

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公表特許公報** ( A ) (11)特許出願公表番号

**特表2003 - 500010**

(P2003 - 500010A)

(43)公表日 平成15年1月7日(2003.1.7)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00		A 6 1 P 37/00	4 B 0 2 4
45/00		C 0 7 K 14/47	4 B 0 6 3
A 6 1 P 37/00		14/52	4 B 0 6 4
C 0 7 K 14/47		14/715	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全111数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 604066(P2000 - 604066)

(86) (22)出願日 平成12年3月9日(2000.3.9)

(85)翻訳文提出日 平成13年9月11日(2001.9.11)

(86)国際出願番号 PCT/US00/06182

(87)国際公開番号 W000/053631

(87)国際公開日 平成12年9月14日(2000.9.14)

(31)優先権主張番号 09/267,901

(32)優先日 平成11年3月11日(1999.3.11)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 シェリング・コーポレーション  
SCHERING CORPORATI  
ON

アメリカ合衆国ニュージャージー州07033,  
ケニルワース,ギャロッピング・ヒル・ロー  
ド 2000

(72)発明者 ビルギット・オップマン  
アメリカ合衆国94110カリフォルニア州サン  
フランシスコ、ポトレロ・アベニュー・ナ  
ンバー201、974番

(74)代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 哺乳動物サイトカイン；関連試薬および方法

(57)【要約】

哺乳動物由来のサイトカインをコードする精製遺伝子、  
精製蛋白、特異的抗体、およびこの分子をコードする核  
酸を包含する関連試薬が提供される。該試薬の使用  
方法および診断キットも提供される。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 配列番号：2または4の成熟蛋白部分の少なくとも6個のアミノ酸、ならびに下記のものを含む単離可溶性複合体：

- a) 配列番号：12または13の成熟蛋白部分の少なくとも6個のアミノ酸；  
または  
b) CNTF-Rの成熟蛋白部分の少なくとも6個のアミノ酸。

【請求項2】 該複合体が

- a) 成熟した配列番号：2または4の組み換えポリペプチドを含む；  
b) 成熟した配列番号：12または13の組み換えポリペプチドを含む；  
c) 成熟CNTF-Rの組み換えポリペプチドを含む；  
d) 成熟した配列番号：2または4の組み換えポリペプチド、および成熟した配列番号：12または13の組み換えポリペプチドの両方を含む；  
e) 成熟した配列番号：2または4の組み換えポリペプチド、および成熟CNTF-Rの組み換えポリペプチドの両方を含む；  
f) 検出可能に標識されている；  
g) 緩衝溶液中にある；あるいは  
h) 滅菌済み溶液中にある

請求項1の複合体。

- 【請求項3】 a) 成熟IL-60ポリペプチドを含む；  
b) 成熟CLF-1ポリペプチドを含む；  
c) 成熟CNTF-Rポリペプチドを含む；  
d) 配列番号：2または4の少なくとも7個のアミノ酸の重複していない少なくとも4つのセグメントを示す；  
e) 霊長類L-60および霊長類CLF-1の両方に由来するエピトープを示す；  
f) 霊長類L-60および霊長類CNTF-Rの両方に由来するエピトープを示す；  
g) 糖鎖付加されていない；  
h) 固体基材に結合されている；

i) 別の化学的部分に抱合されている；あるいは

j) FLAG、His6、またはIg配列を包含する検出または精製タグを含む

請求項1の複合体。

【請求項4】 請求項1の複合体、および下記のものを含むキット：

a) 該複合体を入れるコンパートメント；または

b) 該キット中の試薬の使用または処分にに関する説明書。

【請求項5】 下記のものを含む単離または組み換えポリペプチド：

a) 配列番号：2または4のセグメントと同じ少なくとも7個のアミノ酸を含む第1のセグメント、および配列番号：12または13のセグメントと同じ少なくとも7個のアミノ酸を含む第2のセグメント；

b) 成熟した配列番号：2または4のセグメントと同じ少なくとも5個のアミノ酸の別個の重複していない少なくとも2つのセグメント、および成熟した配列番号：12または13のセグメントと同じ少なくとも7個のアミノ酸を含む第3のセグメント；

c) 成熟した配列番号：2または4のセグメントと同じ少なくとも7個のアミノ酸を含む少なくとも1つのセグメント、および成熟した配列番号：12または13のセグメントと同じ少なくとも5個のアミノ酸の別個の重複していない少なくとも2つのセグメント；

d) 配列番号：2または4のセグメントと同じ少なくとも7個のアミノ酸を含む第1のセグメント、および成熟霊長類CNTF-Rのセグメントと同じ少なくとも7個のアミノ酸を含む第2のセグメント

e) 成熟した配列番号：2または4のセグメントと同じ少なくとも5個のアミノ酸の別個の重複していない少なくとも2つのセグメント、および成熟霊長類CNTF-Rのセグメントと同じ少なくとも7個のアミノ酸を含む第3のセグメント；あるいは

f) 成熟した配列番号：2または4のセグメントと同じ少なくとも7個のアミノ酸を含む少なくとも1つのセグメント、および成熟霊長類CNTF-Rのセグメントと同じ少なくとも5個のアミノ酸の別個の重複していない2つのセグメント

ト。

【請求項6】 同一性のある該別個の重複していないセグメントが

- a) 少なくとも8個のアミノ酸の1つのセグメントを含む；
- b) 少なくとも5個のアミノ酸の1つのセグメントおよび少なくとも6個のアミノ酸の第2のセグメントを含む；
- c) 少なくとも4、5、および6個のアミノ酸の少なくとも3つのセグメントを含む；あるいは
- d) 少なくとも12個のアミノ酸の1つのセグメントを含む

請求項5のポリペプチド。

【請求項7】 a) 成熟IL-B60配列を含む；

- b) 成熟CLF-1配列を含む；
- c) 成熟CNTF-R配列を含む；
- d) 配列番号：2または4の少なくとも7個のアミノ酸の重複していない少なくとも4つのセグメントを示す；
- e) 少なくとも約30個のアミノ酸の長さを有する；
- f) 霊長類IL-B60および霊長類CLF-1の両方に由来するエピトープを示す；
- g) 霊長類IL-B60および霊長類CNTF-Rの両方に由来するエピトープを示す；
- h) 糖鎖付加されていない；
- i) 少なくとも30kDの分子量を有する；
- j) 合成ポリペプチドである；
- k) 固体基材に結合されている；
- l) 別の化学的部分に抱合されている；あるいは
- m) FLAG、His6、またはIg配列を包含する検出または精製タグを含む

請求項5のポリペプチド。

【請求項8】 a) 実質的に純粋なIL-B60およびCLF-1の組み合

わせ；

b) 実質的に純粋な I L - B 6 0 および C N T F - R の組み合わせ；

c) 請求項 5 の滅菌済みポリペプチド；または

d) 請求項 5 のポリペプチドおよび担体

を含み、該担体が

i) 水、セイライン、および/またはバッファーを包含する水性化合物であり；そして/あるいは

i i) 経口、直腸、鼻腔、局所、または非経口投与用に処方されているものである組成物。

【請求項 9】 請求項 5 のポリペプチド、および下記のものを含むキット：

a) 該ポリペプチドを入れるコンパートメント

b) 該キット中の試薬の使用または処分にに関する説明書。

【請求項 10】 a) 請求項 1 の複合体を用いて動物において免疫応答を誘発させることを特徴とする、請求項 1 の複合体を認識する抗体の製造；

b) 請求項 1 の複合体に抗体の集団を接触させ、次いで、結合しない抗体から結合する抗体を分離することを特徴とする、抗体の免疫選択；あるいは

c) 請求項 1 の複合体を担体と混合することを特徴とする、組成物の処方のための方法。

【請求項 11】 請求項 2 d または 2 e の複合体には特異的に結合するが、配列番号：2、4、12、13、または C N T F - R の成熟ポリペプチドのいずれにも特異的に結合しない抗体に由来する抗原結合部位を含む結合化合物。

【請求項 12】 a) 該結合化合物が

i) 容器中にある；

i i) F v、F a b、または F a b 2 フラグメントである；あるいは

i i i) 別の化学的部分に抱合している

ものであるか；あるいは

b) 該抗体が

i) 実質的に純粋な I L - B 6 0 と C L F - 1 との複合体に対して生起したものの；

i i) 実質的に純粋な I L - B 6 0 と C N T F - R との複合体に対して生起

したもの；

i i i ) 免疫選択されたもの；

i v ) ポリクローナル抗体であるもの；

v ) 抗原に対して少なくとも30 μMのKdを示すもの；

v i ) ビーズまたはプラスチック膜を包含する固体基材に結合されているもの；

v i i ) 滅菌済み組成物中にあるもの；あるいは

v i i i ) 放射活性または蛍光標識を包含する標識にて検出可能に標識されているもの

である、請求項11の結合化合物。

【請求項13】 a) 請求項12の滅菌済み結合化合物、または

b) 請求項12の結合化合物および担体

を含み、該担体が

i) 水、セイライン、および/またはバッファーを包含する水性化合物であり；そして/あるいは

i i) 経口、直腸、鼻腔、局所、または非経口投与用に処方されている

ものである組成物。

【請求項14】 請求項11の結合化合物、および下記のものを含むキット

：

a) 該結合化合物を入れるコンパートメント

b) 該キット中の試薬の使用または処分に關する説明書。

【請求項15】 適当な条件下において、

a) IL - B 6 0 および CLF - 1 ポリペプチド；または

b) IL - B 6 0 および CNTF - R ポリペプチド

を含む霊長類複合体を請求項11の抗体と接触させ、そのことにより抗原：抗体複合体を形成させることを特徴とする、抗原：抗体複合体の製造方法。

【請求項16】 a) 該複合体が他のサイトカインから精製される；

b) 該複合体が他の抗体から精製される；

c) 該接触がサイトカインを含む試料との接触である；

- d) 該接触が該抗原の定量的検出を可能にする；
- e) 該接触が該抗体を含む試料との接触である；あるいは
- f) 該接触が該抗体の定量的検出を可能にする

ものである請求項15の方法。

【請求項17】 a) 請求項5の該アミノ酸部分をコードしている；

b) 請求項5の該アミノ酸部分をコードしており、配列番号：1または3に由来する少なくとも30個の連続したヌクレオチドのセグメントを含む；

c) 配列番号：2または4に由来する少なくとも7個の連続したアミノ酸のセグメント、および配列番号：12または13に由来する少なくとも7個の連続したアミノ酸のセグメントを同時発現する；あるいは

d) 配列番号：2または4に由来する少なくとも7個の連続したアミノ酸のセグメント、およびCNTF-Rに由来する少なくとも7個の連続したアミノ酸のセグメントを同時発現する

単離または組み換え核酸。

【請求項18】 a) ヒト由来のIL-B60をコードしている

b) ヒト由来のCLF-1をコードしている；

c) ヒト由来のCNTF-Rをコードしている；

d) 発現ベクターである；

e) 複製開始点をさらに含む；

f) 検出可能標識を含む；

g) 合成ヌクレオチド配列を含む；あるいは

h) 6kb未満、好ましくは3kb未満である

請求項17の核酸。

【請求項19】 請求項18の組み換え核酸を含む細胞。

【請求項20】 a) 原核細胞；

b) 真核細胞；

c) 細菌細胞；

d) 酵母細胞；

e) 昆虫細胞；

- f) 哺乳動物細胞；
- g) マウス細胞；
- h) 霊長類細胞；または
- i) ヒト細胞

である請求項19の細胞。

【請求項21】 請求項18の核酸、および下記のものを含むキット：

- a) 該核酸を入れるコンパートメント；
- b) さらに霊長類IL - B60ポリペプチドを入れるコンパートメント；
- c) さらに霊長類CLF - 1ポリペプチドを入れるコンパートメント；
- d) さらに霊長類CNTF - Rポリペプチドを入れるコンパートメント；または
- e) 該キット中の試薬の使用または処分に関する説明書。

【請求項22】 a) 適当な条件下において請求項17の核酸を相補的核酸と接触させ、そのことにより2本鎖を形成させることを特徴とする、2本鎖核酸の製造；

b) 請求項17の核酸を発現させ、そのことによりポリペプチドを得ることを特徴とする、ポリペプチドの発現；あるいは

c) 適当な条件下において細胞を請求項17の核酸と接触させることを特徴とする、細胞の形質転換のための方法。

【請求項23】 配列番号：12、13、または霊長類CNTF - Rの少なくとも5個の連続したアミノ酸をコードしており、

a) 30 で30分かつ2M未満の塩である洗浄条件下において配列番号：1のコーディング部分にハイブリダイゼーションする；あるいは

b) 少なくとも約30個のヌクレオチドの鎖において霊長類IL - B60に対して同一性を示す

単離または組み換え核酸。

【請求項24】 a) 該連続したアミノ酸数が少なくとも8である；

b) 該洗浄条件が45 および/または500mMの塩である；あるいは

c) 該鎖が少なくとも55個のヌクレオチドである

請求項23の単離核酸。

【請求項25】 a) 該連続したアミノ酸数が少なくとも12である；

b) 該洗浄条件が55 および/または150mMの塩である；あるいは

c) 該鎖が少なくとも75個のヌクレオチドである

請求項23の組み換え核酸。

【請求項26】 哺乳動物IL-B60および

a) CLF-1；または

b) CNTF-R

を含む複合体のアゴニストまたはアンタゴニストに細胞を接触させることを特徴とする、細胞または組織培養細胞の生理学または発達をモジュレートする方法。

【請求項27】 a) 組み換えIL-B60と組み換えCLF-1もしくはCNTF-Rとを同時発現させることを特徴とする、請求項1の複合体の製造；

b) IL-B60ポリペプチドをCLF-1とともに発現させることを特徴とする、IL-B60ポリペプチドの分泌増加；あるいは

c) IL-B60とともにCLF-1を発現させることを特徴とする、CLF-1ポリペプチドの分泌増加

のための方法。

【請求項28】 a) 該増加が少なくとも3倍である；あるいは

b) 該発現がIL-B60ポリペプチドおよびCLF-1の一方または両方をコードする組み換え核酸の発現である

請求項27の方法。

【請求項29】 請求項1の複合体に結合する受容体をスクリーニングする方法であって、該受容体に該複合体を結合させる条件下において該受容体を発現する細胞に該複合体を接触させ、そのことにより検出可能な相互作用を生じさせることを特徴とする方法。

【請求項30】 該相互作用が該細胞における生理学的応答を生じさせるものである請求項29の方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

## 発明の分野

本発明は、哺乳動物細胞、例えば、哺乳動物免疫系の細胞の生物学および生理学の制御において機能する蛋白に関する。詳細には、本発明は、例えば、造血細胞を包含する種々の細胞タイプの活性化、発達、分化および機能を調節する精製遺伝子、蛋白、抗体、関連試薬、ならびに有用な方法を提供する。

**【0002】**

## 発明の背景

組み換えDNA法は、一般的には、ドナー源からの遺伝学的情報をベクターに組み込んで、その後、宿主細胞への導入のごとき処理を行うことにより、移送された遺伝学的情報を新たな環境においてコピーおよび/または発現させることをいう。通常には、遺伝学的情報は所望蛋白生成物をコードするメッセンジャーRNA (mRNA) に由来する相補的DNA (cDNA) の形態で存在する。しばしば担体は、後で宿主中で複製されるcDNAを取り込む能力のあるプラスミドであり、いくつかの場合には、実際にcDNAの発現を制御し、そのことにより宿主中においてコードされている生成物の合成を指令する。

**【0003】**

近年、哺乳動物免疫応答が、「免疫ネットワーク」と呼ばれる一連の複雑な細胞相互作用の基礎になっていることが知られてきた。例えば、Paul (1998) Fundamental Immunology (4th ed.) Raven Press, NY参照。最近の研究により、このネットワークの内的作用についての洞察が得られた。多くの応答が、実際に、リンパ球、マクロファージ、顆粒球および他の細胞のネットワーク様相互作用を引き起こすが、現在、一般的に免疫学者は、リンホカイン、サイトカインまたはモノカインとして知られる可溶性蛋白がこれらの細胞相互作用の制御において重要な役割を果たしているという意見を持っている。よって、細胞修飾因子の単離、特徴付け、および作用機構にはかなりの興味を持たれ、それらの理解は多くの医学的異常、例えば、免疫系の疾患の診断および治療において有意な進歩をもたらすであろう。これらの因子のいくつかは造血成長因子、例えば、顆粒球コロニー

刺激因子 ( G - C S F ) である。例えば、Thomson (ed. 1998) The Cytokine Handbook (3d ed.) Academic Press, San Diego; Mire-Sluis and Thorpe (ed. 1998) Cytokines Academic Press, San Diego; Metcalf and Nicola (1995) The Hematopoietic Colony Stimulating Factors Cambridge University Press; および Aggarwal and Gutterman (1991) Human Cytokines Blackwell Pub. 参照。

#### 【0004】

リンホカインは種々の様式で細胞活性を媒介するようと思われる。それらは多能性造血幹細胞が増殖、成長および/または分化して複雑な免疫系を形成する多様な細胞系統を構成する莫大な数の前駆細胞になることを支持する。細胞成分間の正しくバランスのとれた相互作用は健全な免疫応答に必要である。リンホカインが他の作用剤とともに投与された場合、異なる細胞系統はしばしば異なる様式で応答する。

#### 【0005】

免疫応答に特に重要な細胞系統は2つのクラスのリンパ球を包含する：B細胞は免疫グロブリン（外来物質を認識し結合してその除去を行う能力がある蛋白）を産生し分泌することができ、種々のサブセットのT細胞はリンホカインを分泌し、免疫ネットワークを構成しているB細胞および他の種々の細胞（他のT細胞を包含）を誘導または抑制する。これらのリンパ球は他の多くの細胞タイプと相互作用する。

#### 【0006】

種々の免疫疾患をよりよく理解し治療するための研究は、一般的にはインビトロにおいて免疫系の細胞を維持することができないことにより妨げられていた。免疫学者は、T細胞ならびに多くのリンホカインをはじめとする種々の成長因子を含む他の細胞上清を用いることによりこれらの細胞を培養できることを見出した。

#### 【0007】

上で述べたことから、新たなリンホカイン、例えば、G - C S F および/または I L - 6 に関連するリンホカインを発見し開発することは、免疫系および/または造血細胞の直接または間接的に関連している広範な変性的または異常な症状

の新たな治療に貢献しうる。特に、既知リンホカインの有益な活性を促進または発揮させるリンホカインの発見および開発は非常に有利である。本発明は、新たなインターロイキン組成物および関連化合物、ならびにそれらの使用方法を提供する。

#### 【0008】

##### 発明の概要

本発明は、哺乳動物、例えば、霊長類またはげっ歯類のインターロイキン - B60 (IL - B60) およびその生物学的活性に指向される。本発明は、ポリペプチド自体w pコードする核酸ならびにそれらの製造方法および使用方法を包含する。本発明の核酸は、一部には、本明細書開示の相補的DNA (cDNA) 配列に対する相同性により、および/または成長因子様またはサイトカイン様活性、例えば、G - CSF (Nagata (1994) in Thomson The Cytokine Handbook 2d ed., Academic Press, San Diego参照) および/またはIL - 6 (Hirano (1994) in Thomson The Cytokine Handbook 2d ed., Academic Press, San Diego参照) に関する機能アッセイにより特徴づけられる。また、ポリペプチド、抗体、ならびに核酸発現法を含むそれらの使用方法も提供される。成長因子依存性の生理学または免疫応答の制御におけるモジュレーションまたは介入方法が提供される。

#### 【0009】

本発明は、一部には、G - CSFまたはIL - 6に対する有意な配列および構造類似性を示す新たなサイトカイン配列の発見に基づく。詳細には、本発明は、霊長類、例えば、ヒトおよびげっ歯類、例えばマウスの、約198アミノ酸の成熟サイズの蛋白をコードする遺伝子を提供する。有意な配列相同性を示す機能的同等物は他の哺乳動物、例えばウシ、ウマおよびラット種から利用可能であろう。

#### 【0010】

そのうえ、本発明は、複合体の第2の関連成分を同定する。複合体中の成分の組み合わせに関連した組成物が、使用方法とともに提供される。

#### 【0011】

1の具体例において、本発明は、配列番号：2または4の成熟蛋白部分を含む実質的に純粋なまたは組み換えポリペプチドを提供する。好ましくは、ポリペプチドは検出可能に標識されており；糖鎖付加されておらず、変性されており；固体基材に結合されており；他の化学的部分に結合しており、あるいは滅菌済み組成物中にある。キット形態としては、ポリペプチドおよびポリペプチド入れるコンパートメント；あるいはキット中の試薬の使用または処分に関する説明書を含むもの等がある。

#### 【0012】

結合化合物としては、記載されたポリペプチドに特異的に結合する抗体由来の抗原結合部位を含むものが挙げられる。結合化合物がキット中に含まれていてもよく、該キットは該結合化合物を入れるコンパートメント；あるいはキット中の試薬の使用または処分に関する説明書を含む。

#### 【0013】

さらに本発明は、適当な条件下で霊長類IL-B60ポリペプチドを、本発明のポリペプチドに特異的または選択的に結合する抗体と接触させ、そのことにより複合体を形成させることを特徴とする、抗原：抗体複合体の製造方法を提供する。

#### 【0014】

核酸の具体例は、配列番号：2または4の成熟蛋白部分をコードする単離または組み換えポリヌクレオチドを包含する。

#### 【0015】

他の具体例において、本発明は、配列番号：2または4の成熟蛋白部分および配列番号：12または13の成熟蛋白部分を含む単離可溶性複合体を提供する。好ましくは、複合体は配列番号：2、4、12、または13の組み換えポリペプチドを含み；検出可能に標識されており；緩衝溶液中にあり；滅菌済み溶液中にある。かかる複合体ならびに該複合体を入れるコンパートメント；あるいはキット中の試薬の使用または処分に関する説明書を含むキットが提供される。

#### 【0016】

可溶性複合体に特異的に結合するが配列番号：12または13の成熟ポリペプ

チドには特異的に結合しない抗体由来の抗原結合部位を含む結合化合物が提供される。該結合化合物ならびに該結合化合物を入れるコンパートメント、あるいはキット中の試薬の使用または処分に関する説明書を含むキットが提供される。

【0017】

例えば、適当な条件下で、IL - B60およびCLF - 1ポリペプチドを含む霊長類複合体を、配列番号：2または4の成熟蛋白部分ならびに配列番号：12または13の成熟蛋白部分を含む単離可溶性複合体に選択的または特異的に結合する抗体と接触させ、そのことにより複合体を形成させることを特徴とする、抗原：抗体複合体の製造方法が提供される。

【0018】

核酸の具体例は、配列番号：2または4の成熟蛋白部分ならびに配列番号：12または13の成熟蛋白部分をコードする単離または組み換え核酸を包含する。

【0019】

また本発明は、下記のものから選択されるものを含む組成物を提供する：配列番号：2または4のセグメントと同一の少なくとも7個のアミノ酸を含む単離ポリペプチド；配列番号：2または4のセグメントと同一の少なくとも5個のアミノ酸の別個の重複していない少なくとも2つのセグメントを含む実質的に純粋なまたは組み換えポリペプチド；成熟した配列番号：2または4を含む天然配列ポリペプチド；あるいはIL - B60配列を含む融合ポリペプチド。特定の具体例において、同一性のある別個の重複していないセグメントとしては下記のもの挙げられる：少なくとも8個のアミノ酸の1つのセグメント、少なくとも5個のアミノ酸の1つのセグメントおよび少なくとも6個のアミノ酸の第2のセグメント、少なくとも4、5、および6個のアミノ酸の少なくとも3つのセグメント、あるいは少なくとも12個のアミノ酸の1つのセグメント。他の具体例において、組成物のポリペプチドは、表1の成熟配列を含むポリペプチド；IL - B60の糖鎖付加されていない形態であるポリペプチド；ヒトのごとき霊長類に由来するポリペプチド；配列番号：2または4の少なくとも17個のアミノ酸を含むポリペプチド；配列番号：2または4の少なくとも7個のアミノ酸の重複していない少なくとも4個のセグメントを示すポリペプチド；IL - B60の天然対立遺伝

子変種であるポリペプチド；少なくとも約30個のアミノ酸の長さを有するポリペプチド；霊長類IL-B60に特異的な少なくとも2つの重複していないエピトープを示すポリペプチド；糖鎖付加されたポリペプチド；天然の糖鎖付加を伴って少なくとも30kDの分子量を有するポリペプチド；合成ポリペプチドであるもの；固体基材に結合されたポリペプチド；別の化学的部分に結合されたポリペプチド；天然配列について5回またはそれ未満置換されているポリペプチド；天然配列の欠失または挿入変種であるポリペプチド、あるいは下記のをさらに含むポリペプチドが挙げられる：配列番号：12または13のセグメントと同一の少なくとも7個のアミノ酸；配列番号：12または13のセグメントと同一の少なくとも5個のアミノ酸の別個の重複していない少なくとも2つのセグメント；成熟した配列番号：12または13を含む天然配列ポリペプチド；あるいは霊長類CLF-1。さらなる好ましい具体例において、組成物は、実質的に純粋なIL-B60およびCLF-1、配列番号：2または4の成熟蛋白を含む滅菌済みIL-B60ポリペプチド、あるいは記載されたポリペプチドおよび担体を含むものであり、ここに担体は、水、セイラインおよび/またはバッファー等の水性化合物であり、さらに/あるいは組成物は経口、直腸、局所、または非経口投与用に処方されたものである。本発明は有効ポリペプチドを提供し、該融合ポリペプチドは、表1の成熟蛋白配列；FLAG、His6、またはIg配列を包含する検出または精製タグ；あるいはCLF-1を包含する別のサイトカイン受容体ファミリーの蛋白の配列を含む。キットの具体例としては、組成物のポリペプチドおよび蛋白またはポリペプチドを入れるコンパートメント、あるいはキット中の試薬の使用または処分にに関する説明書を含むもの等がある。

#### 【0020】

さらに本発明は、記載されたポリペプチドの使用方法を提供し、それらの方法は下記のものである：ポリペプチドを放射活性標識で標識することを特徴とするポリペプチドの標識方法；クロマトグラフィーマトリックス上で混合物を移動させ、そのことによりポリペプチドを分離することを特徴とする、混合物中の別のポリペプチドからのポリペプチドの分離方法；適当な条件下において化合物をポリペプチドとともにインキュベーションし、そのことにより成分をポリペプチド

に結合させることを特徴とする、ポリペプチドに選択的に結合する化合物の同定方法；あるいはポリペプチドを反応性試薬で誘導体化し、次いで、ポリペプチドをマトリックスに抱合させることを特徴とする、マトリックスへのポリペプチドの抱合方法。

#### 【0021】

関連結合化合物は、上記のごとく、天然ポリペプチドに特異的または選択的に結合する抗体由来の抗原結合部位を含む化合物を包含するものであり、結合化合物は容器中にあり；IL - B60ポリペプチドはヒト由来のものであり；結合化合物はFv、Fab、またはFab2フラグメントであり；結合化合物は別の化学的部分に抱合されたものであり；あるいは該結合化合物は抗体であり、該抗体は表1の成熟ポリペプチドに対して生起した抗体；成熟IL - B60に対して生起した抗体；精製ヒトIL - B60に対して生起した抗体；免疫選択された抗体；ポリクローナル抗体；変性IL - B60に結合する抗体；抗原に対して少なくとも30  $\mu$ MのKdを示す抗体；ビーズまたはプラスチック膜を包含する固体基材に結合した抗体；滅菌済み組成物中にある抗体；あるいは放射活性または蛍光標識を包含する検出可能標識で標識された抗体である。かかる結合化合物ならびに該結合化合物を入れるコンパートメント；あるいはキットの試薬の使用または処分に関連する説明書を含むキットが提供される。

#### 【0022】

適当な条件下で、霊長類IL - B60ポリペプチドを記載した抗体と接触させ、そのことにより複合体を形成させることを特徴とする、抗原：抗体複合体の製造方法が提供される。好ましくは、該方法において、複合体は他のサイトカインから精製され；複合体は他の抗体から精製され；接触はサイトカイン含有試料との接触であり；接触は抗原の定量的検出を可能にするものであり；接触は抗体含有試料との接触であり；あるいは接触は抗体の定量的検出を可能にするものである。

#### 【0023】

もう1つの具体例において、本発明は、上記の滅菌済み結合化合物、または結合化合物および担体を含む組成物を包含し、ここに担体は、水、セイラインおよ

び/またはバッファー等の水性化合物であり、さらに/あるいは組成物は経口、直腸、鼻腔、局所、または非経口投与用に処方される。

#### 【0024】

核酸の具体例は、記載したポリペプチドをコードする単離または組み換え核酸を包含し、ここにIL-B60はヒト形態であり；あるいは表1の1つの抗原性ペプチド配列をコードする核酸；表1の複数の抗原性ペプチド配列をコードする核酸；表4の複数の抗原性ペプチド配列をコードする核酸；セグメントをコードする天然cDNAと同じである少なくとも13個のヌクレオチドを示す核酸；発現ベクターである核酸；複製開始点をさらに含む核酸；天然ソース由来の核酸；検出可能標識を含む核酸；合成ヌクレオチド配列を含む核酸；6kb、好ましくは3kb未満の核酸；霊長類形態の核酸；天然完全長コーディング配列を含む核酸；IL-B60をコードする遺伝子に対するハイブリダイゼーションプローブである核酸；PCRプライマーである核酸；PCR生成物である核酸；あるいは突然変異プライマーである核酸を包含する。好ましい具体例は、単離または組み換え核酸が細胞または組織中にある場合を包含する。細胞は原核細胞；真核細胞；細菌細胞；酵母細胞；昆虫細胞；哺乳動物細胞；マウス細胞；霊長類細胞；またはヒト細胞であってもよい。

#### 【0025】

記載した核酸ならびに該核酸を入れるコンパートメント（コンパートメントにはさらに霊長類IL-B60ポリペプチドが入っていてもよい）；あるいはキット中の試薬の使用または処分にに関する説明書を含むキットが提供される。

#### 【0026】

さらに本発明は、記載したポリヌクレオチドと2本鎖を形成させる方法を提供し、該方法は、配列番号：1、3のコーディング部分の少なくとも25個の連続したヌクレオチド、あるいは天然の配列番号：12または13をコードする少なくとも25個の連続したヌクレオチドにストリンジェントな条件下においてハイブリダイゼーションするプローブにポリペプチドを接触させ、そのことにより2本鎖を形成させることを特徴とする。

#### 【0027】

さらなる態様において、本発明は、30 で2 M未満の塩において30分の洗浄条件において配列番号：1のコーディング部分にハイブリダイゼーションする核酸；あるいは少なくとも約30ヌクレオチドの鎖において霊長類IL-B60に対する同一性を示す核酸を提供する。好ましい具体例において、45 および/または500 mMの塩である洗浄条件；あるいは55 および/または150 mMの塩である洗浄条件；あるいは鎖が少なくとも55ヌクレオチド、例えば少なくとも75ヌクレオチドである。

#### 【0028】

例えば、細胞または組織培養細胞の生理学または発達をモジュレーションする方法が提供され、該方法は、哺乳動物IL-B60のアゴニストまたはアンタゴニストに細胞を接触させること；あるいは哺乳動物IL-B60およびCLF-1を含む複合体のアゴニストまたはアンタゴニストに細胞を接触させることを特徴とする。さらに、本発明は、CLF-1とともにIL-B60ポリペプチドを発現させることを特徴とするIL-B60配列の分泌増加方法；あるいはIL-B60配列とともにCLF-1を発現することを特徴とするCLF-1の分泌増加方法を提供する。該方法の好ましい具体例において、増加は少なくとも3倍、5倍、7倍、10倍またはそれ以上であり、あるいは発現はポリペプチドおよびCLF-1の一方または両方をコードする組み換え核酸の発現である。

#### 【0029】

さらに本発明は、配列番号：2または4の成熟蛋白部分、ならびに配列番号：12または13の成熟蛋白部分を含む単離可溶性複合体に結合する受容体をスクリーニングする方法を提供し、該方法は、複合体を受容体に結合させる条件下で、受容体を発現する細胞に複合体を接触させ、そのことにより検出可能な相互作用を形成させることを特徴とする。好ましくは、相互作用は細胞において生理学的応答を生じさせるものである。

#### 【0030】

本発明の他の具体例は、例えば、配列番号：2または4の成熟蛋白部分の少なくとも6個のアミノ酸；配列番号：12または13の成熟蛋白部分の少なくとも6個のアミノ酸；あるいはCNTF-Rの成熟蛋白部分の少なくとも6個のアミ

ノ酸を含む単離可溶性複合体である。かかる複合体は、例えば、成熟した配列番号：2または4の組み換えポリペプチドを含んでいてもよく；成熟した配列番号：12または13の組み換えポリペプチドを含んでいてもよく；成熟CNTF-Rの組み換えポリペプチドを含んでいてもよく；成熟した配列番号：2または4の組み換えポリペプチドならびに成熟した配列番号：12または13の組み換えポリペプチドの両方を含んでいてもよく；あるいは成熟した配列番号：2または4の組み換えポリペプチドならびに成熟CNTF-Rの組み換えポリペプチドの両方を含んでいてもよい。また、かかる複合体は検出可能に標識されていてもよく、緩衝液中にあってもよく、あるいは滅菌済み溶液中にあってもよい。好ましい具体例としては、成熟IL-B60ポリペプチドを含むもの；成熟CLF-1ポリペプチドを含むもの；成熟CNTF-Rポリペプチドを含むもの；配列番号：2または4の少なくとも7個のアミノ酸の重複していない少なくとも4つのセグメントを示すもの；霊長類IL-B60および霊長類CLF-1の両方に由来するエピトープを示すもの；霊長類IL-B60および霊長類CNTF-Rの両方に由来するエピトープを示すもの；糖鎖付加されていないもの；固体基材に結合されているもの；別の化学的部分に抱合されているもの；あるいはFLAG、His6、またはIg配列を包含する検出または精製タグを含むもの等がある。

#### 【0031】

例えば、該複合体ならびに該複合体を入れるコンパートメント、および/またはキット中の試薬の使用または処分にに関する説明書を含むキットが提供される。

#### 【0032】

例えば、下記のものを含む単離または組み換えポリペプチドを含む融合ポリペプチドが提供される：配列番号：2または4のセグメントと同一の少なくとも7個のアミノ酸を含む第1セグメント、および成熟した配列番号：12または13のセグメントと同一の少なくとも7個のアミノ酸を含む第2セグメント；成熟した配列番号：2または4のセグメントと同じ少なくとも5個のアミノ酸の別個の重複していないセグメント、および成熟した配列番号：12または13のセグメントと同じ少なくとも7個のアミノ酸を含む第3セグメント；成熟した配列番号：2または4セグメントと同じ少なくとも7個のアミノ酸を含

む少なくとも1つのセグメント、および成熟した配列番号：12または13のセグメントと同じ少なくとも5個のアミノ酸の別個の重複していない2つのセグメント；配列番号：2または4のセグメントを同じ少なくとも7個のアミノ酸を含む第1のセグメント、および成熟霊長類CNTF-Rのセグメントと同じ少なくとも7個のアミノ酸を含む第2のセグメント；成熟した配列番号：2または4のセグメントと同じ少なくとも5個のアミノ酸の別個の重複していない少なくとも2つのセグメント、および成熟霊長類CNTF-Rのセグメントと同じ少なくとも7個のアミノ酸を含む第3セグメント；あるいは成熟した配列番号：2または4のセグメントと同じ少なくとも7個のアミノ酸を含む少なくとも1つのセグメント、および成熟霊長類CNTF-Rのセグメントと同じ少なくとも5個のアミノ酸の別個の重複していない2つのセグメント。特定の具体例としては、同一性のある別個の重複していないセグメントが下記のものを含む場合等が挙げられる：少なくとも8個のアミノ酸の1つのセグメント、少なくとも5個のアミノ酸の1つのセグメントおよび少なくとも6個のアミノ酸の第2のセグメント、少なくとも4、5、および6個のアミノ酸の少なくとも3つのセグメント、あるいは少なくとも12個のアミノ酸の1つのセグメント。他の具体例は、成熟IL-B60配列を含むもの；成熟CLF-1配列を含むもの；成熟CNTF-R配列を含むもの；配列番号：2または4の少なくとも7個のアミノ酸の重複していない少なくとも4つのセグメントを示す配列；少なくとも約30アミノ酸の長さを有するもの；霊長類IL-B60および霊長類CLF-1の両方に由来するエピトープを示すもの；霊長類IL-B60および霊長類CNTF-Rの両方に由来するエピトープを示すもの；糖鎖付加されていないもの；少なくとも30kDの分子量を有するもの；合成ポリペプチドであるもの；固体基材に結合されているもの；別の化学的部分に抱合されているもの；あるいはFLAG、His6、またはIg配列を包含する検出または精製タグを含むものを包含する。

#### 【0033】

他の具体例は、実質的に純粋なIL-B60とCLF-1の組み合わせ；実質的に純粋なIL-B60とCNTF-Rの組み合わせ；上記滅菌済みポリペプチド；あるいは上記ポリペプチドおよび担体を含む組成物を包含し、ここに担体は

、水、セイラインおよび/またはバッファー等の水性化合物であり、さらに/あるいは組成物は経口、直腸、鼻腔、局所、または非経口投与用に処方される。記載したポリペプチドならびに該ポリペプチドを入れるコンパートメント、および/またはキット中の試薬の使用または処分にに関する説明書を含むキットが提供される。

#### 【0034】

例えば、複合体を用いて動物における免疫応答を誘導することを特徴とする、記載した複合体を認識する抗体の製造方法；抗体の集団を記載した複合体に接触させ、次いで、結合した抗体を結合しない抗体から分離することを特徴とする、抗体の免疫選択方法；あるいは記載した複合体を担体と混合することを特徴とする、組成物の処方方法も提供される。

#### 【0035】

例えば、記載した複合体に特異的に結合するが、配列番号：2、4、12、13またはCNTF-Rの成熟ポリペプチドのいずれにも特異的に結合しない抗体の由来する抗原結合部位を含む結合化合物が提供される。特定の具体例は、結合化合物が容器中にあるもの、Fv、Fab、Fab2フラグメントであるもの；あるいは別の化学的部分に抱合しているもの；あるいは実質的に純粋なIL-6とCLF-1との複合体に対して生起した抗体；実質的に純粋なIL-6とCNTF-Rとの複合体に対して生起した抗体；免疫選択された抗体；ポリクローナル抗体；抗原に対する少なくとも30 μMのKdを示す抗体；ビーズまたはプラスチック膜を包含する固体基材に結合された抗体；滅菌済み組成物中にある抗体；あるいは放射活性または蛍光標識を包含する標識で検出可能に標識された抗体であるものを包含する。さらなる具体例は、記載した滅菌済み結合化合物、あるいは記載した結合化合物および担体を含む組成物を包含し、ここに担体は水、セイラインおよび/またはバッファー等の水性化合物であり、さらに/あるいは組成物は経口、直腸、鼻腔、局所、または非経口投与用に処方される。

#### 【0036】

結合組成物に関連して、記載した結合化合物ならびに該結合化合物を入れるコンパートメント、および/またはキット中の試薬の使用または処分にに関する説明

書を含むキットが提供される。また、適当な条件下においてIL - B60およびCLF - 1ポリペプチドを含む霊長類複合体またはIL - B60およびCNTF - Rポリペプチドを含む霊長類複合体を記載した抗体に接触させ、そのことにより複合体を形成させることを特徴とする、抗原：抗体複合体の製造方法も提供される。好ましくは、該方法において、複合体は他のサイトカインから精製され；該複合体は他の抗体から精製され；接触はサイトカイン含有試料との接触であり；接触は抗原の定量的検出を可能にするものであり；接触は抗体を含む試料との接触であり；あるいは接触は抗体の定量的検出を可能にするものである。

#### 【0037】

種々の核酸、例えば、単離または組み換え核酸が提供され、単離または組み換え核酸は、上記アミノ酸部分をコードするもの；記載したアミノ酸部分をコードし、配列番号：1または3由来の少なくとも30個の連続したヌクレオチドのセグメントを含むものであり；該核酸は配列番号：2または4由来の少なくとも7個の連続したアミノ酸のセグメント、および配列番号：12または13由来の少なくとも7個の連続したアミノ酸を同時発現するもの；あるいは配列番号：2または4由来の少なくとも7個の連続したアミノ酸のセグメント、およびCNTF - R由来の少なくとも7個の連続したアミノ酸のセグメントを同時発現するものである。好ましい核酸は、例えば、ヒト由来のIL - B60をコードするもの；ヒト由来のCLF - 1をコードするもの；ヒト由来のCNTF - Rをコードするもの；発現ベクターであるもの；さらに複製開始点を含むもの；検出可能な標識を含むもの；合成ヌクレオチド配列を含むもの；あるいは6 kb未満、好ましくは3 kb未満であるものを包含する。組み換え核酸を含む細胞が提供され、例えば、細胞は原核細胞；真核細胞；細菌細胞；酵母細胞；昆虫細胞；哺乳動物細胞；マウス細胞；霊長類細胞；またはヒト細胞である。種々の核酸キットが提供され、該キットは、例えば、核酸ならびに該核酸を入れるコンパートメント；さらに霊長類IL - B60ポリペプチドを入れるコンパートメント；さらに霊長類CLF - 1ポリペプチドを入れるコンパートメント；さらに霊長類CNTF - Rポリペプチドを入れるコンパートメント；またはキット中の試薬の使用または処分に関する説明書を含む。例えば、かかる核酸を適当な条件下で相補的核酸と接触

させ、そのことにより2本鎖を形成させることを特徴とする、2本鎖核酸の製造方法；核酸を発現させ、そのことによりポリペプチドを得ることを特徴とする、ポリペプチドの発現方法；あるいは細胞を適当な条件下で核酸と接触させ、そのことにより細胞をトランスフェクションすることを特徴とする、細胞のトランスフェクション方法も提供される。

#### 【0038】

別の具体例において、本発明は、配列番号：12、13、または霊長類CNTF-Rの少なくとも5個の連続したアミノ酸をコードする単離または組み換え核酸；30で2M未満の塩において30分の洗浄条件において配列番号：1のコーディング部分にハイブリダイゼーションする単離または組み換え核酸；あるいは少なくとも約30ヌクレオチドの鎖において霊長類IL-B60に対する同一性を示す単離または組み換え核酸を提供する。好ましい具体例は下記のものを包含する：単離核酸の場合には：連続したアミノ酸数が少なくとも8；洗浄条件は45および/または500mMの塩；または鎖が少なくとも55ヌクレオチド；あるいは組み換え核酸の場合には：連続したアミノ酸数が少なくとも12；洗浄条件は55および/または150mMの塩；または鎖が少なくとも75ヌクレオチド。

#### 【0039】

特に本発明は、哺乳動物IL-B60およびCLF-1またはCNTF-Rを含む複合体のアゴニストまたはアンタゴニストに細胞を接触させることを特徴とする、細胞または組織培養細胞の生理学または発達をモジュレーションする方法を提供する。また本発明は、例えば、組み換えIL-B60と組み換えCLF-1またはCNTF-Rとを同時発現させることを特徴とする、記載した複合体の製造方法；IL-B60ポリペプチドとCLF-1またはCNTF-Rとを発現させることを特徴とする、IL-B60ポリペプチドの分泌を増加させる方法；あるいはCLF-1とIL-B60とを発現させることを特徴とする、CLF-1ポリペプチドの分泌を増加させる方法を提供する。典型的には、増加は少なくとも3倍であり、発現はポリペプチドとCLF-1の一方または両方をコードする組み換え核酸の発現である。

## 【0040】

また、記載した複合体に結合する受容体のスクリーニング方法も提供され、該方法は、複合体を受容体に結合させる条件下において、受容体を発現する細胞に複合体を接触させ、そのことにより検出可能な相互作用を得ることを特徴とする。好ましくは、相互作用は細胞において生理学的応答を引き起こすものである。

## 【0041】

好ましい具体例の詳細な説明

本明細書にて引用したすべての文献を、出典明示により本明細書に一体化させる。

## I. 一般的事項

本発明は、例えば、免疫細胞間または他の細胞間のシグナルを伝達しうる分泌分子であるサイトカインである種々の哺乳動物蛋白をコードするアミノ酸配列およびDNA配列を提供する。例えば、Paul (1998) *Fundamental Immunology* (4th ed.) Raven Press, N.Y. 参照。完全長サイトカイン、およびフラグメント、またはアンタゴニストは、例えば、受容体を発現する細胞の生理学的モジュレーションにおいて有用であろう。例えばT細胞、B細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、マクロファージ、樹状細胞、造血前駆細胞等のごときリンパ細胞を包含する造血細胞に対して、IL-B60が刺激または阻害いずれかの効果を有する可能性がある。該蛋白は、蛋白上の種々のエピトープ(直鎖状およびコンホーメーション的エピトープの両方)に対して抗体を生起させるための抗原、例えば免疫原としても有用である。

## 【0042】

IL-B60をコードする配列はヒトゲノム配列から同定された。該分子はhuIL-B60と命名された。げっ歯類配列、例えば、マウス由来のものも記載する。

## 【0043】

ヒト遺伝子は約198アミノ酸の小型可溶性サイトカイン様蛋白をコードしている。推定シグナル配列はおそらく約17残基であり、MetからAlaまでであろう。表1ならびに配列番号：1および2参照。IL-B60は長鎖サイトカ

インのメンバーに特徴的な構造モチーフを示す。例えば、IL - B60、G - CSFおよびIL - 6、Genbankから利用可能な配列を比較のこと。最大の合致はCT - 1、オンコスタチンM、およびCNTFとの間である。表2も参照。

【0044】

表1： 霊長類、例えばヒト由来のIL - B60をコードする核酸（配列番号：1）。推定シグナル開裂部位を示す。ヌクレオチド375はAであるかもしれない。翻訳されたアミノ酸配列は配列番号：2である。

```

ccgagcgaaa aaaacctgcg agtgggcctg gcggatggga ttattaaagc ttcgccggag 60
ccgcggtctg ccctcccact ccgccagcct ccgggagagg agccgcaccc ggccggcccc 120
gccccagccc catggacctc cgagcagggg actcgtgggg g atg tta gcg tgc ctg 176
                                         Met Leu Ala Cys Leu
                                         -15

tgc acg gtg ctc tgg cac ctc cct gca gtg cca gct ctc aat cgc aca 224
Cys Thr Val Leu Trp His Leu Pro Ala Val Pro Ala Leu Asn Arg Thr
      -10                -5                -1  1

ggg gac cca ggg cct ggc ccc tcc atc cag aaa acc tat gac ctc acc 272
Gly Asp Pro Gly Pro Gly Pro Ser Ile Gln Lys Thr Tyr Asp Leu Thr
      5                10                15                20

cgc tac ctg gag cac caa ctc cgc agc ttg gct ggg acc tat ctg aac 320
Arg Tyr Leu Glu His Gln Leu Arg Ser Leu Ala Gly Thr Tyr Leu Asn
                25                30                35

tac ctg ggc ccc cct ttc aac gag cca gac ttc aac cct ccc cgc ctg 368
Tyr Leu Gly Pro Pro Phe Asn Glu Pro Asp Phe Asn Pro Pro Arg Leu
                40                45                50

ggg gca gag act ctg ccc agg gcc act gtt gac ttg gag gtg tgg cga 416
Gly Ala Glu Thr Leu Pro Arg Ala Thr Val Asp Leu Glu Val Trp Arg
                55                60                65

agc ctc aat gac aaa ctg cgg ctg acc cag aac tac gag gcc tac agc 464

```

Ser Leu Asn Asp Lys Leu Arg Leu Thr Gln Asn Tyr Glu Ala Tyr Ser  
 70 75 80  
 cac ctt ctg tgt tac ttg cgt ggc ctc aac cgt cag gct gcc act gct 512  
 His Leu Leu Cys Tyr Leu Arg Gly Leu Asn Arg Gln Ala Ala Thr Ala  
 85 90 95 100  
 gag ctg cgc cgc agc ctg gcc cac ttc tgc acc agc ctc cag ggc ctg 560  
 Glu Leu Arg Arg Ser Leu Ala His Phe Cys Thr Ser Leu Gln Gly Leu  
 105 110 115  
 ctg ggc agc att gcg ggc gtc atg gca gct ctg ggc tac cca ctg ccc 608  
 Leu Gly Ser Ile Ala Gly Val Met Ala Ala Leu Gly Tyr Pro Leu Pro  
 120 125 130  
 cag ccg ctg cct ggg act gaa ccc act tgg act cct ggc cct gcc cac 656  
 Gln Pro Leu Pro Gly Thr Glu Pro Thr Trp Thr Pro Gly Pro Ala His  
 135 140 145  
 agt gac ttc ctc cag aag atg gac gac ttc tgg ctg ctg aag gag ctg 704  
 Ser Asp Phe Leu Gln Lys Met Asp Asp Phe Trp Leu Leu Lys Glu Leu  
 150 155 160  
 cag acc tgg ctg tgg cgc tcg gcc aag gac ttc aac cgg ctc aag aag 752  
 Gln Thr Trp Leu Trp Arg Ser Ala Lys Asp Phe Asn Arg Leu Lys Lys  
 165 170 175 180  
 aag atg cag cct cca gca gct gca gtc acc ctg cac ctg ggg gct cat 800  
 Lys Met Gln Pro Pro Ala Ala Ala Val Thr Leu His Leu Gly Ala His  
 185 190 195  
 ggc ttc tgacttctga ccttctcctc ttcgctcccc cttcaaacc tgctcccact 856  
 Gly Phe  
 ttgtgagagc cagccctgta tgccaacacc tgttgagcca ggagacagaa gctgtgagcc 916  
 tctggccctt tctggaccg gctgggcgtg tgatgcatc agccctgtct cctcccacc 976  
 tcccaaaggt ctaccgagct ggggaggagg tacagtaggc cctgtcctgt cctgtttcta 1036  
 caggaagtca tgctcgaggg agtgtgaagt ggttcaggtt ggtgcagagg cgctcatggc 1096



aat cct cct cga ctg ggg gca gaa act ctg ccc agg gcc acg gtc aac	240
Asn Pro Pro Arg Leu Gly Ala Glu Thr Leu Pro Arg Ala Thr Val Asn	
50 55 60	
ttg gaa gtg tgg cga agc ctc aat gac agg ctg cgg ctg acc cag aac	288
Leu Glu Val Trp Arg Ser Leu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Thr Gln Asn	
65 70 75	
tat gag gcg tac agt cac ctc ctg tgt tac ttg cgt ggc ctc aac cgt	336
Tyr Glu Ala Tyr Ser His Leu Leu Cys Tyr Leu Arg Gly Leu Asn Arg	
80 85 90 95	
cag gct gcc aca gct gaa ctc cga cgt agc ctg gcc cac ttc tgt acc	384
Gln Ala Ala Thr Ala Glu Leu Arg Arg Ser Leu Ala His Phe Cys Thr	
100 105 110	
agc ctc cag ggc ctg ctg ggc agc att gca ggt gtc atg gcg acg ctt	432
Ser Leu Gln Gly Leu Leu Gly Ser Ile Ala Gly Val Met Ala Thr Leu	
115 120 125	
ggc tac cca ctg ccc cag cct ctg cca ggg act gag cca gcc tgg gcc	480
Gly Tyr Pro Leu Pro Gln Pro Leu Pro Gly Thr Glu Pro Ala Trp Ala	
130 135 140	
cct ggc cct gcc cac agt gac ttc ctc cag aag atg gat gac ttc tgg	528
Pro Gly Pro Ala His Ser Asp Phe Leu Gln Lys Met Asp Asp Phe Trp	
145 150 155	
ctg ctg aag gag ctg cag acc tgg cta tgg cgt tca gcc aag gac ttc	576
Leu Leu Lys Glu Leu Gln Thr Trp Leu Trp Arg Ser Ala Lys Asp Phe	
160 165 170 175	
aac cgg ctt aag aag aag atg cag cct cca gca gct tca gtc acc ctg	624
Asn Arg Leu Lys Lys Lys Met Gln Pro Pro Ala Ala Ser Val Thr Leu	
180 185 190	
cac ttg gag gcc cat ggt ttc tga	648
His Leu Glu Ala His Gly Phe	

表1 ( 続き ) :

MLACLCTVLWHLPAVPA/LNRTGDPGPGPSIQKTYDLTRYLEHQLRSLAGTYLNYLGPPFNEPDFNPPRLGA  
 ETLPRATVNLEVWRSLNDRRLRLTQNYEAYSHLLCYLRGLNRQAATAELRRSLAHFCTSLQGLLGS IAGVMAT  
 LGYPLPQPLPGTEPAWAPGPAHSDFLQKMDDFWLLKELQTWLWRSKDFNRLKKKMQPPAASVTLHLEAHGF

【 0 0 4 5 】

表2 : 霊長類およびげっ歯類のIL - B60具体例の比較、ヌクレオチドおよびアミノ酸両方の配列を示す。

hIL-B60 ATGTTAGCGTGCCTGTGCACGGTGTCTGGCACCTCCCTGCAGTGCCAGCTCTCAATCGC

mIL-B60 ATGTTAGCTTGCCTATGCACGGTGTCTGGCACCTCCCTGCAGTGCCAGCTCTTAATCGC

\*\*\*\*\*

hIL-B60 ACAGGGGACCCAGGGCCTGGCCCCTCCATCCAGAAAACCTATGACCTCACCCGCTACCTG

mIL-B60 ACAGGAGATCCAGGCCCTGGCCCCTCCATCCAGAAAACCTATGACCTCACCCGCTACCTG

\*\*\*\*\*

hIL-B60 GAGCACCAACTCCGCAGCTTGGCTGGGACCTATCTGAACTACCTGGGCCCCCTTTCAAC

mIL-B60 GAGCATCAACTCCGCAGCTTAGCTGGGACCTACCTGAACTACCTGGGCCCCCTTTCAAC

\*\*\*\*\*

hIL-B60 GAGCCAGACTTCAACCCTCCCCGCCTGGGGGCAGAGACTCTGCCAGGGCCACTGTTGAC

mIL-B60 GAGCCTGACTTCAATCCTCCTCGACTGGGGGCAGAACTCTGCCAGGGCCACGGTCAAC

\*\*\*\*\*

hIL-B60 TTGGAGGTGTGGCGAAGCCTCAATGACAACTGCGGCTGACCCAGAACTACGAGGCCTAC

mIL-B60 TTGGAAGTGTGGCGAAGCCTCAATGACAGGCTGCGGCTGACCCAGAACTATGAGGCGTAC

\*\*\*\*\*

hIL-B60 AGCCACCTTCTGTGTTACTTGCGTGGCCTCAACCGTCAGGCTGCCACTGCTGAGCTGCGC

mIL-B60 AGTCACCTCCTGTGTTACTTGCGTGGCCTCAACCGTCAGGCTGCCACAGCTGAACTCCGA

\*\*\*\*\*

hIL-B60 CGCAGCCTGGCCACTTCTGCACCAGCCTCCAGGGCCTGCTGGGCAGCATTGCGGGCGTC

mIL-B60 CGTAGCCTGGCCACTTCTGTACCAGCCTCCAGGGCCTGCTGGGCAGCATTGCAGGTGTC

\*\*\*\*\*

```

hIL-B60  ATGGCAGCTCTGGGCTACCCACTGCCCCAGCCGCTGCCTGGGACTGAACCCACTTGGACT
mIL-B60  ATGGCGACGCTTGGCTACCCACTGCCCCAGCCTCTGCCAGGGACTGAGCCAGCCTGGGCC
*****  * ** *****
hIL-B60  CCTGGCCCTGCCACAGTGACTTCCTCCAGAAGATGGACGACTTCTGGCTGCTGAAGGAG
mIL-B60  CCTGGCCCTGCCACAGTGACTTCCTCCAGAAGATGGATGACTTCTGGCTGCTGAAGGAG
*****
hIL-B60  CTGCAGACCTGGCTGTGGCGCTCGGCCAAGGACTTCAACCGGCTCAAGAAGAAGATGCAG
mIL-B60  CTGCAGACCTGGCTATGGCGTTCAGCCAAGGACTTCAACCGGCTTAAGAAGAAGATGCAG
*****
hIL-B60  CCTCCAGCAGCTGCAGTCACCCTGCACCTGGGGGCTCATGGCTTCTGA
mIL-B60  CCTCCAGCAGCTTCAGTCACCCTGCACCTGGAGGCCCATGGTTTCTGA
*****

```

表 2 ( 続き ) :

IL - B 6 0 の並置比較: 下線は提案されたヘリックスである。一般的には、ヘリックスAおよびD中にあり、内側のコアを向かない残基(大部分がAおよびDヘリックス中の疎水性残基)は受容体と相互作用する可能性が最も高い残基である。

A

```

hIL-B60  MLACLCTVLWHLPAVPALNRTGDPGPGPSIQKTYDLTRYLEHQLRSLAGT
mIL-B60  MLACLCTVLWHLPAVPALNRTGDPGPGPSIQKTYDLTRYLEHQLRSLAGT
*****

```

B

```

hIL-B60  YLNYLGPPFNEPDFNPPRLGAETLPRATVDLEVWRSLNDKLRLTQNYEAY
mIL-B60  YLNYLGPPFNEPDFNPPRLGAETLPRATVNLEVWRSLNDRLRLTQNYEAY
*****

```

C

```

hIL-B60  SHLLCYLRGLNRQAATAELRRSLAHFCTSLQGLLGS IAGVMAALGYPLPQ
mIL-B60  SHLLCYLRGLNRQAATAELRRSLAHFCTSLQGLLGS IAGVMATLGYPLPQ

```

\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

D

hIL-B60 PLPGTEPTWTPGPAHSDFLQKMDDFWLLKELQTLWRSKDFNRLKKKMQ

mIL-B60 PLPGTEPAWAPGPAHSDFLQKMDDFWLLKELQTLWRSKDFNRLKKKMQ

\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

hIL-B60 PPAAAVTLHLGAHGF

mIL-B60 PPAASVTLHLEAHGF

\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

【0046】

表3: IL-B60と種々のサイトカインとの比較。ヒトIL-B60は配列番号: 2であり; マウスIL-B60は配列番号: 4であり; マウスLIF (mLIF)は配列番号: 5であり受託番号はX06381であり; ヒトLIF (hLIF)は配列番号: 6であり受託番号はM63420 J05436であり; ヒトCT-1 (hCT-1)は配列番号: 7であり受託番号はU43030であり; マウスCT-1 (mCT-1)は配列番号: 8であり受託番号はU18366であり; ヒトCNTF (hCNTF)は配列番号: 9であり受託番号はX60542であり; マウスCNTF (mCNTF)は配列番号: 10であり受託番号はU05342であり; ヒトDNAX IL-40 (hDIL-40)は配列番号: 11である。

mLIF -MKVLAAGIVPLLLLVLHWKHGAGSPLPI-TPVNATC-AIRHPCHGNLMN

hLIF -MKVLAAGVVP-LLLVLHWKHGAGSPLPI-TPVNATC-AIRHPCHNNLMN

hCT-1 --MSRREGSLE---D--PQTDSSVSLLPH-LEA-----KIRQT-HS--LA

mCT-1 --MSQREGSLE---D--HQTDSSISFLPH-LEA-----KIRQT-HN--LA

hIL-B60 -MLACLCTVLW-----HLPVPALNRTG-DPG-PGP-SIQKT-YD--LT

mIL-B60 -MLACLCTVLW-----HLPVPALNRTG-DPG-PGP-SIQKT-YD--LT

hCNTF -----MAFTE-----HSPLTPHR-R---D-L-CSR-SIW-----LA

mCNTF -----MAFAE-----QSPLTLHR-R---D-L-CSR-SIW-----LA

hDIL-40 MTHLSLLGPLPCVRTSQQLPETQQVTPGKKPVSVGRREVRVP-----GT

: .

mLIF QIKNQLAQLNGSANALFISYYTAQGEPF--PNNVEK-LCAPNMTDFPSFH

hLIF QIRSQLAQLNGSANALFILYYTAQGEPF--PNNLDK-LCGPNVTDFFPFH  
hCT-1 HLLTKYAEQ-----LLQEYVQLQGDPFGLPSFSPRLPVAGLSAPAPSH  
mCT-1 RLLTKYAEQ-----LLEEYVQQQGEFGLPGFSPRLPLAGLSGPAPSH  
hIL-B60 RYLEHQLRS-----LAGTYLNYLGPPFNPDFNPPRLGAETLPRATVDL  
mIL-B60 RYLEHQLRS-----LAGTYLNYLGPPFNPDFNPPRLGAETLPRATVNL  
hCNTF RKIRSDLTA-----LTESYVKHQG--LNK---NINLDSADGMPVASTD-  
mCNTF RKIRSDLTA-----LMESYVKHQG--LNK---NISLDSVDGVPVASTD-  
hDIL-40 ALVPSLLSV-----SVLLQLQYQGSPFSDPGFSAPELQSSLPPATAFF

\* : . . : . .

mLIF ---GNGTEKTKLVELYRMVAYLSASLTNITR-DQKVLNPTAVSLQVKLNA  
hLIF ---ANGTEKAKLVELYRIVVYLGTSLGNITR-DQKILNPSALSLSHKLNA  
hCT-1 ---AGLPVHERLRDLAAALAALPPLLDVCR-RQAELNPRAPRLRRLED  
mCT-1 ---AGLPVSERLRQDAAALSVLPALLDAVRR-RQAELNPRAPRLRSLED  
hIL-B60 EVWRSLNDKLRLTQNYEAYSHLLCYLRGLN--RQAATAELRRSLAHFCTS  
mIL-B60 EVWRSLNDRLRLTQNYEAYSHLLCYLRGLN--RQAATAELRRSLAHFCTS  
hCNTF -QWSELTEAERLQENLQAYRTFHVLLARLLEDQQVHFTPTGDFHQA IHT  
mCNTF -RWSEMTEAERLQENLQAYRTFQGMLTKLLEDQRVHFTPTGDFHQA IHT  
hDIL-40 KTWHALDDGERLSLAQRAID---PHLQLVED-DQSDLNPGSPILPAQLGA

: : \* \* : : :

mLIF TIDVMRGLLSNVLCRLCNKYRV--GHVDVPP-----VPDHSKE--AFQR  
hLIF TADILRGLLSNVLCRLCSKYHV--GHVDVTY-----GPDTSKGD--VFQK  
hCT-1 AARQARALGAAVEALLAALGAANRGPRAEPP--AATASAASATG--VFPA  
mCT-1 AARQVRALGAAVETVLAALGAAARGPGPEPVTVATLFTANSTAG--IFSA  
hIL-B60 LQGLLGSIAGVMAALGYPLPQP--LPGTEPT----WTPGPAHS---DFLQ  
mIL-B60 LQGLLGSIAGVMATLGYPLPQP--LPGTEPA----WAPGPAHS---DFLQ  
hCNTF LLLQVAAFAYQIEELMILLEYK--IPRNEAD----GMPINVDGG-LFEK  
mCNTF LTLQVSAFAYQLEELMALLEK--VPEKEAD----GMPVTIGDGG-LFEK  
hDIL-40 ARLRAQGPLGNMAAIMTALGLP--IP-PEED-----TPGLAAFGASAFER

. : . \*

表3(続き):

mLIF KKLGCQLLGTYKQVIS----VVVQAF-----  
 hLIF KKLGCQLLGKYKQIIA----VLAQAF-----  
 hCT-1 KVLGLRVCGLYREWLSRTEGDLGQLLPGGSA-----  
 mCT-1 KVLGFHVCGLYGEWVSRTEGDLGQLVPGGVA-----  
 hIL-B60 KMDDFWLLKELQTLWRSKDFNRLKKKMPPAAAVTLHLGAHGF--  
 mL-B60 KMDDFWLLKELQTLWRSKDFNRLKKKMPPAASVTLHLEAHGF--  
 hCNTF KLGWGLKVLQELSQWTVRSIHDL-RFISSHQTGIPARGSHYIANNKMM  
 mCNTF KLGWGLKVLQELSQWTVRSIHDL-RVSSHMGISAHESHYGA--KQM  
 hDIL-40 KCRGYVVTREYGHWTDRVRDLALLKAKYSA-----

\* . : . . : .

## 【0047】

関連サイトカイン蛋白に対するIL-B60の構造上の相同性はこの分子の関連機能を示唆する。IL-B60はIL-6およびG-CSFに対して配列類似性を示す長鎖サイトカインである。

## 【0048】

IL-B60アゴニストまたはアンタゴニストは機能的アンタゴニストまたは受容体アンタゴニストとして作用する可能性があり、例えば、IL-6またはG-CSFのそれらの受容体への結合をブロックする可能性があり、あるいはそのアンタゴニストは、免疫疾患を包含する異常な医学的症状、例えば、T細胞免疫不全、慢性炎症または組織拒絶反応、あるいは心臓血管系の症状または神経生理学的症状の治療において有用である可能性がある。

## 【0049】

天然の抗原は、標的細胞における生物学的または生理学的応答を導く種々の生化学的応答を媒介しうる。本発明において特徴づけられる好ましい具体例はヒト由来のもの、霊長類由来のもの、あるいは天然に存在する他の種のカウンターパートである。他の哺乳動物種、例えば、霊長類、イヌ、ネコおよびげっ歯類における蛋白に関するさらなる配列も利用可能なはずである。下記参照。以下の説明はヒトIL-B60についての例示を目的とするが、他の種由来の関連具体例に

も同様に適用できる。

#### 【0050】

詳細には、IL - B60とパートナーとの会合が確認された。IL - B60およびCLF - 1分子は一緒に進化した可能性があり、種間におけるそれらの相同性に反映されている。例えば、ヒト/マウスCLF - 1と同様にIL - B60のヒト/マウス関連性が非常に密接なものであることによりそれらの機能の同時進化が示唆される。2つの蛋白が機能的に関連している場合、それらはIL - 12の様式で一緒に作用する可能性がある。例えば、Trinchieri (1998) *Adv. Immunol.* 70:83-243; Gately, et al. (1998) *Ann. Rev. Immunol.* 16:495-521; および Trinchieri (1998) *Int. Rev. Immunol.* 16:365-396参照。

#### 【0051】

しかしながら、それらは複合体として、サイトカイン受容体ファミリー中の2種の背の高い受容体、例えば、gp130、LIF - R、OSM - R、IL - 12Rb1、IL - 12Rb2、およびNR30と相互作用するであろう。これらの受容体は可溶性複合体に対する結合に関して試験されるであろう。種々のこれらの背の高い受容体を安定に発現する一連のBAF / 3細胞が構築されている。

#### 【0052】

同じ細胞におけるIL - B60およびCLF - 1の両方（または単一組み合わせの構築物）でのトランスフェクション体の上清を用いて種々のこれらのBAF / 3細胞を試験して、増殖または他のシグナリング応答が存在するかどうかを調べる。そのようなものとして、サイトカインの大部分の生理学的効果は蛋白複合体によるものである可能性がある。そのようなものとして、サイトカインから生じる生物学的様相に関する以下の説明の多くは、実際に、サブユニットの組み合わせを含む複合体により生理学的に引き起こされる可能性がある。

#### 【0053】

表4はCLF - 1として知られるIL - B60パートナーの配列を示す。CNTF受容体(CNTF - R)サブユニットアルファは、例えば、Davis, et al. (1991) *Science* 253:59-63により記載されている。GenBank受託番号NM1001842およびM73238 (ヒト); AF068615 (マウス); および S54212 (ラット)も参照; 出典

明示によりそれぞれを本明細書に一体化させる。

【0054】

表4：ヒトおよびマウスのサイトカイン様因子1（CLF-1；配列番号：12および13）の並置比較。Elson, et al. (1998) J. Immunol. 161:1371-1379; GenBank Accession number AF059293 and NM\_004750参照。WO9920755においてDouglas J. Hilton (Australia) によっても記載されている。G S G / A H T において開裂されるヒト形態中の37個のアミノ酸のシグナル配列を示す。

```

hCLF-1  MPAGRRGPAAQSAARRPPPLPLLLLLCVLGAPRAGSGAHTAVI SPQDPTL
mCLF-1  -----RPLSSLWSPLLLCVLGVPRGGSGAHTAVI SPQDPTL
          ** . *      ***** . ** . *****

hCLF-1  LIGSSLLATCSVHGDPPGATAEGLYWTNGRRLPPELSRVLNASTLALAL
mCLF-1  LIGSSLQATCSIHGDTPGATAEGLYWTNGRRLP-SLSRLLNTSTLALAL
          ***** . ***** . ***** . ***** . *****

hCLF-1  ANLNGSRQRSGDNLVCHARDGSI LAGSCLYVGLPPEKPVNI SCWSKNMKD
mCLF-1  ANLNGSRQQSGDNLVCHARDGSI LAGSCLYVGLPPEKPFNI SCWSRNMKD
          ***** . ***** . ***** . *****

hCLF-1  LTCRWTPGAHGETFLHTNYSLKYKLRWYGQDNTCEEYHTVGPHSCHI PKD
mCLF-1  LTCRWTPGAHGETFLHTNYSLKYKLRWYGQDNTCEEYHTVGPHSCHI PKD
          *****

hCLF-1  LALFTPYE IWVEATNRLGSARSDVLTLDI LDVVTDDPPPDVHVS RVGGLE
mCLF-1  LALFTPYE IWVEATNRLGSARSDVLTLDVLDVVTDDPPPDVHVS RVGGLE
          *****

hCLF-1  DQLSVRWVSPALKDFLFQAKYQIRYRVEDSVDWKVDDVSNQTS CRLAG
mCLF-1  DQLSVRWVSPALKDFLFQAKYQIRYRVEDSVDWKVDDVSNQTS CRLAG
          *****

hCLF-1  LKPGTVYFVQVRCNPFGI YGSKKAGI WSEWSHPTAASTPRSERPGPGGGA
mCLF-1  LKPGTVYFVQVRCNPFGI YGSKKAGI WSEWSHPTAASTPRSERPGPGGGV
          *****

hCLF-1  CEPRGGEPSSGPVRRRELKQFLGWLKKHAYCSNLSFRLYDQWRWMMQKSHK

```

mCLF-1 CEPRGGEPSSGPVRRRELKQFLGWLKKHAYCSNLSFRLYDQWRRAWMQKSHK

\*\*\*\*\*

hCLF-1 TRNQ---VLPDKL-----

mCLF-1 TRNQDEGILPSGRRGAARGPAG

\*\*\*\* :\*\*.

#### 【0055】

ヒトCLF-1受容体配列の標準的なドメインは、1からほぼ38までのシグナル；ほぼ残基39から130までの第1のIG様ドメイン；ほぼ131からほぼ237までの第2のドメイン；およびほぼ238から最後まで最終ドメインに、ほぼ対応する。

#### 【0056】

以下の説明はCLF-1またはIL-B60/CLF-1複合体にも適用できる。IL-B60とCLF-1との融合物、例えば、ハイパーIL-6を構築してもよい。例えば、Fischer, et al. (1997) *Nature Biotechnol.* 15:142-145; Rakemann, et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:1257-1266; および Peters, et al. (1998) *J. Immunol.* 161:3575-3581参照(出典明示によりこれらを本明細書に一体化させる)。

#### 【0057】

CNTFの元々の発見および神経細胞の有効な生き残り因子としての特徴づけ(例えば、Hughes, et al. (1988) *Nature* 335:70-73; and Stockli, et al. (1989) *Nature* 342:920-923参照)により、ダメージを受けたあるいは重篤な運動ニューロンを迅速に修復しうる分子として(Sendtner, et al. (1990) *Nature* 345:440-441; and Curtis, et al. (1993) *Nature* 365:253-256)あるいは神経変性を防止する分子として(Sendtner, et al. (1992) *Nature* 358:502-504; Emerich, et al. (1997) *Nature* 386:395-399; および Gravel, et al. (1997) *Nature Med.* 3:765-770)治療的に使用できる見込みが示唆された。しかしながら、奇妙なことに、CNTFは分泌シグナルペプチドを持たない蛋白であり、細胞から出てこないように思われる(Stockli, et al., *ibid*)。さらにそのうえ、処理による(Masu, et al. (1993) *Nature* 365:27-32)あるいは天然に存在する(

Takahashi, et al. (1994) *Nature Genet.* 7:79-84) CNTF 遺伝子の破壊は有害なものではない。対照的に、CNTFの主要受容体(CNTF-R)の遺伝子破壊は生後間もなく致命的なものとなることが証明されている(DeChiara, et al. (1995) *Cell* 83:313-322)。まとめると、これらの観察結果は、インビトロにおいて観察された、あるいはインビボにおいて必要な、CNTFの機能に生理学的に応答するCNTF-Rに対する第2のリガンドの存在を指摘するものである。この研究は、複合体サイトカインIL-6/CDF-1が、以前から探し求められていた発達において重要な因子である可能性であることを示すものであり、それは標的器官から分泌され、運動ニューロンによるそれらの刺激を指令し、さらに治療上有望なものである。なぜなら、神経トランセクションが、迅速かつ長期にわたり持続するIL-6およびCDF-1両方の誘導を引き起こすからである。このモデルを支持して、CDF-1の遺伝子破壊(Alexander, et al. (1999) *Curr. Biol.* 9:605-608)はCNTF-Rノックアウトとほぼ類似の表現型である。

#### 【0058】

興味深いことに、IL-6はシグナルペプチドであるが、説明されているようにその分泌はCDF-1との複合体化に厳密に依存したままである。いったん分泌されると、IL-6は、CNTFのものと同一三分節(tripartite)受容体システム(2つの普遍的に発現されるシグナル伝達成分gp130およびLIF-R、ならびに特異性決定受容体CNTF-Rからなる)を介してシグナルを発する。顕著なことに、CDF-1の役割はシャペロンの役割に限定されているように思われる。なぜならCNTF-RへのIL-6のデリバリー後にそれがシグナリング複合体から捨てられるからである。実際に、CDF-1に対する必要性は、IL-6を可溶性形態のCNTF-R鎖に直接融合させることにより回避されうる。この新規システムに含まれる3つの蛋白鎖IL-6、CDF-1およびCNTF-Rのすべては、造血サイトカイン/受容体スーパーファミリーにおいて最も高度に保存された配列を示し、進化的に重要な相互作用が示唆される。さらにそのうえ、分泌因子および護送者としての造血受容体の条件的使用はサイトカイン活性に関する新規規範を示す。

## 【0059】

まとめると、この研究は、CNTF受容体複合体の新規使用を記載することにより、2つのオーファン(orphan)分子IL-B60およびCLF-1の複雑に絡まった生物学的機能に光を当てるものである。そうすることにおいて、我々は、運動ニューロンの発達および再生における重要な生理学的因子として役立つのはIL-B60/CLF-1サイトカインであると強く論じる。

## 【0060】

## II. 精製IL-B60または複合体

配列番号：2中の1の具体例において、ヒトIL-B60アミノ酸配列は知られている。当該蛋白をコードする他の天然に存在する核酸を、示された配列を用いる標準的方法により、例えば、PCR法またはハイブリダイゼーションにより単離することができる。アミノ末端からカルボキシ末端まで示されるこれらのアミノ酸配列は、他の蛋白と蛋白抗原との識別ならびに種々の変種の例証を可能にするためのサイトカインに関する配列の情報を提供することにおいて重要である。そのうえ、ペプチド配列は、ペプチドを調製してかかるセグメントを認識する抗体を得ることを可能にし、ヌクレオチド配列はオリゴヌクレオチドプローブの調製を可能にし、いずれも検出または単離のための戦略、例えば、かかる配列をコードする遺伝子のクローニングのための戦略である。

## 【0061】

本明細書の用語「ヒト可溶性IL-B60」は、蛋白について使用される場合、配列番号：2に由来する可溶性ポリペプチドに対応するアミノ酸配列を有する蛋白を包含する。その重要なフラグメントはしばしば類似の機能、例えば、抗原性を有する。好ましい具体例は複数の別個の、例えば、重複していない一定長さのセグメントである。典型的には、複数のセグメントは少なくとも2個の、より通常には少なくとも3個の、好ましくは5、7またはそれ以上のセグメントである。長さの最小値を列挙してもよいが、より長い種々のサイズが適当であり、例えば、1つのものが7残基であり、2つのものが12残基であってもよい。

## 【0062】。

結合成分、例えば、抗体は、典型的には高いアフィニティー、例えば少なくとも

も約100 nM、通常には約30 nMよりも良好、好ましくは約10 nMよりも良好、より好ましくは約3 nMよりも良好なアフィニティーでIL - B60に結合する。カウンターパート蛋白はヒト以外の哺乳動物種、例えば他の霊長類、有蹄動物またはげっ歯類において見出されるであろう。非哺乳動物種、例えば、鳥類または両生類も構造的または機能的に関連した遺伝子および蛋白を有するはずである。

#### 【0063】

本明細書の用語「ポリペプチド」は、意味のあるフラグメントまたはセグメントを包含し、少なくとも8個のアミノ酸残基、一般的には約12個のアミノ酸残基、典型的には少なくとも約16個のアミノ酸残基、個の約20個のアミノ酸残基、そして特に好ましい具体例においては少なくとも約30個またはそれ以上のアミノ酸残基、例えば35、40、45、50個等のアミノ酸残基の鎖を包含する。かかるフラグメントは実質的にすべての位置において開始および/または終了する末端を有し、すべての実際的組み合わせにおいて、例えば位置1、2、3等において開始し、例えば位置150、149、148等において終了する。特に興味深いペプチドは構造ドメイン境界、例えばヘリックスA、B、Cおよび/またはDに対応する末端を有する。表1参照。

#### 【0064】

用語「結合成分」は、例えば、抗体 - 抗原相互作用においてIL - B60に特異的に結合する分子をいう。特異性とは、多かれ少なかれ、例えば、特定の具体例または関連具体例のグループ、例えば、霊長類、げっ歯類等に特異的なものを包含しうる。枯渇 (depletion) または吸収 (absorption) は所望選択性を提供しうる。例えば、天然の生理学的に重要な蛋白 - 蛋白相互作用において共有結合または非共有結合にてIL - B60に特異的に結合する化合物、例えば蛋白も提供される。分子はポリマーであってもよく、あるいは化学試薬であってもよい。機能的アナログは構造上の修飾を有する蛋白であってもよく、あるいは適当な結合決定基と相互作用する分子形態を有する分子であってもよい。化合物は受容体結合相互作用のアゴニストまたはアンタゴニストとして作用するものであってもよい。例えば、Goodman, et al. (eds.) Goodman & Gilman's: The Pharmacolo

gical Bases of Therapeutics (current ed.) Pergamon Press参照。

【0065】

例えば蛋白の場合には、実質的に純粋とは、典型的には、蛋白が起源生物由来の汚染混入蛋白、核酸または他の生物学的物質を含まないことを意味する。純度は標準的方法により、典型的には重量によりアッセイされ、通常には、少なくとも約40%、一般的には少なくとも約50%、しばしば少なくとも約60%、典型的には少なくとも約80%、好ましくは少なくとも約90%、最も好ましい具体例において少なくとも約95%の純度である。担体または賦形剤がしばしば添加される。

【0066】

ポリペプチドまたはフラグメントの溶解度は環境およびそのポリペプチドに依存する。温度、電解質の環境、ポリペプチドのサイズおよび分子特性ならびに溶媒の性質を包含する多くのパラメーターはポリペプチドの溶解度に影響する。典型的には、ポリペプチドが使用される温度は約4 から約65 の範囲である。通常には、使用温度は約18 よりも高い。診断目的では、温度は、通常にはほぼ室温であるかあるいはそれよりも高いが、アッセイにおける成分の変性温度よりも低い治療目的では、温度は、通常には体温であり、典型的にはヒトおよびマウスについては約37 であるが、特定の状況において温度はインシトゥまたはインビトロにおいて上下されうる。

【0067】

一般的には、ポリペプチドのサイズおよび構造は実質的に安定な状態であり、通常には、変性状態ではない。例えば、溶解度を付与するために、4次構造においてポリペプチドを他のポリペプチドと結合させてもよく、あるいは脂質または界面活性剤と結合させてもよい。

【0068】

通常には、溶媒および電解質は、生物学的活性を提示するために使用されるタイプの生物学的に適合するバッファーであり、通常には、生理学的な水性溶媒であろう。通常には、溶媒は中性pHであり、典型的には約5ないし10、好ましくは約7.5である。いくつかの場合には、1またはそれ以上の界面活性剤、典

型的には温和な非変性的界面活性剤、例えば、CHS（コレステリルヘミサクシネート）またはCHAPS（3-[3-コルアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート）であり、蛋白の構造的または生理学的特性の有意な破壊を避けるような十分に低い濃度である。他の例において、強力な界面活性剤を用いて有意な変性を起こさせてもよい。

#### 【0069】

例えば配列番号：2のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる一定の免疫原あるいは配列番号：1の核酸から生じたポリペプチドのような一定の免疫原に対して生起した抗体、例えばポリクローナル抗体に特異的に結合し、あるいは特異的に免疫反応性のあるIL-B60ポリペプチドは、典型的にはイムノアッセイにおいて決定される。本明細書において構造的または機能的に定義された原型のIL-B60ポリペプチドに対して生起したポリクローナル抗体に選択的に結合するポリペプチドをコードする、機能的変種を包含する本明細書記載の核酸配列は本発明の区画および境界内に包含される。典型的には、イムノアッセイは、例えば配列番号：2の蛋白に対して生起したポリクローナル抗血清を使用する。この抗血清は選択または枯渇されて、他の適当な密接な関連を有するファミリーのメンバー、好ましくは同じ種由来のメンバーとの交差反応性が低くなっており、かかるいずれの交差反応性も、イムノアッセイにおける使用の前に免疫吸収または枯渇により除去される。適当な選択的血清調合物を単離し、特徴づけることができる。

#### 【0070】

イムノアッセイにて使用する抗血清を得るために、蛋白、例えば配列番号：2の蛋白を本明細書記載のごとく単離する。例えば、哺乳動物細胞系において組み換え蛋白を得てもよい。適当な宿主、例えば、Balb/cのごとき同系統繁殖マウス株を、フロイントのアジュバントのごとき標準的なアジュバントおよび標準的なマウス免疫プロトコル（Harlow and Laneの文献参照）を用いて配列番号：2の蛋白で免疫する。別法として、本明細書開示の配列に由来する実質的に完全長の合成ペプチドを免疫原として使用することもできる。ポリクローナル血清を集め、イムノアッセイ、例えば固体支持体に固定化された免疫原を用いる固相

イムノアッセイにて免疫原蛋白に対して力価を測定する。10<sup>4</sup>またはそれ以上の力価を有するポリクローナル抗血清を選択し、上記Harlow and Laneの文献の570 - 573ページに記載されたような競争結合イムノアッセイを用いて、他の密接に関連したファミリーのメンバー、例えば、L I F、C T - 1、C N T F、D I L - 4 0、あるいはI L - 6ファミリーの他のメンバーに対する交差反応性に関して試験する。好ましくは、少なくとも2種のI L - 6 / I L - 1 2ファミリーのメンバーを標的と組み合わせてこの決定に使用する。本明細書記載のごとく、これらの長鎖サイトカインファミリーのメンバーを組み換え蛋白として生成させ、標準的分子生物学および蛋白化学的方法を用いて単離することができる。かくして、I L - B 6 0ファミリーのメンバーのサブセットに対して所望選択性または特異性を有する抗体調合物を同定または生成させることができる。別法として、C L F - 1を伴うI L - B 6 0を含む複合体に結合する抗体を調製してもよい。

#### 【0071】

競争結合フォーマットにおけるイムノアッセイを交差反応性の決定に使用することができる。例えば、配列番号：2の蛋白を固体支持体に固定化することができる。アッセイに添加された蛋白は固定化抗原に対する抗血清の結合と競争する。固定化蛋白に対する抗血清の結合と競争する上記蛋白の能力を配列番号：2の蛋白と比較する。標準的計算法を用いて上記蛋白の交差反応性のパーセンテージを計算する。上記各蛋白に対して10%未満の交差反応性を有する抗血清を選択し、プールする。次いで、上記蛋白との免疫吸収を用いて交差反応性抗体をプールした抗血清から取る。

#### 【0072】

次いで、免疫吸収されプールされた抗血清を上記競争結合イムノアッセイに使用して、第2の蛋白を免疫原蛋白と比較する。この比較を行うために、広範な濃度で2つの蛋白をそれぞれアッセイし、固定化蛋白への抗血清の結合の50%を阻害するのに必要な各蛋白量を決定する。必要な第2の蛋白の量が、例えば配列番号：2の蛋白量の2倍未満である場合、第2の蛋白は、免疫原に対して生じた抗体の特異的に結合するといえる。

## 【0073】

## III. 物理学的変種

本発明は、IL-B60抗原のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白またはペプチドも包含する。変種は種、多型性または対立遺伝子変種を包含する。

## 【0074】

必要ならばギャップを導入することにより残基の合致を最適化することによってアミノ酸配列相同性または配列同一性を決定する。Needleham, et al. (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453; Sankoff, et al. (1983) Chapter One in *Time Warps, String Edits, and Macromolecules: The Theory and Practice of Sequence Comparison*, Addison-Wesley, Reading, MA; および IntelliGenetics, Mountain View, CA; および the University of Wisconsin Genetics Computer Group, Madison, WIからのソフトウェアパッケージも参照。保存的置換を合致とみなした場合には配列同一性が変化する。典型的には、保存的置換は下記グループ内の置換を包含する：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸；アスパラギン、グルタミン；セリン、スレオニン；リジン、アルギニン；およびフェニルアラニン、チロシン。保存を生物学的特徴、機能的特徴、または構造的特徴に適用してもよい。典型的には、相同的アミノ酸配列は蛋白配列の天然の多型または対立遺伝子および種間変種を包含する。典型的な相同的蛋白またはペプチドは、IL-B60のアミノ酸配列に対して25ないし100%の同一性（ギャップが導入できる場合）、50ないし100%の同一性（保存的置換を含める場合）を有するであろう。同一性の測定値は少なくとも約35%、一般的には少なくとも約40%、しばしば少なくとも約50%、典型的には少なくとも約60%、通常には少なくとも約70%、好ましくは少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約90%であろう。

## 【0075】

ヌクレオチド置換、ヌクレオチド欠失、ヌクレオチド挿入、および短いヌクレオチド鎖の逆転により単離IL-B60 DNAを容易に修飾することができる。これらの修飾は、これらの抗原、それらの誘導體、または類似の生理学的、免

疫学的、抗原的または他の機能活性を有する蛋白をコードする新規DNA配列を生じさせる。これらの修飾配列を用いて変異抗原を得て、あるいは発現を促進することができる。促進された発現は遺伝子増幅、転写促進、翻訳促進、および他の機構を包含する。「変異IL-B60」は、上記IL-B60の配列同一性の定義の範囲内のポリペプチドを包含するが、欠失、置換または挿入にかかわらず天然に通常見出されるIL-B60のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドである。一般的には、この用語は、配列番号：2の配列を有する蛋白に対して有意な同一性を有し、それらの配列が種々の生物学的活性、例えば、抗原性または免疫原性を共有し、好ましい具体例においては天然の完全長の開示配列の大部分を含むものである。典型的には、完全長配列が好ましいが、末端切断バージョンも有用であり、同様に、典型的には、天然源から見出される遺伝子または蛋白が最も望ましい。類似の概念が、異なるIL-B60蛋白、特に種々の温血動物、例えば哺乳動物および鳥類に見出されるIL-B60蛋白にあてはまる。一般的には、これらの説明はすべてのIL-B60蛋白についてのものであるが、詳述した特定の霊長類の具体例に限定するものではない。

#### 【0076】

アミノ酸挿入または欠失を行うことによりIL-B60の突然変異を行うことが可能である。置換、欠失、挿入、またはいずれかの組み合わせを行って最終構築物に到達することができる。挿入はアミノ-またはカルボキシ-末端融合を包含する。ランダムな突然変異を標的コドンにおいて行うことができ、次いで、発現された変異体を所望活性に関してスクリーニングすることができる。既知配列を有するDNA中のあらかじめ決められた部位に置換変異を作成する方法は当該分野においてよく知られており、例えば、M13プライマー突然変異またはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法によるものがある。例えば、Sambrook, et al. (1989); Ausubel, et al. (1987 および Supplements); および Kunkel, et al. (1987) *Methods in Enzymol.* 154:367-382参照。好ましい具体例は、例えば、1回、2回、3回、5回置換等であり、好ましくは、ヌクレオチドまたはアミノ酸レベルの保存的置換である。好ましくは、置換は保存的システインから離れたものであり、しばしばヘリックス構造ドメインから離れた領域で行われる。かかる

変種は特異的抗体の製造に有用であり、しばしば、多くのあるいはすべての生物学的特性を共有している。表2参照。サイトカイン構造の認識は、受容体相互作用の所望の変化を起こさせるために修飾されうる残基の構造および位置に関する重要な洞察を与える。さらに、IL-6とIL-6R $\alpha$ 蛋白との相互作用には相互作用表面における相補的構造特徴が必要にある。

#### 【0077】

また本発明は、組み換え蛋白、例えば、これらの蛋白のセグメントを用いた異種融合蛋白を提供する。異種融合蛋白は、天然において通常には同じ様式で融合していない蛋白またはセグメントの融合物である。類似の概念が異種核酸配列にあてはまる。

#### 【0078】

さらに、他の蛋白由来の類似の機能ドメインを結合することにより新たな構築物を作成してもよい。例えば、異なる新たな融合ポリペプチドまたはフラグメント間で標的結合または他のセグメントを「入れ換え」てもよい。例えば、Cunningham, et al. (1989) *Science* 243:1330-1336; および O'Dowd, et al. (1988) *J. Biol. Chem.* 263:15985-15992参照。

#### 【0079】

Beaucage and Carruthers (1981) *Tetra. Letts.* 22:1859-1862により記載されたホスホラミダイト (phosphoramidite) 法は適当な合成DNAフラグメントを生じるであろう。相補的な鎖を合成し、適当な条件下において鎖をアニールすることにより、あるいは適当なプライマー配列とともにDNAポリメラーゼを用いて、例えば、PCR法にて、相補的な鎖を付加することにより、2本鎖フラグメントがしばしば得られる。

#### 【0080】

IL-6ファミリーのサイトカインとの比較において、構造の分析をこの遺伝子に適用することができる。ファミリーは、例えばIL-6、IL-12、G-CSF、LIF、OSM、CNTFおよびObを含む。ヒトおよびマウスのIL-6配列とIL-6ファミリーの他のメンバーとの並置比較は構造的特徴の定義付けを可能にするはずである。詳細には、例えば、RASMOLプロゲ

ラムを用いて  $\beta$ -シートおよび  $\alpha$ -ヘリックス残基を決定することができる。Bazan, et al. (1996) Nature 379:591; Lodi, et al. (1994) Science 263:1762-1766; Sayle and Milner-White (1995) TIBS 20:374-376; および Gronenberg, et al. (1991) Protein Engineering 4:263-269参照。さらに Wilkins, et al. (eds. 1997) Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics Springer-Verlag, NYも参照。置換に好ましい残基としては、受容体との相互作用が予想される表面露出残基等が挙げられる。機能を保存している他の残基は、特に表面露出残基から離れた位置で保存的置換されるであろう。

#### 【0081】

##### IV. 機能変種

IL - B 6 0 に対する生理学的応答のブロックは受容体に対するリガンドの結合の競争的阻害により生じ得る。

本発明のインビトロアッセイは、しばしば、単離蛋白、これらの蛋白の受容体結合セグメントを含む可溶性フラグメント、または固相基材に結合したフラグメントを使用する。これらのアッセイは、結合セグメントの変異体および修飾体あるいはサイトカインの変異体および修飾体、例えば、IL - B 6 0 アナログの効果の診断的決定も可能にする。

#### 【0082】

また本発明は、競争的薬剤スクリーニングアッセイ、例えば、サイトカインに対する中和抗体、または受容体結合フラグメントが試験化合物と競争するアッセイの使用を企図する。

#### 【0083】

IL - B 6 0 抗原の「誘導体」は、天然に存在する形態からのアミノ酸配列変異体、糖鎖付加変種、および他の化学的部分との共有結合または凝集抱合体を包含する。例えば、標準的方法により、IL - B 6 0 アミノ酸側鎖またはN - またはC - 末端に見出される基に官能基を結合させることにより共有結合誘導体を調製することができる。例えば、Lundblad and Noyes (1988) Chemical Reagents for Protein Modification, vols. 1-2, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL; Hugli (ed. 1989) Techniques in Protein Chemistry, Academic Press, San Die

go, CA; および Wong (1991) Chemistry of Protein Conjugation and Cross Linking, CRC Press, Boca Raton, FL参照。

#### 【0084】

詳細には、例えば、ポリペプチド合成中のポリペプチドの糖鎖付加パターンを修飾することによる、あるいはさらなるプロセッシング工程における糖鎖付加による変化も含まれる。例えば、Elbein (1987) Ann. Rev. Biochem. 56:497-534参照。また、リン酸化アミノ酸残基、例えば、ホスホチロシン、ホスホセリン、またはホスホスレオニンを含む、他の小さな修飾を有する同一の一次アミノ酸配列を有するペプチドのバージョンも含まれる。

#### 【0085】

I L - B 6 0 と他の同種または異種蛋白との間の融合ポリペプチドも提供される。多くのサイトカイン受容体または他の表面蛋白は多量体、例えば、ホモダイマーであり、繰り返し構造は、蛋白開裂に対する感受性低下等の種々の利点を有する可能性がある。典型例はレポーターポリペプチド、例えば、ルシフェラーゼと蛋白のセグメントまたはドメイン、例えば、受容体結合セグメントとの融合物であり、その結果、融合リガンドの存在または配置が容易に決定される。例えば、Dullらの米国特許第4,859,609号参照。他の遺伝子融合パートナーは、細菌 - ガラクトシダーゼ、t r p E、プロテインA、 - ラクタマーゼ、アルファアミラーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、酵母 接合因子、ならびにH i s 6配列のF L A G配列のごとき検出または精製用タグを含む。例えば、Godowski, et al. (1988) Science 241:812-816参照。

#### 【0086】

典型的には、融合ペプチドは組み換え核酸法または合成ポリペプチド法により作成される。核酸処理および発現のための方法は一般的に記載されており、例えば、Sambrook, et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed.), vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory; および Ausubel, et al. (eds. 1993) Current Protocols in Molecular Biology, Greene and Wiley, NYに記載されている。ポリペプチドの合成方法は、例えば、Merrifield (1963) J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-2156; Merrifield (1986) Science 232: 341-347; At

herton, et al. (1989) Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford; および Grant (1992) Synthetic Peptides: A User's Guide, W.H. Freeman, NYに記載されている。再生方法を合成蛋白に適用してもよい。

#### 【0087】

また本発明は、アミノ酸配列または糖鎖付加における変種とは別のIL - B60蛋白の誘導体の使用を企図する。かかる誘導体は、化学的部分または蛋白担体との共有結合または凝集会合物を包含する。共有結合または凝集誘導体は免疫原として、イムノアッセイの試薬として、または結合パートナー、例えば他の抗原のアフィニティー精製のごとき精製方法において有用であろう。当該分野においてよく知られている方法による、臭化シアン活性化SEPHAROSEのごとき固体支持体への共有結合によりIL - B60を固定化し、あるいはグルタルアルデヒド架橋ありまたはなしでポリオレフィン表面上に吸着させて、抗 - IL - B60抗体または別の結合成分のアッセイまたは精製に使用することができる。IL - B60蛋白を検出可能基で標識して、例えば、診断アッセイに使用することができる。固定化された抗体または相補的結合パートナー、例えば、受容体の結合部分によりIL - B60の精製を行ってもよい。

#### 【0088】

本発明の可溶化されたIL - B60またはフラグメントを免疫原として使用して、結合特異性のある抗血清または抗体を製造することができる。精製抗原を用いて、モノクローナル抗体または天然抗体の抗原結合フラグメント、例えばFab, Fab', F(ab)<sub>2</sub>等を包含する抗原結合フラグメントをスクリーニングすることができる。精製IL - B60抗原を試薬として用いて、サイトカインの上昇したレベルの存在に应答して産生された抗体を検出することもでき、それは異常または特定の生理学的もしくは疾病状態の診断であってもよい。本発明は、配列番号：1に示すヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列またはそれを含む蛋白のフラグメントに対して生起した抗体を企図する。詳細には、本発明は、特定ドメイン、例えばIL - B60のヘリックスA、B、CまたはD、あるいはCLF - 1のIgドメインに対して親和性を有するあるいはそれらに対して生起した抗

体を企図する。

【0089】

本発明は、さらなる密接に関連した種の変種の単離を企図する。サザンおよびノーザンブロット分析は、類似の遺伝学的部分が他の哺乳動物に存在することを確認するであろう。IL - B60は種が異なっても、例えば、げっ歯類、ウサギ類、食肉類、偶蹄類、奇蹄類、および霊長類においても広く存在する可能性がある。

【0090】

また本発明は、構造、発現、および機能における相違および類似性の両方を示す関連抗原の群を単離するための手段を提供する。分子の多くの生理学的効果の解明は、さらなる異なった種またはそれらの多型性変種の単離および特徴づけにより大いに促進されるであろう。詳細には、本発明は、異なる種におけるさらなる相同的な遺伝学的部分を同定するための有用なプローブを提供する。

【0091】

単離された遺伝子は、IL - B60の発現を欠く細胞、例えば、対応蛋白を欠き、負のバックグラウンド活性を示す種タイプまたは細胞の形質転換を可能にするであろう。このことは、未形質転換対照細胞との比較において、IL - B60の機能の分析を可能にするであろう。

【0092】

これらの抗原により媒介される種々の生理学的機能に影響する重要な構造エレメントの吟味は、関連クラスのメンバーと比較することにおいて、現代的な分子生物学の標準的方法を用いて可能である。例えば、Cunningham, et al. (1989) *Science* 243:1339-1336に記載されたホモログ - スキャンニング突然変異法; および O'Dowd, et al. (1988) *J. Biol. Chem.* 263:15985-15992; および Lechleiter, et al. (1990) *EMBO J.* 9:4381-4390において用いられた方法参照。

【0093】

細胞内機能はおそらく受容体シグナリングに関連するものである。しかしながら、蛋白のインターナリゼーションは特定の環境において起こる可能性があり、細胞内成分とサイトカインとの間の相互作用が起こりうる。IL - B60と相

相互作用成分との相互作用についての特異的セグメントを、突然変異法または直接的な生化学的手段、例えば、架橋またはアフィニティー法により同定してもよい。結晶回折像または他の物理的方法による構造の分析も適当可能である。シグナル伝達機構に関するさらなる調査は、アフィニティー法または遺伝学的手段、例えば、変異体の相補性分析により単離可能な会合成分の研究を包含する。

【0094】

IL - B60の発現および制御に関するさらなる研究が遂行される。抗原に結合した制御エレメントは生理学上の、発達上の、組織特異的な相違、あるいは他の発現パターンを示すはずである。上流または下流の遺伝学的領域、例えば、調節エレメントは興味深いものである。

【0095】

IL - B60抗原の構造の研究により、新たな抗原、特に当該分子に対するアゴニストまたはアンタゴニスト特性を示すアナログの設計に至るであろう。これを、すでに説明したスクリーニング法と組み合わせて、所望活性スペクトルを示す抗原を単離することができる。

【0096】

V. 抗体

天然に存在する形態および組み換え形態の両方の、種、多型、または対立遺伝子変種を包含するIL - B60蛋白ならびにそれらのフラグメントの種々のエピトープに対して抗体を生成させることができる。さらに、ネイティブ(native)または変性バージョンを包含する活性形態または不活性形態の、IL - B60に対して抗体を生成させることもできる。抗 - イディオタイプ抗体も企図される。

【0097】

あらかじめ決定された抗原のフラグメントに対する結合フラグメントおよび1本鎖バージョンを包含する抗体を、該フラグメントと免疫原蛋白との抱合体で動物を免疫することにより得ることができる。所望抗体を分泌する細胞からモノクローナル抗体を調製する。これらの抗体を正常または欠損IL - B60への結合についてスクリーニングすることができ、あるいは例えば、受容体を介して媒介されるアゴニストまたはアンタゴニスト活性についてスクリーニングすることが

できる。抗体は、アゴニスト的であってもよく、あるいは例えば、受容体への結合を立体的にブロックすることによりアンタゴニスト的であってもよい。通常には、これらのモノクローナル抗体は少なくとも約1 mM、より通常には少なくとも約300  $\mu$ M、典型的には少なくとも約100  $\mu$ M、より典型的には少なくとも約30  $\mu$ M、好ましくは少なくとも約10  $\mu$ M、より好ましくは少なくとも約3  $\mu$ Mまたはそれよりも良好な $K_D$ 値で結合する。

#### 【0098】

本発明の抗体は診断用途にも有用である。捕獲または非中和抗体として、受容体への結合を阻害することなく抗原に結合する能力に関してそれらをスクリーニングすることができる。中和抗体として、それらは競争結合アッセイにおいて有用でありうる。それらはIL - B60蛋白またはその受容体の検出または定量においも有用でありうる。例えば、Chan (ed. 1987) *Immunology: A Practical Guide*, Academic Press, Orlando, FL; Price and Newman (eds. 1991) *Principles and Practice of Immunoassay*, Stockton Press, N.Y.; および Ngo (ed. 1988) *Nonisotopic Immunoassay*, Plenum Press, N.Y.参照。交差吸収 (cross absorption) または他の試験は、種々の特異性スペクトル、例えば、ユニークまたは共通した種特異性を示す抗体を同定するであろう。

#### 【0099】

さらに、本発明の抗原結合フラグメントを包含する抗体は、抗原に結合し、例えば生物学的応答を誘発しうる受容体への機能的結合を阻害する強力なアンタゴニストである可能性がある。それらは非中和抗体として有用である可能性があり、トキシンまたは放射性核種に結合することができ、抗体が抗原に結合する場合には、それを例えばその表面に発現する細胞を死滅させる。さらに、リンカーを用いることによりこれらの抗体を薬剤または他の治療薬に抱合させることができ、薬剤の標的化を有効ならしめてもよい。

#### 【0100】

抗原フラグメントを他の材料、特にポリペプチドに結合させて、免疫原として使用される融合または共有結合ポリペプチドとしてもよい。キーホールリムペットヘモシアニン、ウシ血清アルブミン、破傷風トキソイド等のごとき種々の免疫

原に抗原およびそのフラグメントを融合または共有結合させてもよい。ポリクローナル抗血清の調製方法の説明に関しては Microbiology, Hoeber Medical Division, Harper and Row, 1969; Landsteiner (1962) Specificity of Serological Reactions, Dover Publications, New York; Williams, et al. (1967) Methods in Immunology and Immunochemistry, vol. 1, Academic Press, New York; および Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press, NY 参照。

#### 【0101】

いくつかの例において、マウス、げっ歯類、霊長類、ヒト等のごとき種々の哺乳動物宿主からモノクローナル抗体を調製することが望ましい。かかるモノクローナル抗体の調製方法に関する記載は、例えば、Stites, et al. (eds.) Basic and Clinical Immunology (4th ed.), Lange Medical Publications, Los Altos, CA, and references cited therein; Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press; Goding (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2d ed.), Academic Press, New York において見出され、特に、Kohler and Milstein (1975) in Nature 256:495-497 において見出される記載はモノクローナル抗体を得るための1の方法について論じている。

#### 【0102】

他の適当な方法は、抗原性ポリペプチドへのリンパ球のインビトロでの曝露、あるいはファージまたは同様のベクター中の抗体のライブラリーの選択を包含する。Huse, et al. (1989) "Generation of a Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda," Science 246:1275-1281; および Ward, et al. (1989) Nature 341:544-546 参照。キメラまたはヒト化抗体を包含する、修飾を有するまたは有しない本発明のポリペプチドおよび抗体を用いることができる。検出可能なシグナルを提供する物質を共有結合または非共有結合することによりポリペプチドおよび抗体がしばしば標識される。広範な標識および結合方法が知られており、科学文献および特許文献に両方に広く報告されている。適当な標識は放射性核種、酵素、基質、コファクター、阻害剤、蛍光体、化学発光体、磁気粒子等を包含する。かかる標識の使用を教示する特許は米

国特許第 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149; および 4,366,241 号を包含する。また組み換え免疫グロブリンを得てもよく、Cabillyの米国特許第 4,816,567 号; Mooreらの米国特許第 4,642,334 号; および Queen, et al. (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033参照。

#### 【0103】

蛋白単離におけるアフィニティークロマトグラフィーに本発明の抗体を使用することもできる。抗体を固体支持体に結合させたカラムを調製することができる。例えば、Wilchek et al. (1984) Meth. Enzymol. 104:3-55参照。逆に、蛋白を枯湯 (depletion) または交差吸収 (cross absorption) に使用して選択的特定の結合組成物を調製することもできる。

#### 【0104】

各 I L - B 6 0 に対して生起した抗体は抗 - イディオタイプ抗体の生成にも有用である。これらは各抗原の発現に関連した種々の免疫学的症状の検出または診断において有用であろう。

#### 【0105】

#### V I . 核酸

説明したペプチド配列および関連試薬は、例えば天然源由来の I L - B 6 0 をコードする DNA クローンの検出、単離または同定において有用である。典型的には、それは哺乳動物からの遺伝子の単離において有用であり、類似の方法が他の種、例えば、鳥類および哺乳動物のごとき温血動物からの遺伝子の単離に適用されるであろう。交差ハイブリダイゼーションは上記種または他の種からの、例えばポリマー変種のような I L - B 6 0 の単離を可能にするであろう。適当な核酸クローンをうまく単離するために多くの異なるアプローチが利用可能であろう。

#### 【0106】

精製蛋白またはポリペプチドは、上記のごとき標準的方法による抗体の生成に有用である。合成ペプチドまたは精製蛋白を免疫系に提示して、モノクローナルまたはポリクローナル抗体を得ることができる。例えば、Coligan (1991) Current Protocols in Immunology Wiley/Greene; および Harlow and Lane (1989) A

ntibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press参照。

【0107】

例えば、IL - B60を発現する細胞系から作成された発現ライブラリーのスクリーニングに特異的結合組成物を使用することができる。種々の染色または免疫蛍光法により細胞内発現のスクリーニングを行うことができる。結合組成物を用いて、表面融合蛋白を発現する細胞をアフィニティー精製または分別することができる。

【0108】

ペプチドセグメントを用いて、ライブラリーをスクリーニングするための適当なオリゴヌクレオチドを予想することもできる。遺伝学的コードを用いて、スクリーニング用プローブとして有用な適当なオリゴヌクレオチドを選択することもできる。例えば、配列番号：1参照。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法との組み合わせにおいて、合成オリゴヌクレオチドはライブラリーからの正しいクローンの選択において有用であろう。相補的配列はプローブ、プライマー、またはアンチセンス鎖として使用されるであろう。種々のフラグメントは特に有用であるはずであり、例えば、アンカードベクターまたはポリ - A相補的PCR法または他のペプチドの相補的DNAと組み合わせられよう。

【0109】

本発明は、生物学的に活性のある対応IL - B60ポリペプチドをコードする単離DNAまたはフラグメント、特に、説明した配列の非翻訳部分をコードする部分を欠くものの使用を企図する。さらに、本発明は、生物学的に活性のある蛋白またはポリペプチドをコードしており、適当な条件下で本明細書記載のDNA配列にハイブリダイゼーションできる単離または組み換えDNAを包含する。該生物学的に活性のある蛋白またはポリペプチドはインタクト（intact）な抗原またはフラグメントであってよく、例えば配列番号：2に開示したアミノ酸配列を有し、特に、成熟分泌ポリペプチドである。さらに、本発明は、分泌IL - B60に対して高い同一性を示す蛋白をコードする単離または組み換えDNA、またはそのフラグメントの使用を包含する。単離DNAはそれぞれの調節配列を5'および3'隣接部位に有していてもよく、それらは例えば、プロモーター、エン

ハンサー、ポリ-A付加シグナル等である。あるいはまた、例えば内在性遺伝子の上流にプロモーターを挿入することにより、コーディングセグメントを異種プロモーターに作動可能に連結することによって発現を行わせてもよい。

#### 【0110】

「単離」核酸は、例えばRNA、DNA、または混合ポリマーであり、本来的にはネイティブな配列に随伴している他の成分、例えば、元の種のリボソーム、ポリメラーゼ、および/または隣接ゲノム配列から実質的に分離されているものである。該用語は、その天然に存在する環境から除去されており、組み換えまたはクローン化DNA単離体および化学合成アナログまたは異種の系にて生物学的に合成されたアナログを包含する核酸配列も含む。実質的に純粋な分子は、当該分子の単離形態を包含する。一般的には、核酸はベクター中にあるか、あるいは約50kb未満、通常には約30kb未満、典型的には約10kb未満、好ましくは約6kb未満のフラグメント中にある。

#### 【0111】

一般的には、単離核酸は分子の均質な組成物であるが、いくつかの具体例においては少量の異種物質を含む。典型的には、この異種物質はポリマー末端または所望生物学的機能または活性にとり重要でない部分において見出される。

#### 【0112】

「組み換え」核酸は、その製造方法またはその構造により定義される。その製造方法についていえば、一定のプロセスにより作成された生成物であり、例えば、組み換え核酸法により、例えば、ヌクレオチド配列を人為的に操作することにより、典型的には選択または製造を行うことにより得られたものである。あるいはまた、その用語は、天然においては互いに隣接していない2個のフラグメントの融合物を含む配列を得ることにより作成された核酸であってもよいが、天然の生成物、例えば、天然に存在する変異体を排除することを意味する。よって、例えば、天然に存在しないベクターで細胞を形質転換することにより得られる生成物が包含され、合成オリゴヌクレオチド法を用いて得られた配列を含む核酸も同様に包含される。そのようなことは、コドンと同じまたは保存的アミノ酸をコードする余分なコドンに置きかえるためにしばしば行われるが、典型的には配列認

識部位を導入または除去するために行われる。

【0113】

あるいはまた、所望機能の核酸セグメントを結合して、通常に利用できる天然形態においては見出されない所望の機能の組み合わせを含む単一の遺伝学的物質を得るために、そのようなことが行われる。制限酵素認識部位はしばしばかかる人為的操作の標的であるが、他の部位特異的標的、例えば、プロモーター、DNA複製部位、調節配列、制御配列、または他の有用な特徴部位を設計により含ませてもよい。類似の概念が組み換え、例えば融合ポリペプチドに適用される。特に、遺伝学的コーの縮重によりこれらの抗原のフラグメントに類似しているポリペプチドをコードする合成核酸、種々の異なる種に由来する配列の融合物または多型変種をコードする合成核酸が包含される。

【0114】

核酸中の重要な「フラグメント」は、少なくとも約17ヌクレオチド、一般的には少なくとも約22ヌクレオチド、通常には少なくとも約29ヌクレオチド、より頻繁には少なくとも約35ヌクレオチド、典型的には少なくとも約41ヌクレオチド、普通には少なくとも約47ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約55ヌクレオチドが連続したセグメントであり、特に好ましい具体例においては少なくとも約60またはそれ以上のヌクレオチド、例えば、67、73、81、89、95個等のヌクレオチドが連続したセグメントである。

【0115】

IL-B60蛋白をコードするDNAは、関連または類似蛋白をコードする遺伝子、mRNA、およびcDNA種、ならびに異なる種由来の相同的蛋白をコードするDNAを同定するのに特に有用である。霊長類、げっ歯類、イヌ、ネコ、および鳥類を包含する他の種においてホモログが存在するであろう。種々のIL-B60蛋白はホモログであるはずであり、本発明に包含される。しかしながら、抗原に対してより離れた進化的関連性を有する蛋白でさえ、それらが十分に相同的である場合には、適当な条件下においてこれらの配列を用いて容易に単離することができる。霊長類IL-B60蛋白は特に興味深いものである。

【0116】

ゲノム配列の組み換えクローン、例えば、イントロンを含むクローンは、トランスジェニック細胞および生物を包含する遺伝子導入の研究ならびに遺伝子治療に有用であろう。例えば、Goodnow (1992) "Transgenic Animals" in Roitt (ed .) Encyclopedia of Immunology, Academic Press, San Diego, pp. 1502-1504; Travis (1992) Science 256:1392-1394; Kuhn, et al. (1991) Science 254:707-710; Capecchi (1989) Science 244:1288; Robertson (ed. 1987) Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, IRL Press, Oxford ; および Rosenberg (1992) J. Clinical Oncology 10:180-199参照。

【0117】

核酸配列の比較における実質的相同性、例えば、同一性は、セグメントまたはそれらの相補的な鎖を比較した場合において、それらが適当なヌクレオチド挿入または欠失を伴って最適に並置された際に、少なくとも約50%のヌクレオチドにおいて、一般的には少なくとも約58%のヌクレオチドにおいて、通常には少なくとも約65%のヌクレオチドにおいて、しばしば少なくとも約71%のヌクレオチドにおいて、典型的には少なくとも約77%のヌクレオチドにおいて、通常には少なくとも約85%のヌクレオチドにおいて、好ましくは少なくとも約95%ないし98%またはそれ以上のヌクレオチドにおいて、特に好ましい具体例においては約99%またはそれ以上のヌクレオチドにおいて同一であることを意味する。あるいはまた、典型的には、例えば配列番号：1のIL-B60配列を用いた場合に、選択されたハイブリダイゼーション条件下でセグメントがその鎖またはその相補鎖にハイブリダイゼーションする場合には、実質的な相同性が存在する。典型的には、少なくとも約30個のヌクレオチドの鎖について少なくとも約55%の同一性がある場合に、好ましくは約25個のヌクレオチドの鎖について少なくとも約75%の同一性がある場合に、最も好ましくは約20個のヌクレオチドの鎖について少なくとも約90%の同一性がある場合に、選択的ハイブリダイゼーションが起こるのである。Kanehisa (1984) Nuc. Acids Res. 12:203-213参照。説明した同一性比較の鎖長さはより長いものであってもよく、特定の具体例においては少なくとも約17ヌクレオチドの鎖、通常には少なくとも約28ヌクレオチドの鎖、典型的には少なくとも約40ヌクレオチドの鎖、好ましく

は少なくとも約75ないし100ヌクレオチドまたはそれ以上の鎖に関するものである。

#### 【0118】

ハイブリダイゼーションにおける相同性に関して、ストリンジェントな条件は、塩、温度、有機溶媒、および他のパラメーター、典型的にはハイブリダイゼーション反応を制御するパラメーターを組み合わせたストリンジェントな条件である。ストリンジェントな温度条件は、通常には、約30 を超える温度、普通には約37 を超える温度、典型的には約55 を超える温度、好ましくは約70 を超える温度である。ストリンジェントな塩条件は、通常には約1000 mM未満、通常には約400 mM未満、典型的には約250 mM未満、好ましくは約150 mM未満であり、約100 mM、50 mM、または20 mMさえも包含する。しかしながら、パラメーターの組み合わせは単一パラメーターの基準よりも重要である。例えば、Wetmur and Davidson (1968) *J. Mol. Biol.* 31:349-370 参照。ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーションはバックグラウンドの少なくとも2倍以上、好ましくは少なくとも3 - 5倍またはそれ以上のバックグラウンドを与えるはずである。

#### 【0119】

配列比較のためには、典型的には1の配列が対照配列として役立ち、それに対して試験配列が比較される。配列比較アルゴリズムを用いる場合、試験配列および対照配列がコンピューターにインプットされ、必要な場合には後続座標が選定され、配列アルゴリズムプログラムのパラメーターが選定される。次いで、配列比較アルゴリズムが、選定されたプログラムのパラメーターに基づいて対照配列に対する試験配列の配列同一性パーセントを計算する。

#### 【0120】

例えば、Smith and Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482の局所的相同性アルゴリズムにより、Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443の相同性並置アルゴリズムにより、Pearson and Lipman (1988) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 85:2444の類似性検索方法により、これらのアルゴリズムのコンピューター実行 (the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Gro

up, 575 Science Dr., Madison, WI 中の GAP, BESTFIT, FASTA, および TFASTA ) により、あるいは視覚による検査 ( 一般的には Ausubel らの上記文献参照 ) により、比較のための配列の最適な並置を行うことができる。

#### 【 0 1 2 1 】

通常のアлゴリズムの一例は P I L E U P である。P I L E U P は発展的な対合方式の並置比較を用いて一群の関連配列から複数の配列並置比較を創生して、関連性および配列同一性パーセントを示すものである。それは並置比較を行うために使用されるクラスター化関連性を示す樹形図またはデンドログラムもプロットする。P I L E U P は Feng and Doolittle (1987) J. Mol. Evol. 35:351-360 の発展的並置比較法を単純化したものを使用する。使用される方法は Higgins and Sharp (1989) CABIOS 5:151-153 により記載された方法と類似のものである。該プログラムは 3 0 0 個までの配列を並置比較でき、各配列の最大長は 5 0 0 0 ヌクレオチドまたはアミノ酸である。複数の並置比較手順により、2つの最も類似した配列の対合式並置比較が開始され、2つの並置比較された配列のクラスターが得られる。次いで、このクラスターが、次に最も関連のある配列または並置配列のクラスターに対して並置比較される。2つの個々の配列を対合式に並置比較したものを単純に引き伸ばしたものによって配列のクラスターが並置比較される。一連の発展的な対合式並置比較によって最終並置比較が行われる。配列比較領域に関して特定の配列ならびにそれらのアミノ酸またはヌクレオチド座標を選定することによって、そしてプログラムのパラメーターを選定することによって、プログラムが実行される。例えば、以下のパラメーターを用いて対照配列を他の試験配列と比較して、配列同一性関連性パーセントが決定される：デフォルトギャップウェイト ( 3 . 0 0 )、デフォルトギャップレングスウェイト ( 0 . 1 0 )、およびウェイトドエンドギャップ。

#### 【 0 1 2 2 】

配列同一性パーセントおよび配列類似性パーセントの決定に適したアルゴリズムのもう1つの例は B L A S T アルゴリズムであり、それは Altschul, et al. ( 1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 に記載されている。B L A S T 分析を実行するためのソフトウェアは the National Center for Biotechnology Information

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)から公に利用可能である。このアルゴリズムは、問題となる配列中の長さ $W$ のショートワード (short word) を同定することにより高スコアの配列ペア (HSP) を最初に同定することを含み、ショートワードはデータベース配列中の同じ長さのワードと並置比較された場合にある程度の正の値のスレッシュホールドスコア $T$ にマッチするかあるいはこれを満足するものである。 $T$ は隣接ワードスコアスレッシュホールドといわれる (Altschulらの上記文献)。これらの初期隣接ワードヒットは、それらを含むより長いHSPを見つけるための検索を開始するための種として作用する。次いで、積算並置比較スコアが増加するかぎりワードヒットを各配列の両方向に伸長させる。以下の場合に各方向におけるワードヒットの伸長は停止させられる：積算並置比較スコアがその最大達成値よりも $X$ だけ低下した場合；1またはそれ以上の負のスコアの残基の並びの蓄積によって積算スコアがゼロまたはそれ未満になった場合；あるいはいずれかの配列の末端に達した場合。BLASTアルゴリズムのパラメーター $W$ 、 $T$ 、および $X$ は並置比較の感度および速度を決定する。BLASTプログラムはデフォルトとしてワード長 ( $W$ ) 11、BLOSUM62スコアリングマトリックス (Henikoff and Henikoff (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:10915参照) アラインメント ( $B$ ) 50、期待値 ( $E$ ) 10、 $M = 5$ 、 $N = 4$ 、ならびに両鎖の比較を使用する。

#### 【0123】

配列同一性パーセントの計算のほかに、BLASTアルゴリズムは2つの配列間の類似性の統計学的分析も行う (例えば、Karlin and Altschul (1993) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90:5873-5787参照)。BLASTアルゴリズムにより提供される類似性の1の測定値は最小全可能性 ( $P(N)$ ) であり、それは2つのヌクレオチドまたアミノ酸配列間の合致が偶然に起こる確率を指示するものである。例えば、試験核酸と対照核酸との比較における最小全可能性が約0.1未満、より好ましくは約0.01未満、最も好ましくは約0.001未満である場合に、核酸は対照配列と類似であるとみなされる。

#### 【0124】

2つのポリペプチドの核酸配列が実質的に同一であるというさらなる指示は、

後で説明するように、第1の核酸によりコードされるポリペプチドが第2の核酸によりコードされるポリペプチドと免疫学的に交差反応性を有するということがある。よって、典型的には、例えば、2つのペプチドが保存的置換によってのみ異なる場合には、1のポリペプチドはもう1つのポリペプチドと実質的に同一である。2つの核酸配列が実質的に同一であるというもう1つの指示は、後で説明するように、ストリンジェントな条件下で2つの分子が互いにハイブリダイゼーションするというものである。

#### 【0125】

密接に関連した種の交差 - 種ハイブリダイゼーションにより、他の哺乳動物種由来のIL - B60をクローン化し、単離することができる。関連性の小さい種間においては相同性が比較的低いかもしれず、よって、比較的密接に関連した種のハイブリダイゼーションが推奨される。別法として、比較的低い種特異性を示す抗体調合物の調製は発現クローニングアプローチにおいて有用であるかもしれない。

#### 【0126】

VII. IL - B60または複合体の製造；模倣体

IL - B60またはそのフラグメントをコードするDNAを、化学合成、cDNAライブラリーのスクリーニング、または種々の細胞系または組織試料から調製されたゲノムライブラリーのスクリーニングにより得ることができる。例えば、Okayama and Berg (1982) Mol. Cell. Biol. 2:161-170; Gubler and Hoffman (1983) Gene 25:263-269; および Glover (ed. 1984) DNA Cloning: A Practical Approach, IRL Press, Oxford参照。あるいはまた、本発明において提供される配列は有用なPCRプライマーを提供し、あるいは天然に存在する具体例を包含するIL - B60をコードする適当な遺伝子の合成調合または他の調合を可能にする。

#### 【0127】

種々の宿主細胞においてこのDNAを発現させて、完全長IL - B60またはフラグメントを合成することができ、次いで、例えば、それらを用いて、結合の研究用、修飾分子の構築および発現用、ならびに構造/機能の研究用にポリクロ

ーナルまたはモノクローナル抗体を得ることができる。

【0128】

本発明に使用するベクターはプラスミド、ウイルス、バクテリオファージ、組み込み可能DNAフラグメント、ならびにDNAフラグメントの宿主ゲノム中への組み込みを可能にする他の担体を包含する。例えば、Pouwels, et al. (1985 and Supplements) Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y.; および Rodriguez, et al. (eds. 1988) Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworth, Boston, MA参照。

【0129】

本発明の目的のために、DNA配列が互いに機能的に関連している場合にはDNA配列を作動可能に連結する。例えば、プレ配列または分泌リーダーがプレ蛋白として発現されるか、あるいはポリペプチドを細胞膜に指向することまたはポリペプチドの分泌に関与している場合には、プレ配列または分泌リーダーに関するDNAをポリペプチドDNAに作動可能に連結する。プロモーターがポリペプチドの転写を制御する場合には、プロモーターをコーディング配列に作動可能に連結する。翻訳を可能にするためにリボソーム結合部位を置く場合には、リボソーム結合部位をコーディング配列に作動可能に連結する。通常には、作動可能に連結は、連続して読み枠内にて連結されることを意味するが、リプレッサー遺伝子のごときある種の遺伝学的エレメントは連続的に連結されないが、オペレーター配列に結合されて発現を制御する。例えば、Rodriguez, et al., Chapter 10, pp. 205-236; Balbas and Bolivar (1990) Methods in Enzymology 185:14-37; および Ausubel, et al. (1993) Current Protocols in Molecular Biology, Greene and Wiley, NY参照。

【0130】

適当な発現ベクターの典型例はpCDNA1; pCD (Okayama, et al. (1985) Mol. Cell Biol. 5:1136-1142参照); pMC1neo Poly-A (Thomas, et al. (1987) Cell 51:503-512参照); および pAC 373 または pAC 610 のときバキュロウイルスベクター (例えば、Miller (1988) Ann. Rev. Microbiol. 42:177-199参照) を包含する。

## 【0131】

特異的または一定の糖鎖付加パターンを提供する系においてIL-B60ポリペプチドを発現させることがしばしば好ましい。例えば、Luckow and Summers (1988) Bio/Technology 6:47-55; および Kaufman (1990) Meth. Enzymol. 185:487-511参照。

## 【0132】

IL-B60、またはそのフラグメントを、ホスファチジルイノシトール(P I)により細胞膜に結合するように処理してもよいが、ホスファチジルイノシトール開裂酵素、例えば、ホスファチジルイノシトールホスホリパーゼ-Cでの処理により膜から除去されうるものである。これにより生物学的に活性な形態の抗原が遊離され、蛋白化学の標準的方法による精製が可能になる。例えば、Low (1989) Biochim. Biophys. Acta 988:427-454; Tse, et al. (1985) Science 230:1003-1008; および Brunner, et al. (1991) J. Cell Biol. 114:1275-1283参照

。

## 【0133】

IL-B60を特徴づけたならば、ペプチド合成のための慣用的方法によりそのフラグメントもしくは誘導体を調製することができる。これらの方法はStewart and Young (1984) Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, IL; Bodanszky and Bodanszky (1984) The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, New York; Bodanszky (1984) The Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, New York; および Villafranca (ed. 1991) Techniques in Protein Chemistry II, Academic Press, San Diego, Caに記載されたような方法を包含する。

## 【0134】

## VII. 使用

本発明は、本明細書の他の個所にて説明するような、あるいは診断用キットについて後で説明するように、IL-B60により媒介される症状の診断用途が見出される試薬を提供する。遺伝子は、げっ歯類とヒトとを識別するような法科学 (forensic sciences) において有用であり、あるいは発現または修飾パターン

を示す異なった細胞を識別するためのマーカーとして有用である。提供される組成物は、例えば、インビトロアッセイ、科学的研究、および核酸、ポリペプチドまたは抗体の合成または製造のための有用な試薬である。

#### 【0135】

また本発明は、重大な商業的および/または治療的ポテンシャルを有する試薬を提供する。IL - B60 (天然に存在するもの、あるいは組み換えのもの)、そのフラグメント、およびそれに対する抗体、ならびにIL - B60に対する結合アフィニティーを有するものとして同定される化合物は、分子生物学、免疫学、または生理学の教授法のための試薬として有用なはずである。例えば、蛋白、抗体の製造または使用、クローニング方法、組織学等において実際的な研究室で使用される、該試薬を含む適当なキットを製造してもよい。

#### 【0136】

該試薬は、炎症性の症状を包含する異常な生理学または発達に関連した症状の治療においても有用であろう。それらは、特定の治療戦略の成功と相関関係があるかもしれない相互作用成分の存在または不存在に関するインビトロでの試験において有用でありうる。詳細には、本発明において提供される組成物を用いる治療のための適当な方法により、種々の生理学、例えば、造血細胞またはリンパ球の生理学のモジュレーションが行われるであろう。例えば、Thomson (1994; ed.) The Cytokine Handbook (2d ed.) Academic Press, San Diego; Metcalf and Nicola (1995) The Hematopoietic Colony Stimulating Factors Cambridge University Press; および Aggarwal and Gutterman (1991) Human Cytokines Blackwell Pub参照。

#### 【0137】

例えば、異常な発現またはIL - B60による異常なシグナリングに関連した疾病または疾患は、アゴニストまたはアンタゴニストのための標的である可能性がある。新たなサイトカインは、造血細胞、例えば、炎症および/または自己免疫疾患のごとき免疫学的応答に影響するリンパ球の調節または発達において役割を果たすはずである。あるいはまた、それは血管の生理学または発達、あるいは神経に影響する可能性がある。

## 【0138】

詳細には、サイトカインは種々の状況において、細胞による細胞の合成、増殖等を媒介するはずである。天然に存在する形態のIL-6のミューテイン変種のごときIL-6のアンタゴニストまたはブロッキング抗体は、免疫応答、例えば、炎症または自己免疫応答のような状況をブロックするための選択的かつ強力な方法を提供する可能性がある。Samter, et al. (eds.) Immunological Diseases vols. 1 and 2, Little, Brown and Coも参照。

## 【0139】

さらに、ある種の組み合わせ組成物、例えば、他の炎症モジュレーターとの組み合わせ組成物も有用であろう。かかる他の分子は、ステロイド類、種変種またはウイルスホモログを含むIL-6および/またはG-CSFの他のバージョン、ならびにそれらの個々のアンタゴニストを包含しうる。

## 【0140】

ノーザンブロット分析によりIL-6 mRNAを産生する各細胞タイプにおける種々の異常な状態が知られている。Berkow (ed.) The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Merck & Co., Rahway, N.J.; Thorn, et al. Harrison's Principles of Internal Medicine, McGraw-Hill, N.Y.; および Weatherall, et al. (eds.) Oxford Textbook of Medicine, Oxford University Press, Oxford参照。他の多くの医学的状態および疾病にはマクロファージまたは単球の活性化が関与しており、これらの多くが本発明において提供されるアゴニストまたはアンタゴニストによる治療に応答するであろう。例えば、Stites and Terr (eds.; 1991) Basic and Clinical Immunology Appleton and Lange, Norwalk, Connecticut; および Samter, et al. (eds.) Immunological Diseases Little, Brown and Co参照。これらの問題は、本発明において提供される組成物を用いる予防または治療に感受性があるはずである。豚島における局在化は糖尿病との関連性の可能性を示唆する。

## 【0141】

IL-6、アンタゴニスト、抗体等を精製し、次いで、患者、家畜またはヒトに投与することができる。治療用に、例えば慣用的な医薬上許容される担体

または希釈剤、例えば、免疫原性アジュバント中において、生理学的に無害な安定化剤、賦形剤または保存料とともに、これらの試薬をさらなる活性または不活性成分と組み合わせることができる。これらの組み合わせ物を滅菌濾過し、バイアル中で凍結乾燥されるような剤形中に入れ、あるいは安定化された水性調合物中で保存される。また本発明は、相補的な結合をしない形態を含む、抗体またはその結合フラグメントの使用を企図する。

#### 【0142】

IL - B60またはそのフラグメントを用いて薬剤スクリーニングを行って、IL - B60に対する結合アフィニティーあるいはIL - B60機能に対して他の重要な生物学的影響を有する化合物を同定することができ、関連化合物の単離もできる。その後の生物学的アッセイを用いて、化合物が固有の刺激活性を有し、それゆえそれがサイトカインの活性をブロックするという点においてブロックーまたはアンタゴニストであるかどうかを決定することができる。同様に、固有の刺激活性を有する化合物はシグナル経路を活性化でき、かくしてそれはIL - B60の活性を刺激するという点でアゴニストである。さらに本発明は、IL - B60に対するブロッキング抗体のアンタゴニストとしての使用ならびに刺激抗体のアゴニストとしての使用を企図する。このアプローチは他のIL - B60種変種に関して特に有用なはずである。

#### 【0143】

有効な治療に必要な試薬の量は、投与手段、標的部位、患者の生理学的状態、および他の投与医薬を包含する多くの異なる因子に依存するであろう。よって、治療用量を検定して安全性および有効性を最適化すべきである。典型的には、インビトロにて使用される用量はこれらの試薬のインシトゥ投与での使用量の有用な指針を提供しうる。個々の疾患の治療に関する有効用量についての動物試験はヒトへの投与についてのさらなる予想を提供するであろう。種々の考慮事項が記載されており、例えば、Gilman, et al. (eds. 1990) Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8th Ed., Pergamon Press; および Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, Penn参照。投与方法はそれらの中および以下において、例えば、

経口、静脈内、腹腔内、または筋肉内投与、経皮拡散等について議論されている。医薬上許容される担体は、水、セイライン、バッファー、および例えばthe Merck Index, Merck & Co., Rahway, New Jerseyに記載された他の化合物を包含する。通常には、用量範囲は、適当な担体を伴って濃度1 mMよりも低く、典型的には濃度約10  $\mu$ M未満、通常には濃度約100 nM未満、好ましくは濃度約10 pM (ピコモラー) 未満、最も好ましくは濃度約1 fM (フェトモラー) 未満である。連続または長期間投与のために除放性処方、または除放装置がしばしば使用されるであろう。例えば、Langer (1990) Science 249:1527-1533参照。

#### 【0144】

IL - B60、そのフラグメント、およびそれに対する抗体またはそのフラグメント、アンタゴニスト、およびアゴニストを、治療すべき宿主に直接投与してもよく、あるいは化合物のサイズに応じて、それらを投与する前にオボアルブミンまたは血清アルブミンのごとき担体蛋白に抱合させるのが望ましいかもしれない。治療処方を多くの慣用的剤形として投与することができる。有効成分を単独投与することは可能であるが、それを医薬処方として投与することが好ましい。典型的には、処方は、1またはそれ以上の許容される担体とともに上記の少なくとも1の有効成分を含む。各担体は、他の成分に適合し、患者に対して有害でないという意味において医薬上および生理学上許容されるべきものである。処方は、経口、直腸、鼻腔、局所または非経口(皮下、筋肉内、静脈内および皮内を包含)投与に適したものを包含する。慣用的には、処方を単位剤形として提供し、製薬分野においてよく知られたいずれの方法によっても処方を調製できる。例えば、Gilman, et al. (eds. 1990) Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8th Ed., Pergamon Press; and Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, Penn.; Avis, et al. (eds. 1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Dekker, New York; Lieberman, et al. (eds. 1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Dekker, New York; および Lieberman, et al. (eds. 1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Dekker, New York参照。

本発明の治療薬を他の剤、例えば、IL - 6またはG - C S Fを包含する他のサ

イトカインまたはそれらの個々のアンタゴニストと組み合わせてもよく、あるいはそれらと関連づけて使用してもよい。

#### 【0145】

本発明のIL - B60の天然に存在する形態および組み換え形態は、当該蛋白への結合活性に関して化合物をスクリーニングできるキットおよびアッセイ方法において特に有用である。アッセイ自動化のいくつかの方法は近年開発されて、数万種の化合物のスクリーニングが短時間で可能となった。例えば、Fodor, et al. (1991) Science 251:767-773参照、それには固体基材上で合成された一定の複数のポリマーにより結合アフィニティを測定する手段が記載されている。大量の精製された、可溶性の、本発明により提供されるようなIL - B60の利用可能性により、適当なアッセイの開発が大いに容易となりうる。

#### 【0146】

他の方法を用いてIL - B60 - IL - B60受容体相互作用における重要受容体を決定することができる。突然変異による分析を行うことができ、例えば、相互作用および・またはシグナリングにおける特異的重要残基を決定するにはSomoza, et al. (1993) J. Exptl. Med. 178:549-558参照。PHD (Rost and Sander (1994) Proteins 19:55-72) およびDSC (King and Sternberg (1996) Protein Sci. 5:2298-2310) は  $\alpha$ -ヘリックス(H)、 $\beta$ -鎖(E)、またはコイル(L)の二次構造予想が可能である。ヘリックスAおよびDは受容体相互作用において重要ではないが、Dヘリックスはより重要な領域である。表2参照。

#### 【0147】

例えば、通常には、例えば三次構造データにより抗原が構造的に特定された場合にアンタゴニストを見出すことができる。精製IL - B60を用いる高度に自動化されたアッセイ方法の開発により、潜在的な相互作用アナログの試験が現在可能である。詳細には、本明細書記載のスクリーニング法を用いることにより新たなアゴニストおよびアンタゴニストが発見されるであろう。一定範囲のIL - B60分子に対する複合的な結合アフィニティを有することが判明した化合物、例えば、IL - B60の種変種に対するアンタゴニストとして役立つ化合物は特に重要である。

## 【0148】

薬剤スクリーニングのための1の方法は、IL - B60を発現する組み換えDNA分子で安定に形質転換された真核または原核宿主細胞を用いるものである。他の分子からの単離においてIL - B60を発現する細胞を単離してもよい。かかる細胞は、生きた形態であれ、固定化形態であれ、標準的な結合パートナー結合アッセイに使用することができる。Parce, et al. (1989) Science 246:243-247; and Owicki, et al. (1990) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87:4007-4011も参照、これらには細胞応答の高感度検出方法が記載されている。

## 【0149】

薬剤スクリーニングのためのもう1つの方法は、IL - B60に対する適当な結合アフィニティを有する化合物に関する高処理量スクリーニングを提供するアプローチを含むものであり、1984年9月13日公開の、Geysenの欧州特許出願第84/03564号に詳述されている。先ず、多数の異なった小型ペプチド試験化合物を固体基材上、例えばプラスチックピンまたは他の適当な表面上で合成する。Fodor, et al. (1991)参照。次いで、すべてのピンを、可溶性で未精製の、あるいは可溶性で精製されたIL - B60と反応させ、洗浄する。次工程は結合IL - B60の検出を含む。

## 【0150】

合理的な薬剤設計はIL - B60および他のエフェクターまたはアナログの分子形状の構造的な研究に基づくものであってもよい。エフェクターは、結合に反応して他の機能を媒介する他の蛋白、あるいは通常にはIL - B60と相互作用する他の蛋白、例えば受容体であってもよい。いずれの部位が特異的な他の蛋白と相互作用するのかを決定するための1の手段は、物理的な構造決定、例えば、X線結晶回折像または二次元NMR法である。これらは、例えば他のサイトカイン - 受容体モデルに対してモデルを設計した場合に、いずれのアミノ酸残基が分子接触領域を形成しているのかについての指針を提供するであろう。蛋白の構造決定に関する詳細な説明については、例えばBlundell and Johnson (1976) *Protein Crystallography*, Academic Press, New York参照。

## 【0151】

## IX. キット

本発明は、種々の診断キットならびに別のIL - B60または結合パートナーの存在を検出するための方法におけるIL - B60蛋白、そのフラグメント、ペプチド、およびそれらの融合生成物の使用も企図する。典型的には、キットは、特定されたIL - B60ペプチドまたは遺伝子のセグメントあるいは1または他の例えばIL - B60フラグメントまたは抗体を認識する試薬の入ったコンパートメントを有するであろう。

### 【0152】

IL - B60への試験化合物の結合アフィニティーを決定するためのキットは、典型的には、試験化合物；標識化合物、例えば、IL - B60に対する既知の結合アフィニティーを有する結合パートナーまたは抗体；IL - B60（天然に存在するものまたは組み換えによるもの）の源；ならびに分子を固定化するための固相のごとき遊離標識化合物から結合化合物を分離するための手段を含む。化合物をスクリーニングしたならば、抗原に対する適当な結合アフィニティーを有する化合物を当該分野でよく知られた適当な生物学的アッセイにおいて評価して、それらがIL - B60シグナリング経路に対するアゴニストまたはアンタゴニストとして作用するかどうかを決定することができる。組み換えIL - B60ポリペプチドの利用可能性は、かかるアッセイをキャリブレーションするための十分に特定された標準物質も提供する。

### 【0153】

例えば、試料中のIL - B60の濃度を決定するための好ましいキットは、典型的には、標識化合物、例えば、抗原に対する既知結合アフィニティーを有する結合パートナーまたは抗原、サイトカイン（天然に存在するものまたは組み換えによるもの）の源ならびにならびに分子を固定化するための固相のごとき遊離標識化合物から結合化合物を分離するための手段を含む。通常には、試薬の入ったコンパートメント、および説明書が提供される。

### 【0154】

IL - B60またはフラグメントに特異的な、抗原結合フラグメントを包含する抗体は、IL - B60および/またはそのフラグメントの上昇したレベルの存

在を検出するための診断用途において有用である。かかる診断アッセイは、溶解物、生きた細胞、固定化細胞、免疫蛍光物質、細胞培養物、体液を用いることができ、さらに血清中の抗原に関連した抗原等の検出を含む。診断アッセイは均一なもの（遊離試薬と抗原結合パートナー複合体との間の分離工程がない）であっても不均一なもの（分離工程あり）であってもよい。種々の市販アッセイが存在し、例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、酵素イムノアッセイ（EIA）、酵素増倍イムノアッセイ法（EMIT）、基質-標識蛍光イムノアッセイ（SLFIA）等がある。例えば、Van Vunakis, et al. (1980) *Meth Enzymol.* 70:1-525; Harlow and Lane (1980) *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press, NY; および Coligan, et al. (eds. 1993) *Current Protocols in Immunology*, Greene and Wiley, NY参照。

---

#### 【0155】

抗-イディオタイプ抗体を同様に使用して、IL-B60に対する抗体の存在を診断してもよい。例えば、IL-B60の過剰産生は種々の免疫学的反応を生じさせる可能性があり、それらは異常な生理学的状態、特に、癌または異常な活性化もしくは分化のごとき増殖性の細胞の状態の診断となる可能性がある。そのうえ、利用可能な分布パターンは、サイトカインが膵島で発現されるという情報を提供し、サイトカインが当該器官の機能、例えば、糖尿病に関連した医学的症状に関与している可能性を示唆する。

#### 【0156】

しばしば、アッセイの感度を最適化するために診断アッセイのための試薬がキットに提供される。本発明に関しては、アッセイ、プロトコル、および標識の性質に応じて、標識または未標識抗体または結合パートナー、あるいは標識IL-B60が提供される。通常には、バッファー、安定化材、酵素基質のごときシグナル生成に必要な材料等のごとき他の添加物とともにかかる物質が提供される。好ましくは、キットは正しい使用および使用後の内容物の処分に関する説明書も含むであろう。典型的には、キットは各有用試薬のためのコンパートメントを有する。望ましくは、試薬は凍結乾燥粉末として提供され、試薬を水性媒体中で復元して適当濃度とし、アッセイを行ってもよい。

## 【0157】

薬剤スクリーニングおよび診断アッセイの上記構成成分の多くは修飾せずに使用でき、あるいは種々の方法で修飾することもできる。例えば、検出可能なシグナルを直接または間接的に提供する部分を共有結合または非共有結合により結合することにより標識を行ってもよい。これらのアッセイのいずれにおいても、結合パートナー、試験化合物、IL-B60、またはそれに対する抗体を直接または間接的に標識することができる。直接標識が可能なものとしては下記のグループが挙げられる：<sup>125</sup>Iのごとき放射性標識、ペルオキシダーゼおよびアルカリ性ホスファターゼのごとき酵素、ならびに蛍光強度の変化、波長シフトまたは蛍光分極をモニターすることのできる蛍光標識（米国特許第3940475号）。間接標識が可能なものとしては、1の構成成分のビオチン化、次いで、上記標識グループの1つにカップリングしたアビジンへの結合が挙げられる。

## 【0158】

遊離IL-B60から結合IL-B60を分離する、あるいは遊離試験化合物から結合試験化合物を分離する方法も多く存在する。IL-B60を種々のマトリックス上に固定化し、次いで、洗浄することができる。適当なマトリックスは、ELISAプレートのごときプラスチック、フィルター、およびビーズを包含する。例えば、Coligan, et al. (eds. 1993) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, Chapter 2, Greene and Wiley, NY参照。他の適当な分離法は、Rattle, et al. (1984) *Clin. Chem.* 30:1457-1461に記載されたフルオレセイン抗体帯磁可能粒子法、および米国特許第4,659,678号に記載されたような二重抗体磁性粒子分離を包含するが、これらに限らない。

## 【0159】

蛋白またはそれらのフラグメントを種々の標識に結合させる方法は文献において広く報告されており、ここでは詳細な議論を要しない。多くの方法は、カルボジイミドまたは活性エステルを用いてペプチド結合を形成することによる活性化カルボキシル基の使用、クロロアセチルのごとき活性化ハロゲンとメルカプト基との反応によるチオエーテルの形成、あるいは結合のためのマレイミドのごとき活性化オレフィンの使用等を包含する。融合蛋白はこれらの適用例においても有

用であることがわかるであろう。

#### 【0160】

本発明のもう1つの診断の態様は、IL - B60の配列から取られたオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列の使用を包含する。異常な症状、例えば、炎症または自己免疫を有する疑いのある患者からの試料中のIL - B60メッセージのレベルを検出するためのプローブとしてこれらの配列を使用することができる。サイトカインは活性化のマーカ―またはメディエータである可能性があるので、例えば、効果が現れて有意なものとなるまでに予防的な様式でさらなる治療が必要な場合には、活性化細胞数を決定することは有用でありうる。RNAおよびDNAヌクレオチド配列の調製、配列の標識、および配列の好ましいサイズについては文献中に多くの説明や議論がある。例えば、Langer-Safer, et al. (1982) Proc. Nat'l. Acad. Sci. 79:4381-4385; Caskey (1987) Science 236:962-967; and Wilchek et al. (1988) Anal. Biochem. 171:1-32参照。

#### 【0161】

他の分子の発現を定性的または定量的に試験する診断キットも企図される。診断または予後は、マーカ―として使用される多数の徴候の組み合わせに依存する可能性がある。よって、キットはマーカ―の組み合わせに関して試験するものであってもよい。例えば、Viallet, et al. (1989) Progress in Growth Factor Res. 1:89-97参照。他のキットを用いて他の細胞サブセットを評価してもよい。

#### 【0162】

##### X. IL - B60受容体の単離

特異的リガンド - 受容体相互作用のリガンドが単離されたならば、受容体を単離するための方法が存在する。Gearing, et al. (1989) EMBO J. 8:3667-3676参照。例えば、受容体への結合を妨害することなくIL - B60サイトカインを標識する手段を決定することができる。例えば、アフィニティー標識をリガンドのアミノ - またはカルボキシル - 末端に融合させることができる。かかる標識はFLAGエピトープまたは例えばIgもしくはFcドメインであってもよい。かかる結合成分を発現する下位集団を検出するための細胞ソーティングまたは他のスクリーニングにより、サイトカインの特異的結合に関して発現ライブラリーをス

クリーニングすることができる。例えば、Ho, et al. (1993) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90:11267-11271; and Liu, et al. (1994) J. Immunol. 152:1821-29参照。別法として、パンニング法を用いてもよい。例えば、Seed and Aruffo (1987) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 84:3365-3369参照。

#### 【0163】

IL - B60 サイトカインの結合パートナーを単離するために、標識を用いた蛋白架橋法を適用することができる。この方法は、リガンド - 受容体様の様式でサイトカインと特異的に相互作用する蛋白の同定を可能にするであろう。

#### 【0164】

既知のIL - 6またはG - CSF受容体成分がIL - B60に対する応答において関与しているかどうかを決定するために、初期の実験が行われるであろう。これらの機能的受容体複合体が多くのまたはすべての成分を、すなわち特定の受容体サブユニットまたはアクセサリ受容体サブユニットをIL - B60受容体複合体と共有しているということは有り得る。

#### 【0165】

本発明の精神および範囲から逸脱することなく本発明に対する多くの修飾および変更がなされ得るし、かかる修飾および変更は当業者に明らかである。本明細書に記載した特定の具体例は例示だけのために提供され、本発明は添付した請求の範囲のよってのみ限定されるべきであり、かかる請求の範囲の均等物の全範囲が含まれる。

#### 【0166】

### 実施例

#### I . 一般的方法

下記の標準的な方法の多くは、例えば、Maniatisら、(1982) Molecular Cloning, A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY; Sambrookら、(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版) Vol. 1-3, CSH Press, NY; Ausubelら、Biology Greene Publishing Associates, Brooklyn, NY; Ausubelら、(1987および増刊)Current Protocols in Molecular Biology Wiley/Greene, NY; Innisら、(1990年度版) PCR Protocol

s: A Guide to Methods and Applications Academic Press, NY; Bonifacinoら、Current Protocols in Cell Biology Wiley, NY; およびDoyleら、Cell and Tissue Culture: Laboratory Protocols Wiley, NYにおいて、記載または言及されている。蛋白質精製方法は、硫酸アンモニウム沈殿、カラムクロマトグラフィ、電気泳動、遠心分離、結晶化およびその他のような方法を包含する。例えば、Ausubelら、(1987および定期的な増刊); Deutscher (1990) "Guide to Protein Purification", Methods in Enzymology vol. 182およびこのシリーズの他の巻; Coliganら、(1995および増刊) Current Protocols in Protein Science John WileyおよびSons, New York, NY; Matsudaira (1993年度版) A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing, Academic Press, San Diego, CA; および蛋白質精製産物の使用における製造者の文献、例えば、Pharmacia, Piscataway, NJまたはBio-Rad, Richmond, CAを参照のこと。組換え技術との併用は、例えば、プロテアーゼ - 除去可能な配列を介して、適当なセグメント (エピトープタグ)、例えば、FLAG配列または融合できる等価物への融合を可能にする。例えば、Setlow (編) Genetic Engineering, Principle and Methods 12: 87-98, Plenum Press, NY におけるHochui (1990) "Purification of Recombinant Protein with Metal Chelate Absorbent"; およびCroweら、(1992) QIAexpress: The High Level Expression & Protein Purification System QUIAGEN, Inc., Chatsworth, CAを参照のこと。

#### 【 0 1 6 7 】

例えば、University of Wisconsin Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI, the NCBI at NIHおよびGenBank, NCBI, EMBLおよび公共の配列の他のソース由来のソフトウェアを包含する入手可能なソフトウェアプログラムを用いて、コンピューター配列分析を行う。他の分析ソースは、例えば、RASMOLプログラム (Bazanら、(1996) Nature 379:591; Lodiら、(1994) Science 263: 1762-1766; SayleおよびMilner-White (1995) TIBS 20: 374-376; およびGronenbergら、(1991) Protein Engineering 4: 263-269参照) およびDSC (KingおよびSternberg (1996) Protein Sci. 5: 2298-2310参照) を包含する。また、Wilkinsら、(1997年度版) Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics

Springer-Verlag, NY; Salzbergら、(1998年度版) Computational Methods in Molecular Biology Elsevier, NY; および Birrenら、(1997年度版) Genome Analysis: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NYを参照のこと。

【0168】

標準的な免疫学的技術は、例えば、Hertzenbergら、(1996年度版) Weir's Handbook of Experimental Immunology vols. 1-4, Blackwell Science; Coligan (1991および改訂) Current Protocols in Immunology Wiley/Greene, NY; および Methods in Enzymology vols. 70, 73, 74, 84, 92, 93, 108, 116, 121, 132, 150, 162および163に記載されている。サイトカインアッセイは、例えば、Thomsen (1994年度版) The Cytokine Handbook (第二版) Academic Press, San Diego; MetcalfおよびNicola (1995) The Hematopoietic Colony Stimulating Factors Cambridge University Press; および Aggarwal および Gutterman (1991) Human Cytokines Blackwell Pub.に記載されている。

【0169】

脈管の生物学的活性についてのアッセイは当該分野でよく知られている。それらは、腫瘍における脈管形成および脈管静止活性、または他の組織、例えば、動脈平滑筋増殖(例えば、Koyomaら、(1996) Cell 87: 1069-1078参照)、脈管上皮への単球の接着(McEvoyら(1997) J. Exp. Med. 185: 2069-2077参照)などを包含するであろう。また、Ross (1993) Nature 362: 801-809; RekhterおよびGordon (1995) Am. J. Pathol. 147: 668-677; Thybergら(1990) Atherosclerosis 10: 966-990; およびGumbiner (1996) Cell 84: 345-357を参照のこと。

【0170】

神経細胞生物学的活性についてのアッセイは、例えば、Wouterlood (1995年度版) Neuroscience Protocols modules 10, Elsevier; Methods in Neurosciences Academic Press; および Neuromethods Humana Press, Totowa, NJに記載されている。発生系の方法は、例えば、Meisami (編) Handbook of Human Growth and Developmental Biology CRC Press; および Chrispeels (編) Molecular Techniques and Approaches in Developmental Biology Interscienceに記載されてい

る。

FACS分析は、Melamedら、(1990) Flow Cytometry and Sorting Wiley-Liss, Inc., New York, NY; Shapiro (1988) Practical Flow Cytometry Liss, New York, NY; およびRobinsonら、(1993) Handbook of Flow Cytometry Methods Wiley-Liss, New York, NYに記載されている。

#### 【0171】

##### II. ヒトIL - B60のクローニング

遺伝子の配列を表1に提供する。配列はゲノムヒト配列由来である。これらの配列は、遺伝子の細胞分布を決定するためのPCRプライマーまたはプローブの調製を可能にする。配列は、メッセージをコード化しているゲノムDNAの単離を可能にする。

プローブまたはPCRプライマーを用いて、種々の組織または細胞型をプローブして細胞分布を決定する。PCR産物は、例えば、TAクローニングキット (Invitrogen) を用いてクローン化する。得られたcDNAプラスミドは、自動シーケンサー (Applied Biosystems) において両末端から配列決定する。

#### 【0172】

##### III. IL - B60の細胞発現

霊長類IL - B60をコードしているcDNAに特異的な適当なプローブまたはプライマーを調製する。典型的に、プローブは、例えば、ランダムプライミングによって標識される。発現は、おそらく、記載された細胞タイプにおいて起こり、ことによると豚島においても起こるかもしれない。

#### 【0173】

リーダー配列の存在が、哺乳動物細胞において発現した場合に分泌されるIL - B60を見出すという予想を導いた。タグを付加した形態のhIL - B60 (hIL - B60 - Et ag) での293T細胞のトランスフェクションは、IL - B60の有効な分泌をもたらさなかった。代わりに、IL - B60は、単に、トランスフェクト細胞溶解物から免疫沈降されることができた。IL - B60がIL - 12 (p34 / p40) のような混成因子であり、よって、分泌のパートナーを必要とするという可能性を調べた。IL - 6ファミリーの非シグナリング

受容体のなかで、近年記載され、これまではオーファン (orphan) の受容体 C L F - 1 ( N R 6 ) もまた、ヒトとネズミの形態の間に高レベルの相同性を示した (> 95% アミノ酸同一性)。これらの観察に基づいて、I L - B 6 0 と C L F - 1 がパートナーであるという仮説が生まれた。

【 0 1 7 4 】

サザン分析：一次増幅 c D N A ライブラリー由来の D N A ( 5 μ g ) を適当な制限酵素で消化してインサートを解離し、1%アガロースゲル上で泳動し、ナイロン膜 (Schleicher and Schuell, Keene, NH) に転写した。

ヒト m R N A 単離のための試料は、例えば、休止している末梢血単核細胞 ( 単球、T細胞、NK細胞、顆粒球、B細胞 ) ( T 1 0 0 ) ; 抗 - C D 3 で 2、6、12 時間活性化されたプールした末梢血単核細胞 ( T 1 0 1 ) ; 休止している T 細胞、T H 0 クローン M o t 7 2 ( T 1 0 2 ) ; 抗 - C D 2 8 および抗 - C D 3 で 3、6、12 時間活性化されたプールした T 細胞、T H 0 クローン M o t 7 2 ( T 1 0 3 ) ; 特異的ペプチドで 2、7、12 時間処理したアネルギー性のプールした T 細胞、T H 0 クローン M o t 7 2 ( T 1 0 4 ) ; 休止している T 細胞、T H 1 クローン H Y 0 6 ( T 1 0 7 ) ; 抗 - C D 2 8 および抗 - C D 3 で 3、6、12 時間活性化されたプールした T 細胞、T H 1 クローン H Y 0 6 ( T 1 0 8 ) ; 特異的ペプチドで 2、6、12 時間処理したアネルギー性のプールした T 細胞、T H 1 クローン H Y 0 6 ( T 1 0 9 ) ; 休止している T 細胞、T H 2 クローン H Y 9 3 5 ( T 1 1 0 ) ; 抗 - C D 2 8 および抗 - C D 3 で 2、7、12 時間活性化されたプールした T 細胞、T H 2 クローン H Y 9 3 5 ( T 1 1 1 ) ; 休止している T 細胞腫瘍系統 J u r k a t および H u t 7 8 ( T 1 1 7 ) ; 休止しているプールした T 細胞クローン A D 1 3 0 . 2、T c 7 8 3 . 1 2、T c 7 8 3 . 1 3、T c 7 8 3 . 5 8、T c 7 8 2 . 6 9 ( T 1 1 8 ) ; 休止している T 細胞ランダム T 細胞クローン ( T 1 1 9 ) ; C D 2 8 - T 細胞クローン; 休止している脾臓細胞 ( B 1 0 0 ) ; 抗 - C D 4 0 および I L - 4 で活性化された脾臓細胞 ( B 1 0 1 ) ; 休止しているプールした B 細胞 E B V 系統 W T 4 9、R S B、J Y、C V I R、7 2 1 . 2 2 1、R M 3、H S Y ( B 1 0 2 ) ; P M A およびイノマイシンで 1、6 時間活性化されたプールした B 細胞系統 J Y ( B 1 0

3) ; 休止しているプールしたNK20クローン(K100) ; PMAおよびイノマイシンで6時間活性化されたNK20クローン(K101) ; IL-2処理したLGL白血病患者の末梢血由来のNKLクローン(K106) ; PMAおよびイノマイシンで1、6時間活性化されたプールした造血前駆系統TF1(C100) ; 休止しているU937単球前駆細胞系統(M100) ; PMAおよびイノマイシンで1、6時間活性化されたプールしたU937単球前駆細胞系統(M101) ; LPS、IFN、抗-IL-10で1、2、6、12、24時間活性化されたプールした水簸した単球(M102) ; LPS、IFN、IL-10で1、2、6、12、24時間活性化されたプールした水簸した単球(M103) ; LPS、IFN、抗-IL-10で4、16時間活性化されたプールした水簸した単球(M106) ; LPS、IFN、IL-10で4、16時間活性化されたプールした水簸した単球(M107) ; LPSで1時間活性化された水簸した単球(M108) ; LPSで6時間活性化された水簸した単球(M109) ; CD34+GM-CSF、TNF 12日由来の休止しているDC70%CD1a+(D101) ; CD34+GM-CSF、TNF 12日由来のPMAおよびイノマイシンで1時間活性化されたDC70%CD1a+(D102) ; CD34+GM-CSF、TNF 12日由来のPMAおよびイノマイシンで6時間活性化されたDC70%CD1a+(D103) ; CD34+GM-CSF、TNF 12日由来のPMAおよびイノマイシンで6時間活性化されたDC95%CD1a+(D103) ; CD34+GM-CSF、TNF 12日由来のFACSソートされた、PMAおよびイノマイシンで1、6時間活性化されたプールしたDC95%CD1a+(D104) ; CD34+GM-CSF、TNF 12日由来のFACSソートされた、PMAおよびイノマイシンで1、6時間活性化されたプールしたDC95%CD14+(D105) ; CD34+GM-CSF、TNF 12日由来のFACSソートされた、PMAおよびイノマイシンで1、6時間活性化されたプールしたDC CD1a+CD86+(D106) ; 単球GM-CSF、IL-4 5日由来の休止しているDC(D107) ; 単球GM-CSF、IL4 5日由来の休止しているDC(D108) ; 単球GM-CSF、IL4 5日由来のLPSで4、16時間

活性化されたプールしたDC (D109) ; 単球GM-CSF、IL4 5日由来のTNF、単球スーブ (supe) で4、16時間活性化されたプールしたDC (D110) ; 刺激されない上皮細胞 ; IL-1 活性化された上皮細胞 ; PMAおよびイノマイシンで1、6時間活性化されたプールした肺繊維芽細胞肉腫系統MRC5 (C101) ; PMAおよびイノマイシンで1、6時間活性化されたプールした腎臓上皮肉腫細胞系統CHA (C102) を包含することができる。IL-B60転写産物の発現は、LPS、IFN、抗-IL-10で4、16時間活性化し、プールした水簸した単球 (M106) ; LPS、IFN、抗-IL-10で1、2、6、12、24時間活性化し、プールした水簸した単球 (M102) ; LPSで6時間活性化し水簸した単球 (M109) ; およびLPSで1時間活性化した水簸した単球 (M108) において非常に高かった。

#### 【0175】

マウスmRNA発現のための試料は、例えば、休止マウス繊維芽細胞L細胞系統 (C200) ; Bra f : ER (エストロゲン受容体へのBra f融合) トランスフェクト細胞、対照 (C201) ; 脾臓由来の休止しているMe l 1 4 + 天然T細胞 (T209) ; TH1細胞に極性化するためにIFN、IL-12および抗IL-4で刺激した、IFN およびIL-4に6、12、24時間曝露し、プールした脾臓由来のMe l 1 4 + 天然T細胞 (T210) ; Th2細胞に極性化するためにIL-4および抗INFで刺激した、IL-4および抗INFに6、13、24時間曝露し、プールした脾臓由来のMe l 1 4 + 天然T細胞 (T211) ; TH1に極性化したT細胞 (IFN- および抗IL-4で7日間極性化された脾臓由来のMe l 1 4 ブライト、CD4+細胞 ; T200) ; TH2に極性化したT細胞 (IL-4およびIFN- で7日間極性化された脾臓由来のMe l 1 4 ブライト、CD4+細胞 ; T201) ; トランスジェニックBa l b / C由来の3倍大きくTH1に極性化したT細胞 (Openshawら(1995) J . Exp. Med. 182: 1357-1367参照 ; 抗-CD3で2、6、24時間活性化し、プールした ; T202) ; トランスジェニックBa l b / C由来の3倍大きくTH2に極性化したT細胞 (抗-CD3で2、6、24時間活性化し、プールした ; T203) ; トランスジェニックC57 b 1 / 6由来の3倍大きくTH1に極

性化したT細胞(抗-CD3で2、6、24時間活性化し、プールした; T212); トランスジェニックC57b1/6由来の3倍大きくTH2に極性化したT細胞(抗-CD3で2、6、24時間活性化し、プールした; T213); 大きくTH1に極性化したT細胞(IFN、IL-12および抗-IL-4で3倍極性化した、トランスジェニックBalb/C由来の天然CD4+ T細胞; IGIF、IL-12および抗IL-4で6、12、24時間刺激し、プールした); 胸腺由来のソートされたCD44- CD25+ T細胞前駆体(T204); 抗原での最後の刺激後3週間休止しているTH1 T細胞クローンD1.1(T205); 10µg/ml ConAで15時間刺激された、TH1 T細胞クローンD1.1(T206); 抗原での最後の刺激後3週間休止しているTH2 T細胞クローンCDC35(T207); 10µg/ml ConAで15時間刺激された、TH2 T細胞クローンCDC35(T208); 刺激されないB細胞系統CH12(B201); 刺激されない成熟B細胞白血病細胞系統A20(B200); 脾臓由来の刺激されないラージB細胞(B202); LPS活性化された全脾臓由来のB細胞(B203); 脾臓由来の休止しているメトリザミド豊富な樹状細胞(D200); 骨髄由来の休止している樹状細胞(D201); 抗B220、抗CD3および抗クラスIIで潤濁した、GM-CSFおよびIL4中で培養された刺激されない骨髄由来の樹状細胞(D202); 抗B220、抗CD3および抗クラスIIで潤濁した、GM-CSFおよびIL-4中で培養し、抗CD40で1、5日間刺激され、プールした骨髄由来の樹状細胞(D203); LPSで4時間活性化された単球細胞系統RAW264.7(M200); GMおよびM-CSFで誘導された骨髄マクロファージ(M201); GM-SCFで誘導された、LPS、IFN およびIL-10で24時間刺激された骨髄マクロファージ(M205); GM-CSFで誘導された、LPS、IFN および抗IL-10で24時間刺激された骨髄マクロファージ(M206); 腹膜マクロファージ(M207); 休止しているマクロファージ細胞系統J774(M202); 0.5、1、3、6、12時間でプールしたマクロファージ細胞系統J774+LPS+抗-IL-10(M203); 0.5、1、3、5、12時間でプールしたマクロファージ細胞系統J774+LPS+IL-

10 (M204) ; 刺激されないマスト細胞系統MC-9およびMCP-12 (M208) ; 脳微小血管内皮細胞由来の、刺激されない不死化した内皮細胞系統 (E200) ; 脳微小血管内皮細胞由来の、TNF で一晩刺激された不死化した内皮細胞系統 (E210) ; 脳微小血管内皮細胞由来の、TNF で一晩刺激された不死化した内皮細胞系統 (E202) ; 脳微小血管内皮細胞由来の、TNF およびIL-10で一晩刺激された不死化した内皮細胞系統 (E203) ; wt C57b1/6マウス由来の全大動脈 ; 5ヶ月ApoE KOマウス由来の全大動脈 (X207) ; 12ヶ月ApoE KOマウス由来の全大動脈 (X207) ; wt 胸腺 (O214) ; 全胸腺、rag-1 (O208) ; 全腎臓、rag-1 (O209) ; 全腎臓、NZ B/Wマウス ; および全心臓、rag-1 (O202) を包含することができる。

#### 【0176】

ヒトIL-B60は、T細胞 ; Th0クローンMot72 (活性化された) ; 活性化されたPBL ; 単球 ; 樹状細胞 ; 胎児肺およびヘビースモーカーの肺試料において発現されることが見出された。

CLF-1は、樹状細胞 ; 脾臓細胞 ; Th1細胞 ; 胎児肺 ; および肺試料において発現されることが見出された。この分布は、該複合体が免疫機能、例えば、樹状細胞および免疫細胞、および肺生理機能において重要であることと一致する。

#### 【0177】

CLF-1はインビトロでIL-B60分泌に必要なので、種々のヒトおよびマウスcDNAライブラリーを両方のmRNAの同時発現についてスクリーンした。両方の最も高い発現は、成人ヒト脾臓細胞、T細胞、活性化された単球および樹状細胞において、ならびに胎児肺および子宮において見出された。マウスライブラリーにおいて、同時発現は、成人肺において最も強かった。

#### 【0178】

IV. IL-B60の染色体マッピング

IL-B60をコードしている単離したcDNAを用いる。染色体マッピングは、標準的な技術である。例えば、BIOS Laboratories (New Haven, CT) および

PCRでのマウス体細胞ハイブリッドパネルを用いるための方法を参照のこと。

ヒトIL - B60遺伝子は、ヒト染色体11に局在していた。

#### 【0179】

V . I L - B 6 0 蛋白質または複合体の精製

多数のトランスフェクト細胞系統を他の細胞と比べて高いレベルでサイトカインを発現するものについてスクリーニングする。別法では、両方のサブユニットを有する組換え構築物を作成できる。種々の細胞系統を取り扱いにおけるそれらの好都合な特性についてスクリーニングおよび選択する。天然のIL - B60は、天然起源から単離でき、または適当な発現ベクターを用いる形質転換細胞からの発現によって単離することができる。発現した蛋白質または複合体の精製は、標準的な手法によって行うか、または、高い効率で細胞溶解物または上清から有効に精製するための工学的な方法と組み合わせてもよい。FLAGまたはHis6セグメントをかける精製に用いることができる。別法では、アフィニティークロマトグラフィーを特異的抗体と共に用いてもよい(下記参照)。

蛋白質は、所望により、coli、昆虫細胞または哺乳動物発現系において生産される。

#### 【0180】

V I . 相同性IL - B60遺伝子の単離

IL - B60 cDNAまたは他の種の相対配列は、所望の起源由来のライブラリー、例えば、霊長類細胞cDNAライブラリーをスクリーンするためのハイブリダイゼーションプローブとして用いることができる。プローブを用いて、ゆるやかなハイブリダイゼーションに必要なストリンジェンシーおよび存在の両方について、多くの異なる種をスクリーンすることができる。交差ハイブリダイゼーションの特異性を示すクローンについて選択するために、適当なハイブリダイゼーション条件が用いられるであろう。

#### 【0181】

ペプチド配列に基づく縮重プローブを用いるハイブリダイゼーションによるスクリーニングもまた、適当なクローンの単離を可能にするであろう。別法では、PCRスクリーニングに適当なプライマーの使用が、豊富な適当な核酸クローン

を生じるであろう。

同様な方法が、種、多型または対立遺伝子変種のいずれかを単離するために適用できる。種変種は、プローブとして1の種からの全長単離物またはフラグメントの単離に基づく交差 - 種ハイブリダイゼーション技術を用いて単離される。

#### 【0182】

別法では、ヒトIL - B60に対して生じた抗体を用いて、適当な、例えば、cDNAライブラリーから交差 - 反応性蛋白質を発現する細胞についてスクリーニングする。精製蛋白質または特定されたペプチドは、上記のように、標準的な方法によって抗体を生じるのに有用である。合成ペプチドまたは精製蛋白質は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を生じるために免疫系に与えられる。例えば、Coligan (1991) Current Protocols in Immunology Wiley/Greene; およびHarlow およびLane (1989) Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Pressを参照のこと。得られた抗体は、所望により、スクリーニング、精製または診断に用いられる。

#### 【0183】

VII . IL - B60または複合体に特異的な抗体

合成ペプチドまたは精製蛋白質は、モノクローナルまたはポリクローナル抗体を生産するために免疫系に与えられる。例えば、Coligan (1991) Current Protocols in Immunology Wiley/Greene; およびHarlow およびLane (1989) Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Pressを参照のこと。ポリクローナル血清またはハイブリドーマを調製してもよい。適当な状況において、結合試薬を上記のように、例えば、蛍光または別の方法で標識するか、またはパンニング法のための基質に固定する。免疫選択、免疫涵濁および関連の技術は、所望により、例えば、IL - B60単独または2つのサブユニット間の複合体のための選択試薬を調製するために利用できる。

#### 【0184】

VIII . IL - B60およびCLF - 1共沈

CLF - 1 - FLAG構築物を発現ベクターにおいて調製した。IL - B60 Et ag (タグを付加したエピトープ) 構築物もまた調製した。IL - B60 E

たg構築物単独か、CLF-1-FLAG構築物単独か、または両方を一緒に用いて、COS細胞中へ一時的トランスフェクションを行った。細胞は、<sup>35</sup>Sメチオニンで標識された。上清および細胞を収集した。

#### 【0185】

IL-B60-Etagおよび可溶性受容体CLF-1-Flagでの細胞の同時トランスフェクションにおいて、リガンドおよび可溶性受容体の両方の分泌が大いに増加した。両方とも、リガンド(抗Etag)または受容体(抗Flag)のいずれかに対する抗体と免疫沈降することができ、IL-B60およびCLF-1がIL-12(p35/p40)に類似する可溶性サイトカイン/受容体複合体を形成することを示す。Gublerら、(1991) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 88: 4143-4147; Wolfら、(1991) J. Immunol. 146: 3074-3081を参照のこと。したがって、正しいパートナーとの同時発現は、遺伝子産物の分泌に劇的な増加をもたらすであろう。IL-B60とEbi3(Devergneら、(1996) J. Virol. 70: 1143-1153)、IL-12 p40およびsCNTFR(Davisら、(1991) Science 253: 59-63)を包含する他の可溶性受容体との同時発現は、リガンドの有効な分泌をもたらさなかった。

#### 【0186】

上清は、抗-FLAG M2(CLF-1を沈殿する)または抗-Etag Ab(IL-B60を沈殿する)と一緒に免疫沈降された。IL-B60 Etag トランスフェクト細胞単独において、抗Etag抗体を用いて検出された上清中の発現レベルは非常に低かった。対照的に、二重トランスフェクト細胞において、IL-B60 Etag および第2の標識バンドが免疫沈降された。第2のバンドは、CLF-1に対応する。よって、Etag抗体は、両方の蛋白質を免疫沈降し、例えば、それらは複合体を形成する。単一トランスフェクト細胞CLF-1 FLAGにおいて、わずかなCLF-1 FLAG蛋白質が抗-FLAG M2 Abと共に免疫沈降する。この結果は、例えば、IL-12のp40成分に対する他の可溶性受容体と一致する。しかしながら、二重トランスフェクト細胞において、より多くのCLF-1が見出されるだけでなく、そのとき、IL-B60も見出される。免疫沈降は両方向において作用する。

## 【0187】

IX. IL - B60はCNTFRに結合する

IL - B60 / CLF - 1のシグナリング受容体を同定するために、hIL - B60およびmCLF - 1同時トランスフェクトした293T細胞由来の馴化培地を、ヒトgp130単独または各々、hIL - 6R、hOSMR、hLIFRまたはhLIFRおよびhCNTFRと組み合わせたhgp130と安定にトランスフェクトしたBA/F3細胞に加えた。gp130、LIFRおよびCNTFRを発現しているBA/F3細胞だけがIL - B60 / CLF - 1での刺激において増殖応答を示した。CNTFR / gp130またはCNTFR / LIFRのみよりなるシグナリング複合体の可能性を分析するために、フレキシブルリンカーを介してCNTFRまたはCLF - 1のいずれかをIL - B60に連結している2つの可溶性融合蛋白質を設計した。同様ないわゆるハイパーサイトカインは、サイトカインおよび可溶性受容体が別々に加えられるよりも細胞上で100 - 1000倍活性であることが示された。Fischerら、(1997) Nature Biotechnology. 15: 142-145を参照のこと。ハイパーCNTFR - IL - B60は、BAF / gp130細胞ではなくてBAF3 / gp130 / LIFR細胞の増殖を誘導することができる、それは、LIFRがシグナリング複合体の成分であることを示す。ハイパーCLF - 1 - IL - B60での細胞の刺激は、いずれの細胞系統の増殖ももたらさなかった。これは、IL - B60分泌に必要であるが、CLF - 1が活性なシグナリング受容体複合体のサブユニットではないことを示した。

## 【0188】

活性な受容体複合体におけるgp130の関連は、完全にこの応答を遮断したgp130に対する抗体の中和によって示された。さらに、gp130、LIFRおよびCNTFRを発現しているBA/F3細胞由来の溶解物中におけるシグナル伝達物質の分析は、STAT3が、CLF - 1 - IL - B60融合ではなく、同時発現したIL - B60およびCLF - 1のいずれか、またはCNTFR - IL - B60融合蛋白質での刺激後にのみ、リン酸化されることを示した。

## 【0189】

X. 生物学的機能の幅の評価

IL - B 6 0 または複合体の生物学的活性を例えば、IL - B 6 0 および IL - 6 および G - C S F の間の配列および構造的相同性に基づいて試験する。最初に、IL - 6 または G - C S F の生物学的活性を示したアッセイを調べる。

#### 【0190】

##### A . 座骨神経傷害後の IL - B 6 0 および C L F - 1 のレギュレーション

マウス脊髄における IL - B 6 0 および C L F - 1 発現を座骨神経の片側横断面において分析し、次いで、近位および遠位神経断端を分離し、よって、再生を防止した。種々の時点で、横断面領域由来の組織を収集し、定量的 P C R によって IL - B 6 0 および C L F - 1 の発現について分析した。座骨神経の横断面は、急速かつ長く持続するリガンドおよび受容体のアップレギュレーションをもたらした。6 時間後、IL - B 6 0 および C L F - 1 がアップレギュレートされた。発現は、非傷害または偽傷害神経と比べて、横断後 2 0 日間上昇した。軸策（破碎した神経）の再生において、IL - B 6 0 および C L F - 1 の両方が 1 2 時間後にダウンレギュレートされるが、一方、IL - B 6 0 発現は、2 0 日後に非傷害神経のレベルにほとんど到達し、C L F - 1 レベルは 2 0 日後にピークに達する。これは、おそらく 2 週間後に開始する再髄鞘形成における、C L F - 1 の付加的な機能を示す可能性がある。神経における G M - C S F およびマクロファージ応答を欠くマウスにおける座骨神経の横断は、4 日後の IL - B 6 0 発現が正常なマウスと比べて変化しないことを示す。しかしながら、それらのマウスにおける C L F - 1 レベルは、正常な同腹子と比べて変化がないものから発現がほぼ 4 倍増加するまでの範囲で不均一である。

#### 【0191】

##### B . 細胞の増殖に対する影響

種々の細胞型の増殖に対する影響を種々の濃度のサイトカインを用いて評価した。関連するサイトカイン IL - 6、G - C S F などと組み合わせて、用量応答分析を行う。細胞代謝および成長を検出する細胞センサー機 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) を用いてもよい。

#### 【0192】

##### C . ヒト単球における細胞表面分子の発現に対する影響

単球を正常な健康なドナーの末梢血単核細胞から陰性選択によって精製する。簡単に言うと、 $3 \times 10^8$ 個のフィコールバンド化単核細胞を氷上で、例えば、 $200 \mu\text{l}$ の CD2 (Leu-5A)、 $200 \mu\text{l}$ の CD3 (Leu-4)、 $100 \mu\text{l}$ の CD8 (Leu2a)、 $100 \mu\text{l}$ の CD19 (Leu-12)、 $100 \mu\text{l}$ の CD20 (Leu-16)、 $100 \mu\text{l}$ の CD56 (Leu-19)、 $100 \mu\text{l}$ の CD67 (IOM67; Immunotech, Westbrook, ME) よりなるモノクローナル抗体 (Becton-Dickinson; Mountain View, CA) および抗-グリコホリン抗体 (10F7MN, ATCC, Rockville, MD) のカクテルと一緒にインキュベートする。抗体結合細胞を洗浄し、次いで、20:1のビーズ対細胞比でヒツジ抗-マウスIgG結合磁性ビーズ (DynaI, Oslo, Norway) と一緒にインキュベートする。磁場の適用によって抗体結合細胞を単球から分離する。次いで、ヒト単球を1%ヒトAB血清を含有するYssel培地 (Gemini Bioproducts, Calabasas, CA) 中、IL-6、IL-6、G-CSFまたはその組み合わせの不在下あるいは存在下で培養する。

#### 【0193】

細胞表面分子の発現の分析は、直接的な免疫蛍光法によって行うことができる。例えば、 $2 \times 10^5$ 個の精製したヒト単球を1%ヒト血清を含有するリン酸緩衝化セーライン (PBS) 中において、氷上で20分間インキュベートする。細胞を $200 \times g$ でペレット化する。細胞を $20 \text{ ml}$  PEまたはFITC標識化mAb中に再懸濁する。さらに20分氷上でインキュベーションした後、細胞を1%ヒト血清を含有するPBS中で洗浄し、次いでPBS単独で2回洗浄する。細胞を1%パラホルムアルデヒドを含有するPBS中で固定し、FACSscanフローサイトメーター (Becton Dickinson; Mountain View, CA) で分析する。典型的なmAb、例えば、Becton-DickinsonのCD11b (抗-mac1)、CD11c (agp150/95)、CD14 (Leu-M3)、CD54 (Leu54)、CD80 (抗-BB1/B7)、HLA-DR (L243) およびCD86 (FUN1; Pharmingen)、CD64 (32.2; Medarex)、CD40 (mAb89; Schering-Plough France) を使用する。

#### 【0194】

#### D. ヒト単球によるサイトカイン生産に対するIL-B60または複合体の影響

ヒト単球を記載のように単離し、1%ヒトAB血清を含有するYssel培地(Gemini Bioproducts, Calabasas, CA)中、IL-B60(1/100希釈バキュロウイルス発現材料)の不在下または存在下で培養する。さらに、単球をIL-B60の不在下または存在下でLPS(E.coli 0127:B8 Difco)で刺激し、細胞培養上清中のサイトカイン(IL-1、IL-6、TNF、GM-CSFおよびIL-10)濃度をELISAによって決定する。

##### 【0195】

サイトカインの細胞質内染色のために、IL-B60およびLPS(E.coli 0127:B8 Difco)の不在下または存在下のYssel培地および10mg/mlブレフェルジンA(Brefeldin A)(Epicentre technologies Madison WI)中で単球(百万/ml)を12時間培養する。細胞をPBS中で洗浄し、2%ホルムアルデヒド/PBS溶液中で室温にて20分間インキュベートする。次いで、細胞を洗浄し、浸透化緩衝液(PBS/BSA(0.5%)/アジド(1mM)中における0.5%サポニン(Sigma)中に再懸濁し、室温で20分間インキュベートする。細胞( $2 \times 10^5$ )を遠心分離し、浸透化緩衝液中で1:10希釈した20mlの直接結合した抗-サイトカインmAb中に室温で20分間、再懸濁する。下記の抗体を使用することができる: IL-1-PE(364-3B3-14); IL-6-PE(MQ2-13A5); TNF-PE(MAb11); GM-CSF-PE(BVD2-21C11); およびIL-12-PE(C11.5.14; Pharmingen San Diego, CA)。次いで、細胞を浸透化緩衝液中で2回およびPBS/BSA/アジド中で1回洗浄し、FACSscanフローサイトメーター(Becton Dickinson; Mountain View, CA)で分析する。

##### 【0196】

#### E. ヒト末梢血単核細胞(PBMC)の増殖に対するIL-B60の影響

全PBMCを記載のように(Boyumら)フィコール-ハイパーク(Ficoll-hypaque)による遠心分離によって、正常な健康なドナーの軟膜から単離する。PBMCを96ウェルプレート(Falcon, Becton-Dickinson, NJ)中においてIL-

B60の不在下または存在下で、1%ヒトAB血清を含有する200 $\mu$ lのYssel培地(Gemini Bioproducts, Calabasas, CA)中で培養する。細胞を培地のみまたは100U/ml IL-2(R&D Systems)との組み合わせにおいて120時間培養する。培養の最後の6時間に3H-チミジン(0.1mCi)を加え、液体シンチレーションカウンティングによって3H-チミジンの取り込みを測定する。

#### 【0197】

多くの他の生物学的アッセイ系において、例えば、T細胞、B細胞、NK、マクロファージ、樹状細胞、造血前駆細胞などにおいて、天然、組換えおよび融合蛋白質がアゴニストおよびアンタゴニスト活性について試験されたであろう。IL-6およびG-CSFの構造的関係のため、その活性に関するアッセイが分析されるべきである。

IL-B60は、IL-6またはG-CSF受容体を発現するトランスフェクト細胞および対照におけるアゴニストまたはアンタゴニスト活性について評価される。例えば、Hoら、(1993) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90, 11267-11271; Hoら、(1995) Mol. Cell. Biol. 15: 5043-5053; およびLiuら、(1994) J. Immunol. 152: 1821-1829を参照のこと。

#### 【0198】

IL-B60は、マクロファージ/樹状細胞活性化および抗原提示アッセイ、抗原または同種異系刺激に応答するT細胞サイトカイン生産および増殖における影響について評価される。例えば、de Waal Malefytら、(1991) J. Exp. Med. 174: 1209-1220; de Waal Malefytら、(1991) J. Exp. Med. 174: 915-924; Fiorentinoら、(1991) J. Immunol. 147, 3815-3822; Fiorentinoら、(1991) J. Immunol. 146: 3444-3451; およびGrouxら、(1996) J. Exp. Med. 184: 19-29を参照のこと。

#### 【0199】

IL-B60はまた、NK細胞刺激に対する影響について評価されるであろう。アッセイは、例えば、Hsuら、(1992) Internat. Immunol. 4: 563-569; およびSchwarzら、(1994) J. Immunother. 16: 95-104に基づいていてもよい。

B細胞成長および分化作用は、例えば、I g G 2 および I g A 2 スイッチ因子アッセイを包含するDeFranceら(1992) J. Exp. Med. 175:671-682; Roussetら(1992) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89: 1890-1893; において記載される方法によって分析されるであろう。注目すべきは、C O S 7 上清とは異なり、N I H 3 T 3 およびC O P 上清は明らかに、ヒトB細胞アッセイに干渉しないことである。

#### 【0200】

F . I L - B 6 0 およびC L F - 1 は神経伝達物質特性におけるスイッチを誘導する

コリン性交感神経ニューロンは、少なくとも3つの異なる標的：汗腺、骨格筋の脈管構造、および骨膜を刺激する。交感神経ニューロンの成熟した神経感応は、出産後の最初の週の最後に始まり、コリンの特性の出現によって特徴付けられる。交感神経ニューロンの培養物を、コリン作用性表現型を特定する異なる神経調節物質の誘導について分析した。コレシストキニン(CCK)、血管作用性腸ポリペプチド(VIP)、物質P(SP)およびソマトスタチン(SOM)は、I L - B 6 0 / C L F - 1 同時トランスフェクト細胞由来の馴化培地またはC N T F R - I L - B 6 0 融合蛋白質でのニューロンの刺激後にアップレギュレートされる。したがって、複合体は、有意な発生生物学機能を示し、神経発達のある特定の態様を誘導するのに有効であるかもしれない。

#### 【0201】

X I . 遺伝的に改変された動物の生産および分析

トランスジェニックマウスを標準的な方法によって生産することができる。かかる動物は、特定組織またはその生物全体における遺伝子の過剰発現の影響を決定するのに有用である。かかる動物は、種々の段階における動物または特定組織の発達に興味深い洞察を与えうる。さらに、生物学的ストレスに対する種々の応答に対する影響を評価することができる。例えば、Hoganら(1995) Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual (第2版) Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照のこと。

#### 【0202】

アデノウイルス技術は、種々の細胞および器官における遺伝子の発現に利用できる。例えば、Hittら(1997) Adv. Pharmacol. 40: 137-195; およびQuantum Biotechnologies, Montreal, Canadaからの文献を参照のこと。動物は、種々の発生的または生理的に機能的な動物系における遺伝子の影響を決定するために有用でありうる。

マウスIL - B60のためのゲノム構造が決定された。IL - B60ノックアウトマウスを生産するための策法を開発することができ、適当な構築物が作られた。

#### 【0203】

本明細書に引用した全文献は、個々の出版物または特許出願が特定して個々に全目的のために完全に出典明示により本明細書の一部とされることが意図された場合と同じ範囲まで、出典明示により本明細書の一部とされる。

#### 【0204】

当業者に明らかなように、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、本発明に多くの修飾および変更を加えることができる。本明細書に記載した特定の具体例は単に例示目的で与えられるものであって、本発明は、付随の請求の範囲およびその請求の範囲が関連する同等物の全範囲によってのみ制限される。

#### 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

SEQ ID NO: 1 is a primate IL-B60 natural nucleic acid sequence.  
 SEQ ID NO: 2 is a primate IL-B60 natural amino acid sequence.  
 5 SEQ ID NO: 3 is a rodent IL-B60 natural nucleic acid sequence.  
 SEQ ID NO: 4 is a rodent IL-B60 natural amino acid sequence.  
 SEQ ID NO: 5 is a rodent LIF.  
 SEQ ID NO: 6 is a primate LIF.  
 SEQ ID NO: 7 is a primate CT-1.  
 10 SEQ ID NO: 8 is a rodent CT-1.  
 SEQ ID NO: 9 is a primate CNTF.  
 SEQ ID NO: 10 is a rodent CNTF.  
 SEQ ID NO: 11 is a primate DNAX IL-40.  
 SEQ ID NO: 12 is a primate CLF-1.  
 15 SEQ ID NO: 13 is a rodent CLF-1.

<110> Schering Corporation

20 <120> Mammalian Cytokines; Related Reagents and Methods

<130> DX0935K

<140>  
 25 <141>

<150> US 09/267,901  
 <151> 1999-03-11

30 <160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1  
 35 <211> 1790  
 <212> DNA  
 <213> primate

<220>  
 40 <221> CDS  
 <222> (162)..(806)

<220>  
 45 <221> mat\_peptide  
 <222> (213)..(806)

<400> 1  
 ccgagcgaaa aaaacctgcg agtgggcctg ggggatggga ttattaaagc ttcgccggag 60  
 50 ccgcggtctg ccctcccaact ccgccagcct ccgggagagg agccgcaccc ggccggcccc 120  
 gccccagccc catggacctc cgagcagggg actcgtgggg g atg tta gcg tgc ctg 176  
 Met Leu Ala Cys Leu  
 -15

55 tgc acg gtg ctc tgg cac ctc cct gca gtg cca gct ctc aat cgc aca 224  
 Cys Thr Val Leu Trp His Leu Pro Ala Val Pro Ala Leu Asn Arg Thr  
 -10 -5 -1 1

60 ggg gac cca ggg cct ggc ccc tcc atc cag aaa acc tat gac ctc acc 272  
 Gly Asp Pro Gly Pro Gly Pro Ser Ile Gln Lys Thr Tyr Asp Leu Thr  
 5 10 15 20

65 cgc tac ctg gag cac caa ctc cgc agc ttg gct ggg acc tat ctg aac 320  
 Arg Tyr Leu Glu His Gln Leu Arg Ser Leu Ala Gly Thr Tyr Leu Asn  
 25 30 35

	tac ctg ggc ccc cct ttc aac gag cca gac ttc aac cct ccc cgc ctg	368
	Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Glu Pro Asp Phe Asn Pro Pro Arg Leu	
	40 45 50	
5	ggg gca gag act ctg ccc agg gcc act gtt gac ttg gag gtg tgg cga	416
	Gly Ala Glu Thr Leu Pro Arg Ala Thr Val Asp Leu Glu Val Trp Arg	
	55 60 65	
10	agc ctc aat gac aaa ctg cgg ctg acc cag aac tac gag gcc tac agc	464
	Ser Leu Asn Asp Lys Leu Arg Leu Thr Gln Asn Tyr Glu Ala Tyr Ser	
	70 75 80	
15	cac ctt ctg tgt tac ttg cgt ggc ctc aac cgt cag gct gcc act gct	512
	His Leu Leu Cys Tyr Leu Arg Gly Leu Asn Arg Gln Ala Ala Thr Ala	
	85 90 95 100	
20	gag ctg cgc cgc agc ctg gcc cac ttc tgc acc agc ctc cag gcc ctg	560
	Glu Leu Arg Arg Ser Leu Ala His Phe Cys Thr Ser Leu Gln Gly Leu	
	105 110 115	
25	ctg ggc agc att gcg gcc gtc atg gca gct ctg gcc tac cca ctg ccc	608
	Leu Gly Ser Ile Ala Gly Val Met Ala Ala Leu Gly Tyr Pro Leu Pro	
	120 125 130	
30	cag ccg ctg cct ggg act gaa ccc act tgg act cct gcc cct gcc cac	656
	Gln Pro Leu Pro Gly Thr Glu Pro Thr Trp Thr Pro Gly Pro Ala His	
	135 140 145	
35	agt gac ttc ctc cag aag atg gac gac ttc tgg ctg ctg aag gag ctg	704
	Ser Asp Phe Leu Gln Lys Met Asp Asp Phe Trp Leu Leu Lys Glu Leu	
	150 155 160	
40	cag acc tgg ctg tgg cgc tcg gcc aag gac ttc aac cgg ctc aag aag	752
	Gln Thr Trp Leu Trp Arg Ser Ala Lys Asp Phe Asn Arg Leu Lys Lys	
	165 170 175 180	
45	aag atg cag cct cca gca gct gca gtc acc ctg cac ctg ggg gct cat	800
	Lys Met Gln Pro Pro Ala Ala Ala Val Thr Leu His Leu Gly Ala His	
	185 190 195	
50	ggc ttc tgacttctga ccttctctc ttctctccc cttcaaaccc tgctcccact	856
	Gly Phe	
55	ttgtgagagc cagccctgta tgccaacacc tgttgagcca ggagacagaa gctgtgagcc	916
	tctggccctt tectggaccg gctgggcgtg tgatgcatc agccctgtct cctcccacc	976
	tcccaaaggt ctaccgagct ggggaggagg tacagtaggc cctgtcctgt cctgtttcta	1036
60	caggaagtca tgctcgaggg agtgtgaagt ggttcaggtt ggtgcagagg cgctcatggc	1096
	ctcctgcttc ttgcctacca cttggccagt gccaccag cccctcaggt ggcacatctg	1156
65	gagggcaggg gttgaggggc caccaccaca catgccttcc tgggggtgaag ccctttggct	1216
	gccccactct ccttgatgg gtgttctcc cttatcccca aatcactcta tacatccaat	1276
	tcaggaaaca aacatggtgg caattctaca caaaaagaga tgagattaac agtgcagggt	1336
70	tgggtctgc attggaggtg ccctataaac cagaagagaa aatactgaaa gcacaggggc	1396
	agggacagac cagaccagac ccaggagtct ccaaagcaca gagtggcaaa caaaaccga	1456
75	gctgagcatc aggacctgc ctgcaattgt cttccagtat tacgggtgctt cttctctgcc	1516
	ccctttccca gggatctgt ggggtgccag gctggggagg gcaaccatag ccacaccaca	1576

```

ggatttcctg aaagtttaca atgcagtagc attttggggt gtaggggtggc agctccoccaa 1636
ggccctgccc cccagcccca cccactcatg actctaagtg tgttgattta atatttattt 1696
5  atttggagat gttatttatt agaigatatt tattgcagaa tttctattct tgtattaaca 1756
aataaaatgc ttgccccaga acaaaaaaaaa aaaa 1790

10 <210> 2
    <211> 215
    <212> PRT
    <213> primate

15 <400> 2
    Met Leu Ala Cys Leu Cys Thr Val Leu Trp His Leu Pro Ala Val Pro
        -15 -10 -5

20 Ala Leu Asn Arg Thr Gly Asp Pro Gly Pro Gly Pro Ser Ile Gln Lys
    -1 1 5 10 15
    Thr Tyr Asp Leu Thr Arg Tyr Leu Glu His Gln Leu Arg Ser Leu Ala
        20 25 30

25 Gly Thr Tyr Leu Asn Tyr Leu Gly Pro Pro Phe Asn Glu Pro Asp Phe
        35 40 45
    Asn Pro Pro Arg Leu Gly Ala Glu Thr Leu Pro Arg Ala Thr Val Asp
        50 55 60

30 Leu Glu Val Trp Arg Ser Leu Asn Asp Lys Leu Arg Leu Thr Gln Asn
        65 70 75
    Tyr Glu Ala Tyr Ser His Leu Leu Cys Tyr Leu Arg Gly Leu Asn Arg
        80 85 90 95
    Gln Ala Ala Thr Ala Glu Leu Arg Arg Ser Leu Ala His Phe Cys Thr
        100 105 110

40 Ser Leu Gln Gly Leu Leu Gly Ser Ile Ala Gly Val Met Ala Ala Leu
        115 120 125
    Gly Tyr Pro Leu Pro Gln Pro Leu Pro Gly Thr Glu Pro Thr Trp Thr
        130 135 140

45 Pro Gly Pro Ala His Ser Asp Phe Leu Gln Lys Met Asp Asp Phe Trp
        145 150 155
    Leu Leu Lys Glu Leu Gln Thr Trp Leu Trp Arg Ser Ala Lys Asp Phe
        160 165 170 175
    Asn Arg Leu Lys Lys Lys Met Gln Pro Pro Ala Ala Ala Val Thr Leu
        180 185 190

55 His Leu Gly Ala His Gly Phe
        195

60 <210> 3
    <211> 648
    <212> DNA
    <213> primate

65 <220>
    <221> CDS
    <222> (1)..(645)

```

```

<220>
<221> mat_peptide
<222> (52)..(645)

5 <400> 3
  atg tta gct tgc cta tgc acg gtg ctg tgg cac ctc cct gca gtg cca 48
  Met Leu Ala Cys Leu Cys Thr Val Leu Trp His Leu Pro Ala Val Pro
    -15                               -10                               -5

10 gct ctt aat cgc aca gga gat cca ggc cct ggc ccc tcc atc cag aaa 96
   Ala Leu Asn Arg Thr Gly Asp Pro Gly Pro Gly Pro Ser Ile Gln Lys
    -1  1                               5                               10                               15

15 acc tat gac ctc acc cgc tac ctg gag cat caa ctc cgc agc tta gct 144
   Thr Tyr Asp Leu Thr Arg Tyr Leu Glu His Gln Leu Arg Ser Leu Ala
                                20                               25                               30

20 ggg acc tac ctg aac tac ctg ggg ccc cct ttc aac gag cct gac ttc 192
   Gly Thr Tyr Leu Asn Tyr Leu Gly Pro Pro Phe Asn Glu Pro Asp Phe
                                35                               40                               45

25 aat cct cct cga ctg ggg gca gaa act ctg ccc agg gcc acg gtc aac 240
   Asn Pro Pro Arg Leu Gly Ala Glu Thr Leu Pro Arg Ala Thr Val Asn
                                50                               55                               60

30 ttg gaa gtg tgg cga agc ctc aat gac agg ctg cgg ctg acc cag aac 288
   Leu Glu Val Trp Arg Ser Leu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Thr Gln Asn
                                65                               70                               75

35 tat gag gcg tac agt cac ctc ctg tgt tac ttg cgt gcc ctc aac cgt 336
   Tyr Glu Ala Tyr Ser His Leu Leu Cys Tyr Leu Arg Gly Leu Asn Arg
                                80                               85                               90                               95

40 cag gct gcc aca gct gaa ctc cga cgt agc ctg gcc cac ttc tgt acc 384
   Gln Ala Ala Thr Ala Glu Leu Arg Arg Ser Leu Ala His Phe Cys Thr
                                100                              105                              110

45 agc ctc cag ggc ctg ctg ggc agc att gca ggt gtc atg gcg acg ctt 432
   Ser Leu Gln Gly Leu Leu Gly Ser Ile Ala Gly Val Met Ala Thr Leu
                                115                              120                              125

50 ggc tac cca ctg ccc cag cct ctg cca ggg act gag cca gcc tgg gcc 480
   Gly Tyr Pro Leu Pro Gln Pro Leu Pro Gly Thr Glu Pro Ala Trp Ala
                                130                              135                              140

55 cct ggc cct gcc cac agt gac ttc ctc cag aag atg gat gac ttc tgg 528
   Pro Gly Pro Ala His Ser Asp Phe Leu Gln Lys Met Asp Asp Phe Trp
                                145                              150                              155

60 ctg ctg aag gag ctg cag acc tgg cta tgg cgt tca gcc aag gac ttc 576
   Leu Leu Lys Glu Leu Gln Thr Trp Leu Trp Arg Ser Ala Lys Asp Phe
                                160                              165                              170                              175

65 aac cgg ctt aag aag aag atg cag cct cca gca gct tca gtc acc ctg 624
   Asn Arg Leu Lys Lys Lys Met Gln Pro Pro Ala Ala Ser Val Thr Leu
                                180                              185                              190

   cac ttg gag gcc cat ggt ttc tga
   His Leu Glu Ala His Gly Phe
                                195

65 <210> 4
    <211> 215
    <212> PRT
    <213> primate

```



Gly Thr Glu Lys Thr Lys Leu Val Glu Leu Tyr Arg Met Val Ala Tyr  
 100 105 110  
 5 Leu Ser Ala Ser Leu Thr Asn Ile Thr Arg Asp Gln Lys Val Leu Asn  
 115 120 125  
 10 Pro Thr Ala Val Ser Leu Gln Val Lys Leu Asn Ala Thr Ile Asp Val  
 130 135 140  
 Met Arg Gly Leu Leu Ser Asn Val Leu Cys Arg Leu Cys Asn Lys Tyr  
 145 150 155 160  
 15 Arg Val Gly His Val Asp Val Pro Pro Val Pro Asp His Ser Asp Lys  
 165 170 175  
 Glu Ala Phe Gln Arg Lys Lys Leu Gly Cys Gln Leu Leu Gly Thr Tyr  
 180 185 190  
 20 Lys Gln Val Ile Ser Val Val Val Gln Ala Phe  
 195 200  
 25 <210> 6  
 <211> 202  
 <212> PRT  
 <213> primate  
 30 <400> 6  
 Met Lys Val Leu Ala Ala Gly Val Val Pro Leu Leu Leu Val Leu His  
 1 5 10 15  
 35 Trp Lys His Gly Ala Gly Ser Pro Leu Pro Ile Thr Pro Val Asn Ala  
 20 25 30  
 Thr Cys Ala Ile Arg His Pro Cys His Asn Asn Leu Met Asn Gln Ile  
 35 40 45  
 40 Arg Ser Gln Leu Ala Gln Leu Asn Gly Ser Ala Asn Ala Leu Phe Ile  
 50 55  
 Leu Tyr Tyr Thr Ala Gln Gly Glu Pro Phe Pro Asn Asn Leu Asp Lys  
 65 70 75 80  
 45 Leu Cys Gly Pro Asn Val Thr Asp Phe Pro Pro Phe His Ala Asn Gly  
 85 90 95  
 50 Thr Glu Lys Ala Lys Leu Val Glu Leu Tyr Arg Ile Val Val Tyr Leu  
 100 105 110  
 Gly Thr Ser Leu Gly Asn Ile Thr Arg Asp Gln Lys Ile Leu Asn Pro  
 115 120 125  
 55 Ser Ala Leu Ser Leu His Ser Lys Leu Asn Ala Thr Ala Asp Ile Leu  
 130 135 140  
 Arg Gly Leu Leu Ser Asn Val Leu Cys Arg Leu Cys Ser Lys Tyr His  
 145 150 155 160  
 60 Val Gly His Val Asp Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Ser Gly Lys Asp  
 165 170 175  
 Val Phe Gln Lys Lys Lys Leu Gly Cys Gln Leu Leu Gly Lys Tyr Lys  
 180 185 190  
 65 Gln Ile Ile Ala Val Leu Ala Gln Ala Phe  
 195 200

<210> 7  
 <211> 201  
 <212> PRT  
 <213> primate  
  
 <400> 7  
 5 Met Ser Arg Arg Glu Gly Ser Leu Glu Asp Pro Gln Thr Asp Ser Ser  
    1                  5                  10                  15  
 Val Ser Leu Leu Pro His Leu Glu Ala Lys Ile Arg Gln Thr His Ser  
                   20                  25                  30  
 15 Leu Ala His Leu Leu Thr Lys Tyr Ala Glu Gln Leu Leu Gln Glu Tyr  
                   35                  40                  45  
 Val Gln Leu Gln Gly Asp Pro Phe Gly Leu Pro Ser Phe Ser Pro Pro  
                   50                  55                  60  
 20 Arg Leu Pro Val Ala Gly Leu Ser Ala Pro Ala Pro Ser His Ala Gly  
                   65                  70                  75                  80  
 25 Leu Pro Val His Glu Arg Leu Arg Leu Asp Ala Ala Ala Leu Ala Ala  
                   85                  90                  95  
 Leu Pro Pro Leu Leu Asp Ala Val Cys Arg Arg Gln Ala Glu Leu Asn  
                   100                  105                  110  
 30 Pro Arg Ala Pro Arg Leu Leu Arg Arg Leu Glu Asp Ala Ala Arg Gln  
                   115                  120                  125  
 Ala Arg Ala Leu Gly Ala Ala Val Glu Ala Leu Leu Ala Ala Leu Gly  
                   130                  135                  140  
 35 Ala Ala Asn Arg Gly Pro Arg Ala Glu Pro Pro Ala Ala Thr Ala Ser  
                   145                  150                  155                  160  
 40 Ala Ala Ser Ala Thr Gly Val Phe Pro Ala Lys Val Leu Gly Leu Arg  
                   165                  170                  175  
 Val Cys Gly Leu Tyr Arg Glu Trp Leu Ser Arg Thr Glu Gly Asp Leu  
                   180                  185                  190  
 45 Gly Gln Leu Leu Pro Gly Gly Ser Ala  
                   195                  200  
  
 <210> 8  
 <211> 203  
 <212> PRT  
 <213> rodent  
  
 <400> 8  
 55 Met Ser Gln Arg Glu Gly Ser Leu Glu Asp His Gln Thr Asp Ser Ser  
    1                  5                  10                  15  
 Ile Ser Phe Leu Pro His Leu Glu Ala Lys Ile Arg Gln Thr His Asn  
                   20                  25                  30  
 60 Leu Ala Arg Leu Leu Thr Lys Tyr Ala Glu Gln Leu Leu Glu Glu Tyr  
                   35                  40                  45  
 65 Val Gln Gln Gln Gly Glu Pro Phe Gly Leu Pro Gly Phe Ser Pro Pro  
                   50                  55                  60

	Arg	Leu	Pro	Leu	Ala	Gly	Leu	Ser	Gly	Pro	Ala	Pro	Ser	His	Ala	Gly
	65					70					75					80
5	Leu	Pro	Val	Ser	Glu	Arg	Leu	Arg	Gln	Asp	Ala	Ala	Ala	Leu	Ser	Val
					85					90					95	
	Leu	Pro	Ala	Leu	Leu	Asp	Ala	Val	Arg	Arg	Gln	Ala	Glu	Leu	Asn	
				100					105				110			
10	Pro	Arg	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Arg	Ser	Leu	Glu	Asp	Ala	Ala	Arg	Gln
				115				120					125			
	Val	Arg	Ala	Leu	Gly	Ala	Ala	Val	Glu	Thr	Val	Leu	Ala	Ala	Leu	Gly
				130				135				140				
15	Ala	Ala	Ala	Arg	Gly	Pro	Gly	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ala	Thr	Leu
	145					150					155					160
20	Phe	Thr	Ala	Asn	Ser	Thr	Ala	Gly	Ile	Phe	Ser	Ala	Lys	Val	Leu	Gly
				165						170					175	
	Phe	His	Val	Cys	Gly	Leu	Tyr	Gly	Glu	Trp	Val	Ser	Arg	Thr	Glu	Gly
				180					185					190		
25	Asp	Leu	Gly	Gln	Leu	Val	Pro	Gly	Gly	Val	Ala					
			195					200								
30	<210>	9														
	<211>	200														
	<212>	PRT														
	<213>	primate														
35	<400>	9														
	Met	Ala	Phe	Thr	Glu	His	Ser	Pro	Leu	Thr	Pro	His	Arg	Arg	Asp	Leu
	1				5					10					15	
40	Cys	Ser	Arg	Ser	Ile	Trp	Leu	Ala	Arg	Lys	Ile	Arg	Ser	Asp	Leu	Thr
				20					25					30		
	Ala	Leu	Thr	Glu	Ser	Tyr	Val	Lys	His	Gln	Gly	Leu	Asn	Lys	Asn	Ile
			35					40					45			
45	Asn	Leu	Asp	Ser	Ala	Asp	Gly	Met	Pro	Val	Ala	Ser	Thr	Asp	Gln	Trp
	50						55					60				
	Ser	Glu	Leu	Thr	Glu	Ala	Glu	Arg	Leu	Gln	Glu	Asn	Leu	Gln	Ala	Tyr
	65					70					75					80
50	Arg	Thr	Phe	His	Val	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Leu	Glu	Asp	Gln	Gln	Val
					85					90					95	
55	His	Phe	Thr	Pro	Thr	Glu	Gly	Asp	Phe	His	Gln	Ala	Ile	His	Thr	Leu
				100					105					110		
	Leu	Leu	Gln	Val	Ala	Ala	Phe	Ala	Tyr	Gln	Ile	Glu	Glu	Leu	Met	Ile
			115					120					125			
60	Leu	Leu	Glu	Tyr	Lys	Ile	Pro	Arg	Asn	Glu	Ala	Asp	Gly	Met	Pro	Ile
	130						135					140				
	Asn	Val	Gly	Asp	Gly	Gly	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Leu	Trp	Gly	Leu	Lys
	145					150					155					160
65	Val	Leu	Gln	Glu	Leu	Ser	Gln	Trp	Thr	Val	Arg	Ser	Ile	His	Asp	Leu
					165					170					175	

Arg Phe Ile Ser Ser His Gln Thr Gly Ile Pro Ala Arg Gly Ser His  
 180 185 190  
 5 Tyr Ile Ala Asn Asn Lys Lys Met  
 195 200  
 <210> 10  
 <211> 198  
 10 <212> PRT  
 <213> rodent  
 <400> 10  
 15 Met Ala Phe Ala Glu Gln Ser Pro Leu Thr Leu His Arg Arg Asp Leu  
 1 5 10 15  
 Cys Ser Arg Ser Ile Trp Leu Ala Arg Lys Ile Arg Ser Asp Leu Thr  
 20 20 25 30  
 Ala Leu Met Glu Ser Tyr Val Lys His Gln Gly Leu Asn Lys Asn Ile  
 35 40 45  
 Ser Leu Asp Ser Val Asp Gly Val Pro Val Ala Ser Thr Asp Arg Trp  
 50 55 60  
 25 Ser Glu Met Thr Glu Ala Glu Arg Leu Gln Glu Asn Leu Gln Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 30 Arg Thr Phe Gln Gly Met Leu Thr Lys Leu Leu Glu Asp Gln Arg Val  
 85 90 95  
 His Phe Thr Pro Thr Glu Gly Asp Phe His Gln Ala Ile His Thr Leu  
 100 105 110  
 35 Thr Leu Gln Val Ser Ala Phe Ala Tyr Gln Leu Glu Glu Leu Met Ala  
 115 120 125  
 Leu Leu Glu Gln Lys Val Pro Glu Lys Glu Ala Asp Gly Met Pro Val  
 130 135 140  
 40 Thr Ile Gly Asp Gly Gly Leu Phe Glu Lys Lys Leu Trp Gly Leu Lys  
 145 150 155 160  
 Val Leu Gln Glu Leu Ser Gln Trp Thr Val Arg Ser Ile His Asp Leu  
 165 170 175  
 45 Arg Val Ile Ser Ser His His Met Gly Ile Ser Ala His Glu Ser His  
 180 185 190  
 50 Tyr Gly Ala Lys Gln Met  
 195  
 <210> 11  
 55 <211> 208  
 <212> PRT  
 <213> primate  
 <400> 11  
 60 Met Thr His Leu Ser Leu Leu Gly Pro Leu Pro Cys Val Arg Thr Ser  
 1 5 10 15  
 Gln Gln Leu Pro Glu Thr Gln Gln Val Thr Thr Pro Gly Lys Lys Pro  
 20 25 30  
 65 Val Ser Val Gly Arg Arg Glu Val Arg Val Pro Gly Thr Ala Leu Val  
 35 40 45

Pro Ser Leu Leu Ser Val Ser Val Leu Leu Gln Leu Gln Tyr Gln Gly  
           50  55  60  
 5 Ser Pro Phe Ser Asp Pro Gly Phe Ser Ala Pro Glu Leu Gln Leu Ser  
       65  70  75  80  
 Ser Leu Pro Pro Ala Thr Ala Phe Phe Lys Thr Trp His Ala Leu Asp  
   85  90  95  
 10 Asp Gly Glu Arg Leu Ser Leu Ala Gln Arg Ala Ile Asp Pro His Leu  
   100  105  
 Gln Leu Val Glu Asp Asp Gln Ser Asp Leu Asn Pro Gly Ser Pro Ile  
   115  120  125  
 15 Leu Pro Ala Gln Leu Gly Ala Ala Arg Leu Arg Ala Gln Gly Pro Leu  
   130  135  140  
 20 Gly Asn Met Ala Ala Ile Met Thr Ala Leu Gly Leu Pro Ile Pro Pro  
       145  150  155  
 Glu Glu Asp Thr Pro Gly Leu Ala Ala Phe Gly Ala Ser Ala Phe Glu  
   165  170  175  
 25 Arg Lys Cys Arg Gly Tyr Val Val Thr Arg Glu Tyr Gly His Trp Thr  
   180  185  190  
 30 Asp Arg Ala Val Arg Asp Leu Ala Leu Leu Lys Ala Lys Tyr Ser Ala  
   195  200  205  
  
 35 <210> 12  
       <211> 410  
       <212> PRT  
       <213> primate  
 40 <400> 12  
       Met Pro Ala Gly Arg Arg Gly Pro Ala Ala Gln Ser Ala Arg Arg Pro  
           1  5  10  15  
 45 Pro Pro Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Cys Val Leu Gly Ala Pro  
   20  25  30  
 Arg Ala Gly Ser Gly Ala His Thr Ala Val Ile Ser Pro Gln Asp Pro  
   35  40  45  
 50 Thr Leu Leu Ile Gly Ser Ser Leu Leu Ala Thr Cys Ser Val His Gly  
       50  55  60  
 55 Asp Pro Pro Gly Ala Thr Ala Glu Gly Leu Tyr Trp Thr Leu Asn Gly  
       65  70  75  80  
 Arg Arg Leu Pro Pro Glu Leu Ser Arg Val Leu Asn Ala Ser Thr Leu  
   85  90  95  
 60 Ala Leu Ala Leu Ala Asn Leu Asn Gly Ser Arg Gln Arg Ser Gly Asp  
   100  105  
 Asn Leu Val Cys His Ala Arg Asp Gly Ser Ile Leu Ala Gly Ser Cys  
   115  120  125  
 65 Leu Tyr Val Gly Leu Pro Pro Glu Lys Pro Val Asn Ile Ser Cys Trp  
   130  135  140

	Ser	Lys	Asn	Met	Lys	Asp	Leu	Thr	Cys	Arg	Trp	Thr	Pro	Gly	Ala	His
	145					150					155					160
5	Gly	Glu	Thr	Phe	Leu	His	Thr	Asn	Tyr	Ser	Leu	Lys	Tyr	Lys	Leu	Arg
					165					170					175	
	Trp	Tyr	Gly	Gln	Asp	Asn	Thr	Cys	Glu	Glu	Tyr	His	Thr	Val	Gly	Pro
				180					185					190		
10	His	Ser	Cys	His	Ile	Pro	Lys	Asp	Leu	Ala	Leu	Phe	Thr	Pro	Tyr	Glu
			195					200					205			
	Ile	Trp	Val	Glu	Ala	Thr	Asn	Arg	Leu	Gly	Ser	Ala	Arg	Ser	Asp	Val
15		210					215					220				
	Leu	Thr	Leu	Asp	Ile	Leu	Asp	Val	Val	Thr	Thr	Asp	Pro	Pro	Pro	Asp
	225				230						235					240
20	Val	His	Val	Ser	Arg	Val	Gly	Gly	Leu	Glu	Asp	Gln	Leu	Ser	Val	Arg
					245					250					255	
	Trp	Val	Ser	Pro	Pro	Ala	Leu	Lys	Asp	Phe	Leu	Phe	Gln	Ala	Lys	Tyr
25				260					265					270		
	Gln	Ile	Arg	Tyr	Arg	Val	Glu	Asp	Ser	Val	Asp	Trp	Lys	Val	Val	Asp
			275					280					285			
30	Asp	Val	Ser	Asn	Gln	Thr	Ser	Cys	Arg	Leu	Ala	Gly	Leu	Lys	Pro	Gly
	290						295					300				
	Thr	Val	Tyr	Phe	Val	Gln	Val	Arg	Cys	Asn	Pro	Phe	Gly	Ile	Tyr	Gly
	305				310						315					320
35	Ser	Lys	Lys	Ala	Gly	Ile	Trp	Ser	Glu	Trp	Ser	His	Pro	Thr	Ala	Ala
					325					330					335	
	Ser	Thr	Pro	Arg	Ser	Glu	Arg	Pro	Gly	Pro	Gly	Gly	Gly	Ala	Cys	Glu
40				340					345					350		
	Pro	Arg	Gly	Gly	Glu	Pro	Ser	Ser	Gly	Pro	Val	Arg	Arg	Glu	Leu	Lys
			355					360					365			
45	Gln	Phe	Leu	Gly	Trp	Leu	Lys	Lys	His	Ala	Tyr	Cys	Ser	Asn	Leu	Ser
	370					375						380				
	Phe	Arg	Leu	Tyr	Asp	Gln	Trp	Arg	Ala	Trp	Met	Gln	Lys	Ser	His	Lys
	385				390						395					400
50	Thr	Arg	Asn	Gln	Val	Leu	Pro	Asp	Lys	Leu						
				405						410						
55	<210>	13														
	<211>	407														
	<212>	PRT														
	<213>	rodent														
60	<400>	13														
	Arg	Pro	Leu	Ser	Ser	Leu	Trp	Ser	Pro	Leu	Leu	Leu	Cys	Val	Leu	Gly
	1				5					10					15	
	Val	Pro	Arg	Gly	Gly	Ser	Gly	Ala	His	Thr	Ala	Val	Ile	Ser	Pro	Gln
				20				25						30		
65	Asp	Pro	Thr	Leu	Leu	Ile	Gly	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Thr	Cys	Ser	Ile
			35					40					45			



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		Inter. Application No PCT/US 00/06182
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC 7	C07K14/52 C12N15/19 G01N33/53 C12N5/06	C07K16/24 C12Q1/68 A61K38/19 C07H21/00
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, STRAND		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 11225 A (NICOLA NICOS ANTONY ;FABRI LOUIS (AU); FARLEY ALISON (AU); NASH AN) 19 March 1998 (1998-03-19) abstract SEQ.ID.N.14 page 7, line 15-26 page 8, line 14 -page 9, line 14 page 11, line 30 -page 12, line 19 page 18, line 16 -page 19, line 29; table 3	5-7, 17-20
X	WO 98 31811 A (DONALDSON DEBRA D ;GENETICS INST (US); COLLINS MARY (US); NEBEN TA) 23 July 1998 (1998-07-23) abstract SEQ.ID.N.5 page 1, line 1 -page 3, line 34	5-7, 17-20
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>3 August 2000</b>		Date of mailing of the international search report <b>18/08/2000</b>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5018 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo.nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <b>Mateo Rosell, A.M.</b>

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int'l Application No  
 PCT/US 00/06182

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 33922 A (AMGEN INC ;ELLIOT GARY S (US); CHANG MING SHI (US); SARMIENTO ULLA) 6 August 1998 (1998-08-06) abstract SEQ.ID.N.2; SEQ.ID.N.3 page 1, line 10 -page 8, line 4	5-7, 17-20
X	WO 98 49307 A (ZYMOGENETICS INC) 5 November 1998 (1998-11-05) SEQ.ID.N.6 abstract page 2, line 5 -page 5, line 30	5-7, 17-20
X	WO 99 00415 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC ;RUBEN STEVEN M (US); SHI YANGGU (US)) 7 January 1999 (1999-01-07) SEQ.ID.N.1; SEQ.ID.N.2 abstract page 3, line 23 -page 7, line 22	5-7, 17-20
X	GREG C A ELSON ET AL: "Cytokine-like factor-1, a novel soluble protein, shares homology with members of the cytokine type I receptor family" JOURNAL OF IMMUNOLOGY,US,THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, vol. 161, no. 3, 1 August 1998 (1998-08-01), pages 1371-1379, XP002111421 ISSN: 0022-1767 cited in the application figure 1 the whole document	5-7, 17-20
A	EP 0 759 466 A (HOFFMANN LA ROCHE) 26 February 1997 (1997-02-26) page 3, line 9-43 page 7, line 12-28 page 8, line 9-50	1,2, 8-14, 26-30
A	WO 95 11303 A (REGENERON PHARMA) 27 April 1995 (1995-04-27) the whole document	1,2, 8-14, 26-30
A	FISCHER M ET AL: "A BIOACTIVE DESIGNER CYTOKINE FOR HUMAN HEMATOPOIETIC PROGENITOR CELL EXPANSION" NATURE BIOTECHNOLOGY,US,NATURE PUBLISHING, vol. 15, no. 2, 1 February 1997 (1997-02-01), pages 142-145, XP002047603 ISSN: 1087-0156 the whole document	1,2, 27-29

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1982)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 00/06182

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PETERS M ET AL.: "In vivo and in vitro activities of the gp130-stimulating designer cytokine hyper-IL6" THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 161, 1998, pages 3575-3581, XP002144212 cited in the application the whole document	1,2, 27-29
A	RAKEMANN TIM ET AL: "The designer cytokine hyper-interleukin-6 is a potent activator of STAT3-dependent gene transcription in vivo and in vitro." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, no. 3, 15 January 1999 (1999-01-15), pages 1257-1266, XP002144213 ISSN: 0021-9258 cited in the application page 1257, right-hand column, paragraph 2 -page 1253, left-hand column, paragraph 1 page 1263, left-hand column, paragraph -page 1266	1,2, 8-14, 26-30
P,X	WO 99 20755 A (KOSCO VILBOIS MARIE ;GAUCHAT JEAN FRANCOIS (FR); ELSON GREG (FR);) 29 April 1999 (1999-04-29) cited in the application the whole document	5-7, 17-20
P,X	WO 99 28462 A (BAKER KEVIN P ;CHEN JIAN (US); GENENTECH INC (US); YUAN JEAN (US);) 10 June 1999 (1999-06-10) SEQ.ID.N.32 abstract page 1, line 1 -page 2, line 7 page 3, line 31 -page 4, line 8 page 10, line 36 -page 11, line 7	5-7, 17-20
P,X	WO 99 35264 A (COSMAN DAVID JOHN ;IMMUNEX CORP (US); MOSLEY BRUCE (US)) 15 July 1999 (1999-07-15) abstract page 3, line 24 -page 5, line 14 SEQ.ID.N.2 page 7, line 3-13	5-7, 17-20
P,X	WO 99 40195 A (SCHERING CORP) 12 August 1999 (1999-08-12) SEQ.ID.N.9; SEQ.ID.N.2 abstract page 9, line 35 -page 13, line 15 page 22-23	5-7, 17-20

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 00/06182
--

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	SHI Y ET AL: "Computational EST database analysis identifies a novel member of the neuropoietic cytokine family." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 262, no. 1, 19 August 1999 (1999-08-19), pages 132-138, XP000929732 ISSN: 0006-291X the whole document	5-7, 17-20
P, X	SENALDI GIORGIO ET AL: "Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: A cytokine of the IL-6 family." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 96, no. 20, September 1999 (1999-09), pages 11458-11463, XP002144214 ISSN: 0027-8424 the whole document	5-7, 17-20

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No	
Information on patent family members				PCT/US 00/06182	
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 9811225	A	19-03-1998	AU 4308097 A EP 0931149 A	02-04-1998 28-07-1999	
WO 9831811	A	23-07-1998	AU 5733898 A EP 1005552 A	07-08-1998 07-06-2000	
WO 9833922	A	06-08-1998	US 5741772 A AU 718882 B AU 6149598 A CN 1251134 T EP 0977859 A US 6054294 A	21-04-1998 20-04-2000 25-08-1998 19-04-2000 09-02-2000 25-04-2000	
WO 9849307	A	05-11-1998	AU 7276098 A	24-11-1998	
WO 9900415	A	07-01-1999	AU 8165298 A EP 1001982 A	19-01-1999 24-05-2000	
EP 0759466	A	26-02-1997	JP 2948150 B JP 9132598 A US 5840530 A US 5919903 A US 5852176 A	13-09-1999 20-05-1997 24-11-1998 06-07-1999 22-12-1998	
WO 9511303	A	27-04-1995	US 5470952 A AT 187982 T AU 679579 B AU 7982794 A CN 1138350 A DE 69422304 D DE 69422304 T EP 0726954 A ES 2139759 T JP 9504030 T PT 726954 T US 5844099 A ZA 9408242 A	28-11-1995 15-01-2000 03-07-1997 08-05-1995 18-12-1996 27-01-2000 11-05-2000 21-08-1996 16-02-2000 22-04-1997 28-04-2000 01-12-1998 13-06-1995	
WO 9920755	A	29-04-1999	AU 1334799 A	10-05-1999	
WO 9928462	A	10-06-1999	AU 1602999 A AU 1602899 A AU 2212299 A WO 9935170 A	16-06-1999 16-06-1999 26-07-1999 15-07-1999	
WO 9935264	A	15-07-1999	AU 2454399 A	26-07-1999	
WO 9940195	A	12-08-1999	AU 2661199 A	23-08-1999	

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
C 0 7 K	14/52	C 0 7 K	16/00	4 C 0 8 4
	14/715		17/00	4 H 0 4 5
	16/00		19/00	
	17/00	C 1 2 N	1/15	
	19/00		1/19	
C 1 2 N	1/15		1/21	
	1/19	C 1 2 P	21/02	C
	1/21	C 1 2 Q	1/02	
	5/10	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 P	21/02		33/50	Z
C 1 2 Q	1/02		33/53	N
G 0 1 N	33/15			P
	33/50	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/53		5/00	B
		A 6 1 K	37/02	

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

(72)発明者 ジャクリーン・シー・ティマンズ  
アメリカ合衆国94043カリフォルニア州マウンテン・ビュー、キャナ・コート1538番

(72)発明者 ロバート・エイ・カステライン  
アメリカ合衆国94062カリフォルニア州レッドウッド・シティ、サミット・ドライブ463番

(72)発明者 ジェイ・フェルナンド・バザン  
アメリカ合衆国94025カリフォルニア州メンロ・パーク、ユニバーシティ・ドライブ775番

Fターム(参考) 2G045 AA34 BB50 BB51 CB01 FB02  
FB03 FB08 FB12  
4B024 AA01 AA11 BA02 BA03 BA21  
BA26 BA63 CA04 HA17  
4B063 QA01 QA08 QQ08 QR77 QX01  
4B064 AG02 AG03 AG20 CA19 DA01  
DA13  
4B065 AA90X AA93X AA93Y AB01  
CA24 CA44 CA46  
4C084 AA02 AA07 AA17 AA20 BA01  
BA08 BA18 BA19 BA22 BA23  
BA44 CA53 DA12 MA02 MA52  
MA55 MA59 MA60 NA14 ZB011  
ZB012 ZC021 ZC022  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10  
CA40 DA01 DA02 DA51 EA20  
EA50 FA74

专利名称(译)	哺乳动物细胞因子;相关试剂和方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003500010A</a>	公开(公告)日	2003-01-07
申请号	JP2000604066	申请日	2000-03-09
[标]申请(专利权)人(译)	先灵葆雅有限公司		
申请(专利权)人(译)	先灵公司		
[标]发明人	ビルギットオッフマン ジャクリーンシーティマンズ ロバートエイカステライン ジェイフェルナンドバザン		
发明人	ビルギット・オッフマン ジャクリーン・シー・ティマンズ ロバート・エイ・カステライン ジェイ・フェルナンド・バザン		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K45/00 A61P37/00 C07K14/47 C07K14/52 C07K14/54 C07K14/715 C07K16/00 C07K17/00 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/19 C12P21/02 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53		
CPC分类号	A61P37/00 C07K14/54 C12N2799/021		
FI分类号	A61K45/00 A61P37/00 C07K14/47 C07K14/52 C07K14/715 C07K16/00 C07K17/00 C07K19/00 C12N1 /15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.N G01N33 /53.P C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.B A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB08 2G045 /FB12 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA02 4B024/BA03 4B024/BA21 4B024/BA26 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA08 4B063/QQ08 4B063/QR77 4B063/QX01 4B064 /AG02 4B064/AG03 4B064/AG20 4B064/CA19 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084 /AA17 4C084/AA20 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA18 4C084/BA19 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/BA44 4C084/CA53 4C084/DA12 4C084/MA02 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA59 4C084 /MA60 4C084/NA14 4C084/ZB011 4C084/ZB012 4C084/ZC021 4C084/ZC022 4H045/AA10 4H045 /AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/DA02 4H045/DA51 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	09/267901 1999-03-11 US		
其他公开文献	JP2003500010A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

提供了编码哺乳动物来源的细胞因子的纯化基因，纯化的蛋白质，特异性抗体和相关试剂，包括编码该分子的核酸。还提供了使用试剂和诊断试剂盒的方法。

