上をつるし、器官が腹部にスライドすることを防ぐ。

20

【0346】

鉱油、続いて交互にW640及び空気気泡を含む精巧なトランスファーピペットにより、前日の注入からの12~17個の健康な2 - 細胞胚を、受容体中に移す。膨張した膨大部を位置決定し、そしてその膨大部と包との間の卵管を保持し、卵管の刻み目を前記包に隣接して、28gの針により行い、膨大部又は包を裂かないことを確かめる。

【0347】

ピペットを、卵管における刻み目に移し、そして胚を吹き込み、最初の空気気泡のピペットからの除去を可能にする。脂肪パッドを軽く、腹膜中に押し込み、そして生殖器官を滑り込ませる。腹膜壁を、1つの縫合により閉じ、そして皮膚を傷口用クリップにより閉じる。マウスは、少なくとも4時間、37 の暖かなスライド上で回復した。

30

受容体を、対でカゴに戻し、そして19 - 21日の妊娠を可能にする。誕生後、19 - 21日の産後を、離乳の前に可能にする。離乳子供の性別を鑑別し、そして別々の性別のカゴに入れ、そして0.5cmの生検 (遺伝子型識別のために使用される) を、尾から、無菌のハサミにより取る。

【0348】

ゲノムDNAを、QIAGEN DNEASYキットを用いて、その製造業者の説明書に従って、切り取られた尾から調製する。ゲノムDNAを、同じプラスミドに導入されたZcytor 14遺伝子又は選択マーカー遺伝子を増幅するために企画されたプライマーを用いて、PCRにより分析する。動物がトランスジェニックであることが確かめられた後、それらは、トランスジェニック雌を野生型雄と共に、又はトランスジェニック雄を1又は複数の野生型雌と共に配置することによって、近交系に戻し交雑する。子供が生まれ、そして離乳され、性別を分け、そしてそれらの尾を、遺伝子型識別のために切り取る。

40

【0349】

生存動物におけるトランスジーンの発現について調べるために、部分肝切除を行う。手術準備を、zyphoid工程下で直接的に上部腹部に行う。無菌技法を用いて、小さな1.5 - 2cmの切開を、胸骨下で行い、そして肝臓の左側葉を取り出す。4 - 0絹糸を用いて、下部葉を体腔外に確保するために、その下部葉の回りを縛る。クランプを用いて、その結び目を

50

保持し、そして吸収性Dexon (American Cyanamid; Wayne, N. J.) の第2ループを、最初の結び目に隣接して配置する。遠位切断をDexon結び目から行い、そして約100mgの切除された肝臓組織を、無菌ペトリ皿に配置する。

【0350】

切除された肝臓切片を、14mlのポリプロピレン丸底管に移し、そして液体窒素において凍結し、そして次に、ドライアイス上に貯蔵する。手術部位を、縫合及び傷口用クリップにより閉じ、そして動物のカゴを、37℃で加熱されるパッド上に、手術の後、24時間、配置する。動物を手術の後、毎日調べ、そして傷口用クリップを、手術の7 - 10日後に取り除く。Zcytor 14 mRNAの発現レベルを、RNA溶液ハイブリダイゼーションアッセイ又はポリメラーゼ鎖反応を用いて、個々のトランスジェニックマウスについて試験する。

10

【0351】

Zcytor 14を過剰発現するトランスジェニックマウスを生成する他に、その遺伝子を異常に低く発現するか、又はまったく発現しないトランスジェニックマウスを構築することは有用である。そのようなトランスジェニックマウスは、Zcytor 14の欠失に関連する疾病のための有用なモデルを提供する。上記で論じられたように、Zcytor 14遺伝子発現は、アンチセンス遺伝子、リボザイム遺伝子、又は外部案内配列遺伝子を用いて阻害され得る。

【0352】

Zcytor 14遺伝子を過少発現するトランスジェニックマウスを生成するためには、そのような阻害配列がZcytor 14 mRNAに標的化される。特定の遺伝子の異常に低い発現をトランスジェニックマウスを生成するための方法は、当業者に知られている（例えば、Wuなど、*“Gene Under Expression in Cultured Cells and Animals by Antisense DNA and DNA Strategies”* in *Methods in Gene Biotechnology*, p. 205-224 (CRC Press 1997) を参照のこと）。

20

【0353】

Zcytor 14遺伝子発現をほとんどか又はまったく有さないトランスジェニックマウスを生成するための他のアプローチは、非官能性Zcytor 14遺伝子により置換された、少なくとも1つの正常Zcytor 14対立遺伝子を有するマウスを生成することである。非官能性Zcytor 14遺伝子を企画する1つの方法は、もう1つの遺伝子、例えば選択マーカー遺伝子を、Zcytor 14をコードする核酸分子内に挿入することである。

30

【0354】

いわゆるそれらの“ノックアウトマウス”を生成するための標準の方法は、当業者に知られている（例えば、Jacob, *“Expression and Knockout of Interferons in Transgenic Mice,”* in *Overexpression and Knockout of Cytokines in Transgenic Mice*, Jacob (ed.), Pages 111-124 (Academic Press, Ltd, 1994), 及びWuなど、*“New Strategies for Gene Knockout,”* in *Methods in Gene Biotechnology*, Pages 339-365 (CRC Press 1997)を参照のこと）。

一般的に記載されて来た本発明は、次ぎの例により容易に理解されるであろう。但し、それらの例は、本発明を制限するものではない。

【0355】

40

実施例

例1 . Zcytor 14遺伝子の発現

ノザン分析を、Human Multiple Tissue Blots (CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) を用いて行った。2種のプローブを、ゲル精製されたPCR生成物から生成した。第1のプローブを、プライマーとして、ZC21798 (5' CGG CGT GGT GGT CTT GCT CTT 3' ; 配列番号8) 及びZC21808 (5' TCC CGT CCC CCG CCC CAG GTC 3' ; 配列番号9) を用いて製造した。前記プローブを、Amersham (Arlington Heights, IL) からのMultiprime ラベリングキットを用いて、製造業者のプロトコールに従って、放射性ラベルした。プローブを、NUCTRAPプッシュカラム (STRATAGENE, La Jolla, CA) を用いて精製した。

【0356】

50

EXPRESSHYB (CLONTECH) 溶液を、ノザンプロットのためのプレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーション溶液のために使用した。ハイブリダイゼーションは、65 で一晩、行われた。ハイブリダイゼーションに続いて、プロットを、0.1%のSDS及びSSCを含む溶液において次の通りに、それぞれ30分間、洗浄した：2 × SSCにおいて室温で2度、0.1 × SSCにおいて50 で3度、0.1 × SSCにおいて55 で1度、及び0.1 × SSCにおいて65 で1度。結果は、Zcytor 14遺伝子が甲状腺、副腎、前立腺及び肝臓組織において強く発現され、そして心臓、小腸、胃及び気管組織においてより低い程度、発現されることを示した。対照的に、脳、胎盤、肺、骨格筋、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、精巣、卵巣、結腸、末梢白血球、脊髄、リンパ節及び骨髄においては、ほとんどか、又はまったく発現は存在しなかった。

10

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> ZymoGenetics, Inc.

<120> Human Cytokine Receptor

<130> 99-50

<160> 12

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0 20

<210> 1

<211> 2255

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (154)...(2229)

<400> 1 30

aactaccag cacagcccc tccgccccct ctggaggctg aagagggatt ccagcccctg 60

ccaccacag acacgggctg actgggggtg ctgccccct tggggggggg cagcacagg 120

cctcaggcct gggtgccacc tggcacctag aag atg cct gtg ccc tgg ttc ttg 174

Met Pro Val Pro Trp Phe Leu

1 5

ctg tcc ttg gca ctg ggc cga agc cca gtg gtc ctt tct ctg gag agg 222

Leu Ser Leu Ala Leu Gly Arg Ser Pro Val Val Leu Ser Leu Glu Arg

10 15 20

ctt gtg ggg cct cag gac gct acc cac tgc tct ccg ggc ctc tcc tgc 270

Leu Val Gly Pro Gln Asp Ala Thr His Cys Ser Pro Gly Leu Ser Cys 40

25 30 35

cgc ctc tgg gac agt gac ata ctc tgc ctg cct ggg gac atc gtg cct 318

Arg Leu Trp Asp Ser Asp Ile Leu Cys Leu Pro Gly Asp Ile Val Pro

40 45 50 55

gct ccg ggc ccc gtg ctg gcg cct acg cac ctg cag aca gag ctg gtg 366

Ala Pro Gly Pro Val Leu Ala Pro Thr His Leu Gln Thr Glu Leu Val

60	65	70				
ctg agg tgc cag aag gag acc gac tgt gac ctc tgt ctg cgt gtg gct Leu Arg Cys Gln Lys Glu Thr Asp Cys Asp Leu Cys Leu Arg Val Ala	75	80	85	414		
gtc cac ttg gcc gtg cat ggg cac tgg gaa gag cct gaa gat gag gaa Val His Leu Ala Val His Gly His Trp Glu Glu Pro Glu Asp Glu Glu	90	95	100	462		
aag ttt gga gga gca gct gac tca ggg gtg gag gag cct agg aat gcc Lys Phe Gly Gly Ala Ala Asp Ser Gly Val Glu Glu Pro Arg Asn Ala	105	110	115	510	10	
tct ctc cag gcc caa gtc gtg ctc tcc ttc cag gcc tac cct act gcc Ser Leu Gln Ala Gln Val Val Leu Ser Phe Gln Ala Tyr Pro Thr Ala	120	125	130	135	558	
cgc tgc gtc ctg ctg gag gtg caa gtg cct gct gcc ctt gtg cag ttt Arg Cys Val Leu Leu Glu Val Gln Val Pro Ala Ala Leu Val Gln Phe	140	145	150	606		
ggt cag tct gtg ggc tct gtg gta tat gac tgc ttc gag gct gcc cta Gly Gln Ser Val Gly Ser Val Val Tyr Asp Cys Phe Glu Ala Ala Leu	155	160	165	654	20	
ggg agt gag gta cga atc tgg tcc tat act cag ccc agg tac gag aag Gly Ser Glu Val Arg Ile Trp Ser Tyr Thr Gln Pro Arg Tyr Glu Lys	170	175	180	702		
gaa ctc aac cac aca cag cag ctg cct gcc ctg ccc tgg ctc aac gtg Glu Leu Asn His Thr Gln Gln Leu Pro Ala Leu Pro Trp Leu Asn Val	185	190	195	750		
tca gca gat ggt gac aac gtg cat ctg gtt ctg aat gtc tct gag gag Ser Ala Asp Gly Asp Asn Val His Leu Val Leu Asn Val Ser Glu Glu	200	205	210	215	798	30
cag cac ttc ggc ctc tcc ctg tac tgg aat cag gtc cag ggc ccc cca Gln His Phe Gly Leu Ser Leu Tyr Trp Asn Gln Val Gln Gly Pro Pro	220	225	230	846		
aaa ccc cgg tgg cac aaa aac ctg act gga ccg cag atc att acc ttg				894		

Lys Pro Arg Trp His Lys Asn Leu Thr Gly Pro Gln Ile Ile Thr Leu		
235	240	245
aac cac aca gac ctg gtt ccc tgc ctc tgt att cag gtg tgg cct ctg	942	
Asn His Thr Asp Leu Val Pro Cys Leu Cys Ile Gln Val Trp Pro Leu		
250	255	260
gaa cct gac tcc gtt agg acg aac atc tgc ccc ttc agg gag gac ccc	990	
Glu Pro Asp Ser Val Arg Thr Asn Ile Cys Pro Phe Arg Glu Asp Pro		
265	270	275
cgc gca cac cag aac ctc tgg caa gcc gcc cga ctg cga ctg ctg acc	1038	10
Arg Ala His Gln Asn Leu Trp Gln Ala Ala Arg Leu Arg Leu Leu Thr		
280	285	290
295		
ctg cag agc tgg ctg ctg gac gca ccg tgc tcg ctg ccc gca gaa gcg	1086	
Leu Gln Ser Trp Leu Leu Asp Ala Pro Cys Ser Leu Pro Ala Glu Ala		
300	305	310
gca ctg tgc tgg cgg gct ccg ggt ggg gac ccc tgc cag cca ctg gtc	1134	
Ala Leu Cys Trp Arg Ala Pro Gly Gly Asp Pro Cys Gln Pro Leu Val		
315	320	325
cca ccg ctt tcc tgg gag aac gtc act gtg gac aag gtt ctc gag ttc	1182	20
Pro Pro Leu Ser Trp Glu Asn Val Thr Val Asp Lys Val Leu Glu Phe		
330	335	340
cca ttg ctg aaa ggc cac cct aac ctc tgt gtt cag gtg aac agc tcg	1230	
Pro Leu Leu Lys Gly His Pro Asn Leu Cys Val Gln Val Asn Ser Ser		
345	350	355
gag aag ctg cag ctg cag gag tgc ttg tgg gct gac tcc ctg ggg cct	1278	
Glu Lys Leu Gln Leu Gln Glu Cys Leu Trp Ala Asp Ser Leu Gly Pro		
360	365	370
375		
ctc aaa gac gat gtg cta ctg ttg gag aca cga ggc ccc cag gac aac	1326	30
Leu Lys Asp Asp Val Leu Leu Leu Glu Thr Arg Gly Pro Gln Asp Asn		
380	385	390
aga tcc ctc tgt gcc ttg gaa ccc agt ggc tgt act tca cta ccc agc	1374	
Arg Ser Leu Cys Ala Leu Glu Pro Ser Gly Cys Thr Ser Leu Pro Ser		
395	400	405

aaa gcc tcc acg agg gca gct cgc ctt gga gag tac tta cta caa gac	1422	
Lys Ala Ser Thr Arg Ala Ala Arg Leu Gly Glu Tyr Leu Leu Gln Asp		
410 415 420		
ctg cag tca ggc cag tgt ctg cag cta tgg gac gat gac ttg gga gcg	1470	
Leu Gln Ser Gly Gln Cys Leu Gln Leu Trp Asp Asp Asp Leu Gly Ala		
425 430 435		
cta tgg gcc tgc ccc atg gac aaa tac atc cac aag cgc tgg gcc ctc	1518	
Leu Trp Ala Cys Pro Met Asp Lys Tyr Ile His Lys Arg Trp Ala Leu		
440 445 450 455		10
gtg tgg ctg gcc tgc cta ctc ttt gcc gct gcg ctt tcc ctc atc ctc	1566	
Val Trp Leu Ala Cys Leu Leu Phe Ala Ala Ala Leu Ser Leu Ile Leu		
460 465 470		
ctt ctc aaa aag gat cac gcg aaa gcg gcc gcc agg ggc cgc gcg gct	1614	
Leu Leu Lys Lys Asp His Ala Lys Ala Ala Ala Arg Gly Arg Ala Ala		
475 480 485		
ctg ctc ctc tac tca gcc gat gac tcg ggt ttc gag cgc ctg gtg ggc	1662	
Leu Leu Leu Tyr Ser Ala Asp Asp Ser Gly Phe Glu Arg Leu Val Gly		
490 495 500		20
gcc ctg gcg tcg gcc ctg tgc cag ctg ceg ctg cgc gtg gcc gta gac	1710	
Ala Leu Ala Ser Ala Leu Cys Gln Leu Pro Leu Arg Val Ala Val Asp		
505 510 515		
ctg tgg agc cgt cgt gaa ctg agc gcg cag ggg ccc gtg gct tgg ttt	1758	
Leu Trp Ser Arg Arg Glu Leu Ser Ala Gln Gly Pro Val Ala Trp Phe		
520 525 530 535		
cac gcg cag cgg cgc cag acc ctg cag gag ggc ggc gtg gtg gtc ttg	1806	
His Ala Gln Arg Arg Gln Thr Leu Gln Glu Gly Gly Val Val Val Leu		
540 545 550		30
ctc ttc tct ccc ggt gcg gtg gcg ctg tgc agc gag tgg cta cag gat	1854	
Leu Phe Ser Pro Gly Ala Val Ala Leu Cys Ser Glu Trp Leu Gln Asp		
555 560 565		
ggg gtg tcc ggg ccc ggg gcg cac ggc cgg cac gac gcc ttc cgc gcc	1902	
Gly Val Ser Gly Pro Gly Ala His Gly Pro His Asp Ala Phe Arg Ala		

570	575	580		
tcg ctc agc tgc gtg ctg ccc gac ttc ttg cag ggc cgg gcg ccc ggc			1950	
Ser Leu Ser Cys Val Leu Pro Asp Phe Leu Gln Gly Arg Ala Pro Gly				
585	590	595		
agc tac gtg ggg gcc tgc ttc gac agg ctg ctc cac ccg gac gcc gta			1998	
Ser Tyr Val Gly Ala Cys Phe Asp Arg Leu Leu His Pro Asp Ala Val				
600	605	610	615	
ccc gcc ctt ttc cgc acc gtg ccc gtc ttc aca ctg ccc tcc caa ctg			2046	
Pro Ala Leu Phe Arg Thr Val Pro Val Phe Thr Leu Pro Ser Gln Leu				10
620	625	630		
cca gac ttc ctg ggg gcc ctg cag cag cct cgc gcc ccg cgt tcc ggg			2094	
Pro Asp Phe Leu Gly Ala Leu Gln Gln Pro Arg Ala Pro Arg Ser Gly				
635	640	645		
cgg ctc caa gag aga gcg gag caa gtg tcc cgg gcc ctt cag cca gcc			2142	
Arg Leu Gln Glu Arg Ala Glu Gln Val Ser Arg Ala Leu Gln Pro Ala				
650	655	660		
ctg gat agc tac ttc cat ccc ccg ggg act ccc gcg ccg gga cgc ggg			2190	
Leu Asp Ser Tyr Phe His Pro Pro Gly Thr Pro Ala Pro Gly Arg Gly				20
665	670	675		
gtg gga cca ggg gcg gga cct ggg gcg ggg gac ggg act taaataaagg			2239	
Val Gly Pro Gly Ala Gly Pro Gly Ala Gly Asp Gly Thr				
680	685	690		
cagacgctgt ttttct			2255	
<210> 2				
<211> 692				
<212> PRT				30
<213> Homo sapiens				
<400> 2				
Met Pro Val Pro Trp Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Gly Arg Ser Pro				
1	5	10	15	
Val Val Leu Ser Leu Glu Arg Leu Val Gly Pro Gln Asp Ala Thr His				
20	25	30		

Cys Ser Pro Gly Leu Ser Cys Arg Leu Trp Asp Ser Asp Ile Leu Cys
35 40 45
Leu Pro Gly Asp Ile Val Pro Ala Pro Gly Pro Val Leu Ala Pro Thr
50 55 60
His Leu Gln Thr Glu Leu Val Leu Arg Cys Gln Lys Glu Thr Asp Cys
65 70 75 80
Asp Leu Cys Leu Arg Val Ala Val His Leu Ala Val His Gly His Trp
85 90 95
Glu Glu Pro Glu Asp Glu Glu Lys Phe Gly Gly Ala Ala Asp Ser Gly
100 105 110
Val Glu Glu Pro Arg Asn Ala Ser Leu Gln Ala Gln Val Val Leu Ser
115 120 125
Phe Gln Ala Tyr Pro Thr Ala Arg Cys Val Leu Leu Glu Val Gln Val
130 135 140
Pro Ala Ala Leu Val Gln Phe Gly Gln Ser Val Gly Ser Val Val Tyr
145 150 155 160
Asp Cys Phe Glu Ala Ala Leu Gly Ser Glu Val Arg Ile Trp Ser Tyr
165 170 175
Thr Gln Pro Arg Tyr Glu Lys Glu Leu Asn His Thr Gln Gln Leu Pro
180 185 190
Ala Leu Pro Trp Leu Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Val His Leu
195 200 205
Val Leu Asn Val Ser Glu Glu Gln His Phe Gly Leu Ser Leu Tyr Trp
210 215 220
Asn Gln Val Gln Gly Pro Pro Lys Pro Arg Trp His Lys Asn Leu Thr
225 230 235 240
Gly Pro Gln Ile Ile Thr Leu Asn His Thr Asp Leu Val Pro Cys Leu
245 250 255
Cys Ile Gln Val Trp Pro Leu Glu Pro Asp Ser Val Arg Thr Asn Ile
260 265 270
Cys Pro Phe Arg Glu Asp Pro Arg Ala His Gln Asn Leu Trp Gln Ala
275 280 285
Ala Arg Leu Arg Leu Leu Thr Leu Gln Ser Trp Leu Leu Asp Ala Pro
290 295 300
Cys Ser Leu Pro Ala Glu Ala Ala Leu Cys Trp Arg Ala Pro Gly Gly
305 310 315 320
Asp Pro Cys Gln Pro Leu Val Pro Pro Leu Ser Trp Glu Asn Val Thr
325 330 335
Val Asp Lys Val Leu Glu Phe Pro Leu Leu Lys Gly His Pro Asn Leu
340 345 350
Cys Val Gln Val Asn Ser Ser Glu Lys Leu Gln Leu Gln Glu Cys Leu
355 360 365

10

20

30

Trp Ala Asp Ser Leu Gly Pro Leu Lys Asp Asp Val Leu Leu Leu Glu
370 375 380
Thr Arg Gly Pro Gln Asp Asn Arg Ser Leu Cys Ala Leu Glu Pro Ser
385 390 395 400
Gly Cys Thr Ser Leu Pro Ser Lys Ala Ser Thr Arg Ala Ala Arg Leu
405 410 415
Gly Glu Tyr Leu Leu Gln Asp Leu Gln Ser Gly Gln Cys Leu Gln Leu
420 425 430
Trp Asp Asp Asp Leu Gly Ala Leu Trp Ala Cys Pro Met Asp Lys Tyr
435 440 445
Ile His Lys Arg Trp Ala Leu Val Trp Leu Ala Cys Leu Leu Phe Ala
450 455 460
Ala Ala Leu Ser Leu Ile Leu Leu Leu Lys Lys Asp His Ala Lys Ala
465 470 475 480
Ala Ala Arg Gly Arg Ala Ala Leu Leu Leu Tyr Ser Ala Asp Asp Ser
485 490 495
Gly Phe Glu Arg Leu Val Gly Ala Leu Ala Ser Ala Leu Cys Gln Leu
500 505 510
Pro Leu Arg Val Ala Val Asp Leu Trp Ser Arg Arg Glu Leu Ser Ala
515 520 525
Gln Gly Pro Val Ala Trp Phe His Ala Gln Arg Arg Gln Thr Leu Gln
530 535 540
Glu Gly Gly Val Val Val Leu Leu Phe Ser Pro Gly Ala Val Ala Leu
545 550 555 560
Cys Ser Glu Trp Leu Gln Asp Gly Val Ser Gly Pro Gly Ala His Gly
565 570 575
Pro His Asp Ala Phe Arg Ala Ser Leu Ser Cys Val Leu Pro Asp Phe
580 585 590
Leu Gln Gly Arg Ala Pro Gly Ser Tyr Val Gly Ala Cys Phe Asp Arg
595 600 605
Leu Leu His Pro Asp Ala Val Pro Ala Leu Phe Arg Thr Val Pro Val
610 615 620
Phe Thr Leu Pro Ser Gln Leu Pro Asp Phe Leu Gly Ala Leu Gln Gln
625 630 635 640
Pro Arg Ala Pro Arg Ser Gly Arg Leu Gln Glu Arg Ala Glu Gln Val
645 650 655
Ser Arg Ala Leu Gln Pro Ala Leu Asp Ser Tyr Phe His Pro Pro Gly
660 665 670
Thr Pro Ala Pro Gly Arg Gly Val Gly Pro Gly Ala Gly Pro Gly Ala
675 680 685
Gly Asp Gly Thr
690

10

20

30

<210> 3
 <211> 2076
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> This degenerate sequence encodes the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.

<221> variation
 <222> (1)...(2076)
 <223> N is any nucleotide

10

<221> misc_feature
 <222> (1)...(2076)
 <223> n = A,T,C or G

<400> 3

```

atgccngtnc cntggttyt nytnwsnytn gcnytnngnm gnwsnccngt ngtnytnwsn      60
ytnrgarmgny tngtngncc ncargaygcn acncaytgyw snccnggnyt nwsntgymgn      120
ytntgggayw sngayathyt ntgyytnccn ggngayathg tncngcncc nggnccngtn      180
ytngcnccna cncayytnc racngarytn gtnytnmgnt gycaraarga racngaytgy      240
gayytnntgy tnmngntngc ngtnccaytn gcngtncayg gncaytggga rgarccngar      300
gaygargara arttyggngg ngcngcngay wsngngtng argarccnmg naaygcnwsn      360
ytnrcargcnc argtngtnyt nwsnttycar gentayccna cngcnmgntg ygtnytnytn      420
gargtncarg tncngcngc nytngtncar ttyggncarw sngtnggnws ngtngtntay      480
gaytgyttyg argcngcnyt nggnwsngar gtnmgnatht ggwsntayac ncarccnmgn      540
taygaraarg arytnaayca yacncarc ar ytnccngcny tncntgggt naaygtnwsn      600
gengayggng ayaaygtnc yytngtnytn aaygtnwsng argarcarca yttyggnytn      660
wsnytnntayt ggaaycargt ncarggnccn ccnaarccnm gntggcayaa raayytnacn      720
ggccncara thathacnyt naaycayacn gayytngtnc cntgyytntg yathcargtn      780
tggccnytn arcngayws ngtnmgnacn aayathgyc cnttymgnga rgayccnmgn      840
gncaycara ayytnntggca rgcngcnmgn ytnmgnytny tnacnytnca rwsntggytn      900
ytngaygcnc cntgywsnyt nccngcngar gcngcnytn gytggmgngc nccngnggn      960
gayccntgyc arcnytngt nccncnytn wsntgggara aygtnacngt ngayaargtn      1020
ytngarttyc cnytnytnaa rggncayccn aayytnntgy tncargtnaa ywsnwsngar      1080
aarytnary tncargartg yytnntggcn gaywsnytn gncnytnaa rgaygaygtn      1140
ytnytnytng arcnmgngg nccncargay aaymgnwsny tntgygcnyt ngarccnwsn      1200
ggntgyacnw snytnccnws naargcnwsn acnmngcng cnmgnytnng ngartayytn      1260
ytnrcargay tncarwsng ncartgyytn carytnntgg aygaygayt nggngcnytn      1320
tggcntgyc cnatggayaa rtayathcay aarmngtgg cnytngtntg gytngcntgy      1380
ytnytnntty cngcngcnyt nwsnytnath ytnytnytna araargayca ygcnaargcn      1440

```

20

30

gcngcnmgng gnmngcngc nytnytnyt taywsngcng aygaywsngg nttygarmgn 1500
ytngtnggng cnytnngnws ngcnytnngy carytnccny tnmngngtngc ngtnngaytn 1560
tggwsnmgnm gngarytnws ngcncarggn ccngtngcnt ggttycaygc ncarngnmgn 1620
caracnytn argargngg ngtnngtn ytntnttyw snccngngc ngtnngcnytn 1680
tgywsngart ggytnarga yggngtnwsn ggncngngg cncayggnc ncaygaygn 1740
tymngncnw snytnwsntg ygtntnccn gayttytnc argngmngc nccnggnwsn 1800
taygtnggng cntgyttyga ymgnytntn cayccngayg cngtnccngc nytnttymgn 1860
acngtnccng tnttyacny nccnwsncar ytncngayt tytngngc nytncarc 1920
ccnmngcnc cnmgnwsngg nmgnytncar garmngcng arcargtnws nmngcnytn 1980
carcngcny tngaywsnta yttcayccn ccnggnacnc cngcncngg nmngngngtn 2040
gncngngg cngngccng ngcngngay ggnacn 2076

10

<210> 4
<211> 1753
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (2)...(1726)

<400> 4

g gag gag cct agg aat gcc tct ctc cag gcc caa gtc gtg ctc tcc ttc 49
Glu Glu Pro Arg Asn Ala Ser Leu Gln Ala Gln Val Val Leu Ser Phe 20
1 5 10 15

cag gcc tac cct act gcc cgc tgc gtc ctg ctg gag gtg caa gtg cct 97
Gln Ala Tyr Pro Thr Ala Arg Cys Val Leu Leu Glu Val Gln Val Pro
20 25 30

gct gcc ctt gtg cag ttt ggt cag tct gtg ggc tct gtg gta tat gac 145
Ala Ala Leu Val Gln Phe Gly Gln Ser Val Gly Ser Val Val Tyr Asp
35 40 45

tgc ttc gag gct gcc cta ggg agt gag gta cga atc tgg tcc tat act 193 30
Cys Phe Glu Ala Ala Leu Gly Ser Glu Val Arg Ile Trp Ser Tyr Thr
50 55 60

cag ccc agg tac gag aag gaa ctc aac cac aca cag cag ctg cct gcc 241
Gln Pro Arg Tyr Glu Lys Glu Leu Asn His Thr Gln Gln Leu Pro Ala
65 70 75 80

ctg ccc tgg ctc aac gtg tca gca gat ggt gac aac gtg cat ctg gtt 289

Leu Pro Trp	Leu Asn Val	Ser Ala Asp	Gly Asp Asn Val	His Leu Val		
	85		90	95		
ctg aat gtc tct gag gag cag cac ttc ggc ctc tcc ctg tac tgg aat					337	
Leu Asn Val Ser Glu Glu Gln His Phe Gly Leu Ser Leu Tyr Trp Asn	100		105	110		
cag gtc cag ggc ccc cca aaa ccc cgg tgg cac aaa aac ctg act gga					385	
Gln Val Gln Gly Pro Pro Lys Pro Arg Trp His Lys Asn Leu Thr Gly	115		120	125		
ccg cag atc att acc ttg aac cac aca gac ctg gtt ccc tgc ctc tgt					433	10
Pro Gln Ile Ile Thr Leu Asn His Thr Asp Leu Val Pro Cys Leu Cys	130		135	140		
att cag gtg tgg cct ctg gaa cct gac tcc gtt agg acg aac atc tgc					481	
Ile Gln Val Trp Pro Leu Glu Pro Asp Ser Val Arg Thr Asn Ile Cys	145		150	155	160	
ccc ttc agg gag gac ccc cgc gca cac cag aac ctc tgg caa gcc gcc					529	
Pro Phe Arg Gln Asp Pro Arg Ala His Gln Asn Leu Trp Gln Ala Ala	165		170	175		
cga ctg cga ctg ctg acc ctg cag agc tgg ctg ctg gac gca ccg tgc					577	20
Arg Leu Arg Leu Leu Thr Leu Gln Ser Trp Leu Leu Asp Ala Pro Cys	180		185	190		
tcg ctg ccc gca gaa gcg gca ctg tgc tgg cgg gct ccg ggt ggg gac					625	
Ser Leu Pro Ala Glu Ala Ala Leu Cys Trp Arg Ala Pro Gly Gly Asp	195		200	205		
ccc tgc cag cca ctg gtc cca ccg ctt tcc tgg gag aac gtc act gtg					673	
Pro Cys Gln Pro Leu Val Pro Pro Leu Ser Trp Glu Asn Val Thr Val	210		215	220		
gac gtg aac agc tcg gag aag ctg cag ctg cag gag tgc ttg tgg gct					721	
Asp Val Asn Ser Ser Glu Lys Leu Gln Leu Gln Glu Cys Leu Trp Ala	225		230	235	240	
gac tcc ctg ggg cct ctc aaa gac gat gtg cta ctg ttg gag aca cga					769	
Asp Ser Leu Gly Pro Leu Lys Asp Asp Val Leu Leu Leu Glu Thr Arg	245		250	255		

ggc ccc cag gac aac aga tcc ctc tgt gcc ttg gaa ccc agt ggc tgt	817	
Gly Pro Gln Asp Asn Arg Ser Leu Cys Ala Leu Glu Pro Ser Gly Cys		
260 265 270		
act tca cta ccc agc aaa gcc tcc acg agg gca gct cgc ctt gga gag	865	
Thr Ser Leu Pro Ser Lys Ala Ser Thr Arg Ala Ala Arg Leu Gly Glu		
275 280 285		
tac tta cta caa gac ctg cag tca ggc cag tgt ctg cag cta tgg gac	913	
Tyr Leu Leu Gln Asp Leu Gln Ser Gly Gln Cys Leu Gln Leu Trp Asp		
290 295 300		10
gat gac ttg gga gcg cta tgg gcc tgc ccc atg gac aaa tac atc cac	961	
Asp Asp Leu Gly Ala Leu Trp Ala Cys Pro Met Asp Lys Tyr Ile His		
305 310 315 320		
aag cgc tgg gcc ctc gtg tgg ctg gcc tgc cta ctc ttt gcc gct gcg	1009	
Lys Arg Trp Ala Leu Val Trp Leu Ala Cys Leu Leu Phe Ala Ala Ala		
325 330 335		
ctt tcc ctc atc ctc ctt ctc aaa aag gat cac gcg aaa ggg tgg ctg	1057	
Leu Ser Leu Ile Leu Leu Leu Lys Lys Asp His Ala Lys Gly Trp Leu		
340 345 350		20
agg ctc ttg aaa cag gac gtc cgc tcg ggg gcg gcc gcc agg ggc cgc	1105	
Arg Leu Leu Lys Gln Asp Val Arg Ser Gly Ala Ala Ala Arg Gly Arg		
355 360 365		
gcg gct ctg ctc ctc tac tca gcc gat gac tcg ggt ttc gag cgc ctg	1153	
Ala Ala Leu Leu Leu Tyr Ser Ala Asp Asp Ser Gly Phe Glu Arg Leu		
370 375 380		
gtg ggc gcc ctg gcg tcg gcc ctg tgc cag ctg ccg ctg cgc gtg gcc	1201	
Val Gly Ala Leu Ala Ser Ala Leu Cys Gln Leu Pro Leu Arg Val Ala		
385 390 395 400		30
gta gac ctg tgg agc cgt cgt gaa ctg agc gcg cag ggg ccc gtg gct	1249	
Val Asp Leu Trp Ser Arg Arg Glu Leu Ser Ala Gln Gly Pro Val Ala		
405 410 415		
tgg ttt cac gcg cag cgg cgc cag acc ctg cag gag ggc gcc gtg gtg	1297	
Trp Phe His Ala Gln Arg Arg Gln Thr Leu Gln Glu Gly Gly Val Val		

420	425	430		
gtc ttg etc ttc tct ccc ggt gcg gtg gcg ctg tgc agc gag tgg cta			1345	
Val Leu Leu Phe Ser Pro Gly Ala Val Ala Leu Cys Ser Glu Trp Leu				
435	440	445		
cag gat ggg gtg tcc ggg ccc ggg gcg cac ggc ccg cac gac gcc ttc			1393	
Gln Asp Gly Val Ser Gly Pro Gly Ala His Gly Pro His Asp Ala Phe				
450	455	460		
cgc gcc tcg etc agc tgc gtg ctg ccc gac ttc ttg cag ggc cgg gcg			1441	10
Arg Ala Ser Leu Ser Cys Val Leu Pro Asp Phe Leu Gln Gly Arg Ala				
465	470	475	480	
ccc ggc agc tac gtg ggg gcc tgc ttc gac agg ctg etc cac ccg gac			1489	
Pro Gly Ser Tyr Val Gly Ala Cys Phe Asp Arg Leu Leu His Pro Asp				
485	490	495		
gcc gta ccc gcc ctt ttc cgc acc gtg ccc gtc ttc aca ctg ccc tcc			1537	
Ala Val Pro Ala Leu Phe Arg Thr Val Pro Val Phe Thr Leu Pro Ser				
500	505	510		
caa ctg cca gac ttc ctg ggg gcc ctg cag cag cct cgc gcc ccg cgt			1585	20
Gln Leu Pro Asp Phe Leu Gly Ala Leu Gln Gln Pro Arg Ala Pro Arg				
515	520	525		
tcc ggg cgg etc caa gag aga gcg gag caa gtg tcc cgg gcc ctt cag			1633	
Ser Gly Arg Leu Gln Glu Arg Ala Glu Gln Val Ser Arg Ala Leu Gln				
530	535	540		
cca gcc ctg gat agc tac ttc cat ccc ccg ggg act ccc gcg ccg gga			1681	
Pro Ala Leu Asp Ser Tyr Phe His Pro Pro Gly Thr Pro Ala Pro Gly				
545	550	555	560	
cgc ggg gtg gga cca ggg gcg gga cct ggg gcg ggg gac ggg act			1726	30
Arg Gly Val Gly Pro Gly Ala Gly Pro Gly Ala Gly Asp Gly Thr				
565	570	575		
taaataaagg cagacgctgt ttttcta			1753	

<210> 5
 <211> 575
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

10

20

30

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

10

20

<210> 6
<211> 1725
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

30

<220>
<223> This degenerate sequence encodes the amino acid
sequence of SEQ ID NO:5.

<221> variation

<222> (1)...(1725)

<223> N is any nucleotide.

<221> misc_feature

<222> (1)...(1725)

<223> n = A,T,C or G

<400> 6

gargarccnm	gnaaygcnws	nytnrcargcn	cargtngtny	tnwsnttyca	rgcntayccn	60	
acngcnmgnt	gygtnytnyt	ngargtncar	gtncncngcng	cnytngtnc	rttyggncar	120	
wsngtnggnw	sngtngtnta	ygaytgytty	gargcngcny	tnggnwsnga	rgtnmgnath	180	10
tggwsntaya	cncarccnmg	ntaygaraar	garytnaayc	ayacncarca	rytnccngcn	240	
ytncctnggy	tnaaygtnws	ngcngayggn	gayaaygtnc	ayytngtnyt	naaygtnwsn	300	
gargarcarc	ayttyggnyt	nwsnyntay	tggaaycarg	tncarggncc	nccnaarccn	360	
mgntggcaya	araayytnac	nggncncar	athathacny	tnaaycayac	ngayytngtt	420	
ccntgyytn	gyathcargt	ntggccnytn	garccngayw	sngtnmgnac	naayathtgy	480	
ccntymgng	argayccnmg	ngcncaycar	aayytntggc	argcngcnmg	nytnmgnyt	540	
ytnacnytn	arwsntggyt	nytngaygcn	ccntgywsny	tncncngcga	rgcngcnytn	600	
tgytggmgng	cncngngng	ngayccntgy	carccnytn	tncncncny	nwsntgggar	660	
aaygtnacng	tngaygtnaa	ywsnwsngar	aarytnrcary	tncargartg	yytntgggcn	720	
gaywsnytn	gnccnytnaa	rgaygaygtn	ytnytnytn	aracnmngng	nccncargay	780	
aaymgnwsny	tntgygcnyt	ngarccnwsn	ggntgyacnw	snytnccnws	naargcnwsn	840	
acnmngcng	cnmgnytngg	ngartayytn	ytncargay	tncarwsngg	ncartgyytn	900	20
carytntggg	aygaygayt	nggngcnytn	tgggcntgyc	cnatggayaa	rtayathcay	960	
aarmgntggg	cnytngtntg	gytngcntgy	ytnytnnty	cngcngcny	nwsnytnath	1020	
ytnytnytn	araargayca	ygcnaarggn	tggytnmgn	tnytnaarca	rgaygtnmgn	1080	
wsngngcng	cngcnmgng	nmgngcngcn	ytnytnytn	aywsngcga	ygaywsnggn	1140	
ttygarmgny	tngtngngc	nytnrcnwsn	gcnytntgyc	arytnccny	nmgngtngcn	1200	
gtngayytn	ggwsnmgnm	ngarytnwsn	gcncarggnc	cngtngcntg	gtycaygcn	1260	
carmgngnc	aracnytnca	rgargnggn	gtngtngtny	tnytnntyws	nccngngcnc	1320	
gtngcnytn	gywsngartg	gytnrcargay	ggngtnwsng	gnccngngc	ncayggncnc	1380	
caygaygcnt	tymngcnws	nytnwsntgy	gtnytnccng	ayttyytnca	rggnmgngcn	1440	
ccnggnwsnt	aygtngngc	ntgytgyay	mgnytntnc	ayccngaygc	ngtnccngcn	1500	
ytnntymgna	cngtnccngt	nttyacnytn	ccnwsncary	tnccngaytt	yytnngngcn	1560	
ytncarcarc	cnmgngcnc	nmgnwsnggn	mgnytncarg	armngngcga	rcargtnwsn	1620	30
mngngcnytn	arccngcny	ngaywsntay	ttycayccnc	cnggnacnc	ngcncnggn	1680	
mngngngtng	gnccngngc	nggncnggn	gcngngngay	gnacn		1725	

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide linker.

<400> 7

Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
1				5					10					15	

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> PCR primer

<400> 8

cggcgtgggtg gtcttgctct t 21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> PCR primer.

<400> 9

tcccgtcccc cgccccaggt c 21

<210> 10

<211> 688

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Chimeric Zcytor14 protein.

<400> 10

Met	Pro	Val	Pro	Trp	Phe	Leu	Leu	Ser	Leu	Ala	Leu	Gly	Arg	Ser	Pro
1				5					10					15	

Val	Val	Leu	Ser	Leu	Glu	Arg	Leu	Val	Gly	Pro	Gln	Asp	Ala	Thr	His
		20						25					30		

Cys Ser Pro Gly Leu Ser Cys Arg Leu Trp Asp Ser Asp Ile Leu Cys
35 40 45
Leu Pro Gly Asp Ile Val Pro Ala Pro Gly Pro Val Leu Ala Pro Thr
50 55 60
His Leu Gln Thr Glu Leu Val Leu Arg Cys Gln Lys Glu Thr Asp Cys
65 70 75 80
Asp Leu Cys Leu Arg Val Ala Val His Leu Ala Val His Gly His Trp
85 90 95
Glu Glu Pro Glu Asp Glu Glu Lys Phe Gly Gly Ala Ala Asp Ser Gly
100 105 110
Val Glu Glu Pro Arg Asn Ala Ser Leu Gln Ala Gln Val Val Leu Ser
115 120 125
Phe Gln Ala Tyr Pro Thr Ala Arg Cys Val Leu Leu Glu Val Gln Val
130 135 140
Pro Ala Ala Leu Val Gln Phe Gly Gln Ser Val Gly Ser Val Val Tyr
145 150 155 160
Asp Cys Phe Glu Ala Ala Leu Gly Ser Glu Val Arg Ile Trp Ser Tyr
165 170 175
Thr Gln Pro Arg Tyr Glu Lys Glu Leu Asn His Thr Gln Gln Leu Pro
180 185 190
Ala Leu Pro Trp Leu Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Val His Leu
195 200 205
Val Leu Asn Val Ser Glu Glu Gln His Phe Gly Leu Ser Leu Tyr Trp
210 215 220
Asn Gln Val Gln Gly Pro Pro Lys Pro Arg Trp His Lys Asn Leu Thr
225 230 235 240
Gly Pro Gln Ile Ile Thr Leu Asn His Thr Asp Leu Val Pro Cys Leu
245 250 255
Cys Ile Gln Val Trp Pro Leu Glu Pro Asp Ser Val Arg Thr Asn Ile
260 265 270
Cys Pro Phe Arg Glu Asp Pro Arg Ala His Gln Asn Leu Trp Gln Ala
275 280 285
Ala Arg Leu Arg Leu Leu Thr Leu Gln Ser Trp Leu Leu Asp Ala Pro
290 295 300
Cys Ser Leu Pro Ala Glu Ala Ala Leu Cys Trp Arg Ala Pro Gly Gly
305 310 315 320
Asp Pro Cys Gln Pro Leu Val Pro Pro Leu Ser Trp Glu Asn Val Thr
325 330 335
Val Asp Val Asn Ser Ser Glu Lys Leu Gln Leu Gln Glu Cys Leu Trp
340 345 350
Ala Asp Ser Leu Gly Pro Leu Lys Asp Asp Val Leu Leu Leu Glu Thr
355 360 365

10

20

30

Arg Gly Pro Gln Asp Asn Arg Ser Leu Cys Ala Leu Glu Pro Ser Gly
 370 375 380
 Cys Thr Ser Leu Pro Ser Lys Ala Ser Thr Arg Ala Ala Arg Leu Gly
 385 390 395 400
 Glu Tyr Leu Leu Gln Asp Leu Gln Ser Gly Gln Cys Leu Gln Leu Trp
 405 410 415
 Asp Asp Asp Leu Gly Ala Leu Trp Ala Cys Pro Met Asp Lys Tyr Ile
 420 425 430
 His Lys Arg Trp Ala Leu Val Trp Leu Ala Cys Leu Leu Phe Ala Ala
 435 440 445
 Ala Leu Ser Leu Ile Leu Leu Lys Lys Asp His Ala Lys Gly Trp
 450 455 460
 Leu Arg Leu Leu Lys Gln Asp Val Arg Ser Gly Ala Ala Ala Arg Gly
 465 470 475 480
 Arg Ala Ala Leu Leu Leu Tyr Ser Ala Asp Asp Ser Gly Phe Glu Arg
 485 490 495
 Leu Val Gly Ala Leu Ala Ser Ala Leu Cys Gln Leu Pro Leu Arg Val
 500 505 510
 Ala Val Asp Leu Trp Ser Arg Arg Glu Leu Ser Ala Gln Gly Pro Val
 515 520 525
 Ala Trp Phe His Ala Gln Arg Arg Gln Thr Leu Gln Glu Gly Gly Val
 530 535 540
 Val Val Leu Leu Phe Ser Pro Gly Ala Val Ala Leu Cys Ser Glu Trp
 545 550 555 560
 Leu Gln Asp Gly Val Ser Gly Pro Gly Ala His Gly Pro His Asp Ala
 565 570 575
 Phe Arg Ala Ser Leu Ser Cys Val Leu Pro Asp Phe Leu Gln Gly Arg
 580 585 590
 Ala Pro Gly Ser Tyr Val Gly Ala Cys Phe Asp Arg Leu Leu His Pro
 595 600 605
 Asp Ala Val Pro Ala Leu Phe Arg Thr Val Pro Val Phe Thr Leu Pro
 610 615 620
 Ser Gln Leu Pro Asp Phe Leu Gly Ala Leu Gln Gln Pro Arg Ala Pro
 625 630 635 640
 Arg Ser Gly Arg Leu Gln Glu Arg Ala Glu Gln Val Ser Arg Ala Leu
 645 650 655
 Gln Pro Ala Leu Asp Ser Tyr Phe His Pro Pro Gly Thr Pro Ala Pro
 660 665 670
 Gly Arg Gly Val Gly Pro Gly Ala Gly Pro Gly Ala Gly Asp Gly Thr
 675 680 685

10

20

30

<210> 11

<211> 705

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimeric Zcytor14 protein.

<400> 11

```

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

```

10

20

30

Ala Arg Leu Arg Leu Leu Thr Leu Gln Ser Trp Leu Leu Asp Ala Pro
 290 295 300
 Cys Ser Leu Pro Ala Glu Ala Ala Leu Cys Trp Arg Ala Pro Gly Gly
 305 310 315 320
 Asp Pro Cys Gln Pro Leu Val Pro Pro Leu Ser Trp Glu Asn Val Thr
 325 330 335
 Val Asp Lys Val Leu Glu Phe Pro Leu Leu Lys Gly His Pro Asn Leu
 340 345 350
 Cys Val Gln Val Asn Ser Ser Glu Lys Leu Gln Leu Gln Glu Cys Leu
 355 360 365
 Trp Ala Asp Ser Leu Gly Pro Leu Lys Asp Asp Val Leu Leu Leu Glu
 370 375 380
 Thr Arg Gly Pro Gln Asp Asn Arg Ser Leu Cys Ala Leu Glu Pro Ser
 385 390 395 400
 Gly Cys Thr Ser Leu Pro Ser Lys Ala Ser Thr Arg Ala Ala Arg Leu
 405 410 415
 Gly Glu Tyr Leu Leu Gln Asp Leu Gln Ser Gly Gln Cys Leu Gln Leu
 420 425 430
 Trp Asp Asp Asp Leu Gly Ala Leu Trp Ala Cys Pro Met Asp Lys Tyr
 435 440 445
 Ile His Lys Arg Trp Ala Leu Val Trp Leu Ala Cys Leu Leu Phe Ala
 450 455 460
 Ala Ala Leu Ser Leu Ile Leu Leu Leu Lys Lys Asp His Ala Lys Gly
 465 470 475 480
 Trp Leu Arg Leu Leu Lys Gln Asp Val Arg Ser Gly Ala Ala Ala Arg
 485 490 495
 Gly Arg Ala Ala Leu Leu Leu Tyr Ser Ala Asp Asp Ser Gly Phe Glu
 500 505 510
 Arg Leu Val Gly Ala Leu Ala Ser Ala Leu Cys Gln Leu Pro Leu Arg
 515 520 525
 Val Ala Val Asp Leu Trp Ser Arg Arg Glu Leu Ser Ala Gln Gly Pro
 530 535 540
 Val Ala Trp Phe His Ala Gln Arg Arg Gln Thr Leu Gln Glu Gly Gly
 545 550 555 560
 Val Val Val Leu Leu Phe Ser Pro Gly Ala Val Ala Leu Cys Ser Glu
 565 570 575
 Trp Leu Gln Asp Gly Val Ser Gly Pro Gly Ala His Gly Pro His Asp
 580 585 590
 Ala Phe Arg Ala Ser Leu Ser Cys Val Leu Pro Asp Phe Leu Gln Gly
 595 600 605
 Arg Ala Pro Gly Ser Tyr Val Gly Ala Cys Phe Asp Arg Leu Leu His
 610 615 620

10

20

30

Pro Asp Ala Val Pro Ala Leu Phe Arg Thr Val Pro Val Phe Thr Leu
 625 630 635 640
 Pro Ser Gln Leu Pro Asp Phe Leu Gly Ala Leu Gln Gln Pro Arg Ala
 645 650 655
 Pro Arg Ser Gly Arg Leu Gln Glu Arg Ala Glu Gln Val Ser Arg Ala
 660 665 670
 Leu Gln Pro Ala Leu Asp Ser Tyr Phe His Pro Pro Gly Thr Pro Ala
 675 680 685
 Pro Gly Arg Gly Val Gly Pro Gly Ala Gly Pro Gly Ala Gly Asp Gly
 690 695 700
 Thr
 705

10

<210> 12
 <211> 675
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Chimeric Zcytor14 protein.

<400> 12

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

20

30

Asp Cys Phe Glu Ala Ala Leu Gly Ser Glu Val Arg Ile Trp Ser Tyr
 165 170 175
 Thr Gln Pro Arg Tyr Glu Lys Glu Leu Asn His Thr Gln Gln Leu Pro
 180 185 190
 Ala Leu Pro Trp Leu Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Val His Leu
 195 200 205
 Val Leu Asn Val Ser Glu Glu Gln His Phe Gly Leu Ser Leu Tyr Trp
 210 215 220
 Asn Gln Val Gln Gly Pro Pro Lys Pro Arg Trp His Lys Asn Leu Thr
 225 230 235 240
 Gly Pro Gln Ile Ile Thr Leu Asn His Thr Asp Leu Val Pro Cys Leu
 245 250 255
 Cys Ile Gln Val Trp Pro Leu Glu Pro Asp Ser Val Arg Thr Asn Ile
 260 265 270
 Cys Pro Phe Arg Glu Asp Pro Arg Ala His Gln Asn Leu Trp Gln Ala
 275 280 285
 Ala Arg Leu Arg Leu Leu Thr Leu Gln Ser Trp Leu Leu Asp Ala Pro
 290 295 300
 Cys Ser Leu Pro Ala Glu Ala Ala Leu Cys Trp Arg Ala Pro Gly Gly
 305 310 315 320
 Asp Pro Cys Gln Pro Leu Val Pro Pro Leu Ser Trp Glu Asn Val Thr
 325 330 335
 Val Asp Val Asn Ser Ser Glu Lys Leu Gln Leu Gln Glu Cys Leu Trp
 340 345 350
 Ala Asp Ser Leu Gly Pro Leu Lys Asp Asp Val Leu Leu Leu Glu Thr
 355 360 365
 Arg Gly Pro Gln Asp Asn Arg Ser Leu Cys Ala Leu Glu Pro Ser Gly
 370 375 380
 Cys Thr Ser Leu Pro Ser Lys Ala Ser Thr Arg Ala Ala Arg Leu Gly
 385 390 395 400
 Glu Tyr Leu Leu Gln Asp Leu Gln Ser Gly Gln Cys Leu Gln Leu Trp
 405 410 415
 Asp Asp Asp Leu Gly Ala Leu Trp Ala Cys Pro Met Asp Lys Tyr Ile
 420 425 430
 His Lys Arg Trp Ala Leu Val Trp Leu Ala Cys Leu Leu Phe Ala Ala
 435 440 445
 Ala Leu Ser Leu Ile Leu Leu Leu Lys Lys Asp His Ala Lys Ala Ala
 450 455 460
 Ala Arg Gly Arg Ala Ala Leu Leu Leu Tyr Ser Ala Asp Asp Ser Gly
 465 470 475 480
 Phe Glu Arg Leu Val Gly Ala Leu Ala Ser Ala Leu Cys Gln Leu Pro
 485 490 495

10

20

30

Leu Arg Val Ala Val Asp Leu Trp Ser Arg Arg Glu Leu Ser Ala Gln
 500 505 510
 Gly Pro Val Ala Trp Phe His Ala Gln Arg Arg Gln Thr Leu Gln Glu
 515 520 525
 Gly Gly Val Val Val Leu Leu Phe Ser Pro Gly Ala Val Ala Leu Cys
 530 535 540
 Ser Glu Trp Leu Gln Asp Gly Val Ser Gly Pro Gly Ala His Gly Pro
 545 550 555 560
 His Asp Ala Phe Arg Ala Ser Leu Ser Cys Val Leu Pro Asp Phe Leu
 565 570 575
 Gln Gly Arg Ala Pro Gly Ser Tyr Val Gly Ala Cys Phe Asp Arg Leu
 580 585 590
 Leu His Pro Asp Ala Val Pro Ala Leu Phe Arg Thr Val Pro Val Phe
 595 600 605
 Thr Leu Pro Ser Gln Leu Pro Asp Phe Leu Gly Ala Leu Gln Gln Pro
 610 615 620
 Arg Ala Pro Arg Ser Gly Arg Leu Gln Glu Arg Ala Glu Gln Val Ser
 625 630 635 640
 Arg Ala Leu Gln Pro Ala Leu Asp Ser Tyr Phe His Pro Pro Gly Thr
 645 650 655
 Pro Ala Pro Gly Arg Gly Val Gly Pro Gly Ala Gly Pro Gly Ala Gly
 660 665 670
 Asp Gly Thr
 675

10

20

フロントページの続き

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

(72)発明者 バークヘッド, スティーブン ケー .
 アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 1 1 5 , シアトル, フィフティーンス アベニュー ノースイースト 2 0 0 0 7

(72)発明者 パウンダー, サラ エル .
 アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 0 3 4 , カークランド, ノースイースト ワンハンドレッドトウエンティーフォース ストリート 1 1 4 1 0 , ピーエムビー 2 9 4

審査官 長谷川 茜

(56)参考文献 国際公開第98/37193 (WO, A1)
 国際公開第99/07848 (WO, A1)
 国際公開第98/49307 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90
 C07K 14/00-16/46
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
 UniProt/GeneSeq

专利名称(译)	人细胞因子受体		
公开(公告)号	JP4737903B2	公开(公告)日	2011-08-03
申请号	JP2001509508	申请日	2000-06-30
[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	プレスネルスコットアール パークヘッドスティーブンケー パウダーサラエル		
发明人	プレスネル,スコット アール. パークヘッド,スティーブン ケー. パウダー,サラ エル.		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/715 C12N7/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 C07K16/28 C07K19/00 G01N33/53 A61K38/00 A61K48/00 C12N15/12		
CPC分类号	C07K14/7155 A01K2217/05 A61K38/00 A61K48/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/715 C12N7/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12P21/02. C C07K16/28 C07K19/00 G01N33/53.D G01N33/53.N		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	09/348854 1999-07-07 US		
其他公开文献	JP2003504058A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

已经发现细胞因子及其受体可用于基础研究和用作治疗剂。 本发明提供了称为“Zcytor14”的新型人细胞因子受体。

第 1 表

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	T	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