

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-323595  
(P2005-323595A)

(43) 公開日 平成17年11月24日(2005.11.24)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 P 31/12	4 B O 6 3
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 35/00	4 B O 6 4
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 37/00	4 C O 8 4
A 6 1 P 37/00	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 H O 4 5
	審査請求 有 請求項の数 38 O L	(全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2005-135217 (P2005-135217)	(71) 出願人	399050909
(22) 出願日	平成17年5月6日(2005.5.6)		サノフィー-アベンティス
(62) 分割の表示	特願2002-271902 (P2002-271902) の分割		フランス75013パリ、アヴニユ・ドゥ ・フランス 174番
原出願日	平成8年11月7日(1996.11.7)	(74) 代理人	100062144
(31) 優先権主張番号	95/14424		弁理士 青山 稜
(32) 優先日	平成7年12月6日(1995.12.6)	(74) 代理人	100086405
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		弁理士 河宮 治
		(74) 代理人	100106231
			弁理士 矢野 正樹
		(72) 発明者	ダニエル・カピユ
			フランス、エフ-31290アヴィニョレ -ロラゲ、ラ・ブスキエール
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 I L - 1 3 受容体ポリペプチド

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】医療レベルにおける、I L - 4 および I L - 1 3 (インターロイキン - 1 3 ) の調節の現象の、および特にこれらの2種のサイトカインのいずれかによって創製される効果を分離し、別々に制御することができる I L - 1 3 受容体ポリペプチド及びその作製方法の提供。

【解決手段】 I L - 1 3 に特異的に結合することができる、特定な配列のフラグメントからなり、かつ/または細胞膜のレベルで I L - 1 3 によって特異的に生成されるシグナルの伝達に関与し、かつ/または特定な配列のポリペプチドに特異的な抗体によって認識され、ならびに/あるいは特定な配列のポリペプチドを認識する抗体を誘導することができる精製されたポリペプチド。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

8 個の C - 末端残基が以下の 6 個の残基：VRCVTLによって置換されている配列番号：2 の配列のポリペプチドの変異型であるポリペプチドをコードする配列またはその相補鎖からなることを特徴とするプローブを含む、ストリンジেন্টな条件下でのハイブリダイゼーションにより、生物試料中の、8 個の C - 末端残基が以下の 6 個の残基：VRCVTLによって置換されている配列番号：2 の配列のポリペプチドの変異型であるポリペプチドをコードする核酸配列を検出するための、または、異型接合性または遺伝子転移の欠失のごとき異常な合成または遺伝的異常を明らかにするためのイン・ビトロ (in vitro) 診断ツール。

10

## 【請求項 2】

残基 3 4 3 まで伸長する配列番号：2 の配列のポリペプチドの可溶性形態をコードする配列またはその相補鎖からなることを特徴とするプローブを含む、ストリンジেন্টな条件下でのハイブリダイゼーションにより、生物試料中の、残基 3 4 3 まで伸長する配列番号：2 の配列のポリペプチドの可溶性形態であるポリペプチドをコードする核酸配列を検出するための、または、異型接合性または遺伝子転移の欠失のごとき異常な合成または遺伝的異常を明らかにするためのイン・ビトロ (in vitro) 診断ツール。

## 【請求項 3】

残基 3 3 7 まで伸長する配列番号：2 の配列のポリペプチドの可溶性形態をコードする配列またはその相補鎖からなることを特徴とするプローブを含む、ストリンジেন্টな条件下でのハイブリダイゼーションにより、生物試料中の、残基 3 3 7 まで伸長する配列番号：2 の配列のポリペプチドの可溶性形態であるポリペプチドをコードする核酸配列を検出するための、または、異型接合性または遺伝子転移の欠失のごとき異常な合成または遺伝的異常を明らかにするためのイン・ビトロ (in vitro) 診断ツール。

20

## 【請求項 4】

8 個の C - 末端残基が以下の 6 個の残基：VRCVTLによって置換されている配列番号：2 の配列のポリペプチドの変異型であるポリペプチドをコードするプローブを含む染色体異常を検出するための組成物。

## 【請求項 5】

配列番号：1 の配列のヌクレオチド番号 1 からヌクレオチド 1 0 8 1 まで伸長するヌクレオチドリンケージからなるプローブを含む染色体異常を検出するための組成物。

30

## 【請求項 6】

配列番号：1 の配列のヌクレオチド番号 1 からヌクレオチド 1 0 6 3 まで伸長するヌクレオチドリンケージからなるプローブを含む染色体異常を検出するための組成物。

## 【請求項 7】

8 個の C - 末端残基が以下の 6 個の残基：VRCVTLによって置換されている配列番号：2 の配列のポリペプチドの変異型であるポリペプチドをコードする配列またはその相補鎖からなるヌクレオチド・プローブを、所望により、前記ヌクレオチド配列の増幅の予備段階後であってもよいが、該プローブと前記のヌクレオチド配列との間のハイブリダイゼーション複合体の形成を許容するストリンジেন্টな条件下で接触させ；

40

形成し得るハイブリダイゼーション複合体を検出し；

所望により、本発明のプローブとハイブリダイゼーション複合体を形成するヌクレオチド配列を配列決定してもよいことを含む、8 個の C - 末端残基が以下の 6 個の残基：VRCVTLによって置換されている配列番号：2 の配列のポリペプチドの変異型であるポリペプチドをコードする核酸配列のレベルにおける異常な合成または遺伝的異常をイン・ビトロ (in vitro) 検出するための方法。

## 【請求項 8】

残基 3 4 3 まで伸長する配列番号：2 の配列のポリペプチドの可溶性形態であるポリペプチドをコードする核酸配列またはその相補鎖からなるヌクレオチド・プローブを、所望により、前記ヌクレオチド配列の増幅の予備段階後であってもよいが、該プローブと前記の

50

ヌクレオチド配列との間のハイブリダイゼーション複合体の形成を許容するストリンジェントな条件下で、生物試料と接触させ；

形成し得るハイブリダイゼーション複合体を検出し；

所望により、配列番号：1の配列のヌクレオチド番号1からヌクレオチド1081まで伸長するヌクレオチドリンケージからなるプローブとハイブリダイゼーション複合体を形成するヌクレオチド配列を配列決定してもよいことを含む、残基343まで伸長する配列番号：2の配列のポリペプチドの可溶性形態であるポリペプチドをコードする核酸配列のレベルにおける異常な合成または遺伝的異常をイン・ビトロ (in vitro) 検出するための方法。

【請求項9】

配列番号：1の配列のヌクレオチド番号1からヌクレオチド1063まで伸長するヌクレオチドリンケージからなるヌクレオチド・プローブを、所望により、前記ヌクレオチド配列の増幅の予備段階後であってもよいが、該プローブと前記のヌクレオチド配列との間のハイブリダイゼーション複合体の形成を許容するストリンジェントな条件下で、生物試料と接触させ；

形成し得るハイブリダイゼーション複合体を検出し；

所望により、該プローブとハイブリダイゼーション複合体を形成するヌクレオチド配列を配列決定してもよいことを含む、残基337まで伸長する配列番号：2の配列のポリペプチドの可溶性形態であるポリペプチドをコードする核酸配列のレベルにおける異常な合成または遺伝的異常をイン・ビトロ (in vitro) 検出するための方法。

【請求項10】

8個のC-末端残基が以下の6個の残基：VRCVTLによって置換されている配列番号：2の配列のポリペプチドをコードする核酸配列を使用することによって特徴付けられる、8個のC-末端残基が以下の6個の残基：VRCVTLによって置換されている配列番号：2の配列のポリペプチドの変異型である組換えポリペプチドの作製方法。

【請求項11】

配列番号：1の配列のヌクレオチド番号1からヌクレオチド1081まで伸長するヌクレオチドリンケージからなる核酸配列を使用することによって特徴付けられる、残基343まで伸長する配列番号：2の配列のポリペプチドの可溶性形態である組換えポリペプチドの作製方法。

【請求項12】

配列番号：1の配列のヌクレオチド番号1からヌクレオチド1063まで伸長するヌクレオチドリンケージからなる核酸配列を使用することによって特徴付けられる、残基337まで伸長する配列番号：2の配列のポリペプチドの可溶性形態である組換えポリペプチドの作製方法。

【請求項13】

8個のC-末端残基が以下の6個の残基：VRCVTLによって置換されている配列番号：2の配列のポリペプチドの変異型であるポリペプチドの発現を許容する条件下で、該ポリペプチドをコードする核酸でトランスフェクトした細胞を培養し；ついで

該組換えポリペプチドを回収することを特徴とするIL-13受容体組換えポリペプチドを作製する方法。

【請求項14】

残基343まで伸長する配列番号：2の配列のポリペプチドの可溶性形態である組換えポリペプチドの発現を許容する条件下で、配列番号：1の配列のヌクレオチド番号1からヌクレオチド1081まで伸長するヌクレオチドリンケージからなる配列を有する核酸でトランスフェクトした細胞を培養し、ついで、該組換えポリペプチドを回収することを特徴とするIL-13受容体組換えポリペプチドを作製する方法。

【請求項15】

残基337まで伸長する配列番号：2の配列のポリペプチドの可溶性形態である組換えポリペプチドの発現を許容する条件下で、配列番号：1の配列のヌクレオチド番号1からヌ

10

20

30

40

50

クレオチド1063まで伸長するヌクレオチドリンケージからなる配列を有する核酸でトランスフェクトした細胞を培養し、ついで該組換えポリペプチドを回収することを特徴とするIL-13受容体組換えポリペプチドを作製する方法。

【請求項16】

8個のC-末端残基が以下の6個の残基：VRCVTLによって置換されている配列番号：2の配列のポリペプチドの変異型であるポリペプチドを特異的に認識することができることを特徴とするモノクローナルまたはポリクローナル抗体、コンジュゲート抗体、またはそれらの断片。

【請求項17】

残基343まで伸長する配列番号：2の配列のポリペプチドの可溶性形態であるポリペプチドを特異的に認識することができることを特徴とするモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、コンジュゲート抗体、またはそれらの断片。

10

【請求項18】

残基337まで伸長する配列番号：2の配列のポリペプチドの可溶性形態であるポリペプチドを特異的に認識することができることを特徴とするモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、コンジュゲート抗体、またはそれらの断片。

【請求項19】

請求項16記載の抗体を含む、生物試料中の、8個のC-末端残基が以下の6個の残基：VRCVTLによって置換されている配列番号：2の配列のポリペプチドの変異型であるポリペプチドを検出するための組成物。

20

【請求項20】

請求項17記載の抗体を含む、生物試料中の、残基343まで伸長する配列番号：2の配列のポリペプチドの可溶性形態であるポリペプチドを精製または検出するための組成物。

【請求項21】

請求項18記載の抗体を含む、生物試料中の、残基337まで伸長する配列番号：2の配列のポリペプチドの可溶性形態であるポリペプチドを精製または検出するための組成物。

【請求項22】

請求項16、17または18いずれかに記載の少なくとも1の抗体を、IL-13受容体と該抗体（または複数の該抗体）との間の特異的な免疫複合体の可能な形成を許容する条件下で接触させること、および、形成し得る特異的な免疫複合体を検出することを特徴とする、異常なレベルで発現されたIL-13受容体の異常な発現と相関する病理をイン・ビトロ（in vitro）で検出するための方法。

30

【請求項23】

所望により支持体に結合していてもよい、請求項16、17または18いずれかに記載のIL-13受容体に特異的な少なくとも1の抗体、

IL-13受容体と該抗体（または複数の該抗体）との間の特異的な抗原/抗体複合体の形成を明らかにするための手段および/またはその複合体を定量化する手段を含む、生物試料中のIL-13受容体の異常な発現をイン・ビトロ（in vitro）診断するためのおよび/または該試料中のIL-13受容体の発現のレベルを測定するためのキット。

【請求項24】

8個のC-末端残基が以下の6個の残基：VRCVTLによって置換されている配列番号：2の配列のポリペプチドの変異型であるポリペプチド、またはその活性をモジュレートすることができる因子を同定および/または単離するための方法であって、所望により未同定であってもよい化合物または種々の化合物を含有する混合物を、8個のC-末端残基が以下の6個の残基：VRCVTLによって置換されている配列番号：2の配列のポリペプチドの変異型であるポリペプチドを表面に発現している細胞と、該化合物が該ポリペプチドに対して親和性を有する場合には該ポリペプチドおよび該化合物の間の相互作用を許容する条件下で接触させること、および、該ポリペプチドに結合した化合物またはその生物活性をモジュレートすることができるものを検出および/または単離することを特徴とする該方法。

40

【請求項25】

50

残基 3 4 3 まで伸長する配列番号：2 の配列のポリペプチドの可溶性形態であるポリペプチド、またはその活性をモジュレートすることができる因子を同定および/または単離するための方法であって、所望により未同定であってもよい化合物または種々の化合物を含有する混合物を、残基 3 4 3 まで伸長する配列番号：2 の配列のポリペプチドの可溶性形態であるポリペプチドを表面に発現している細胞と、該化合物が該ポリペプチドに対して親和性を有する場合には該ポリペプチドおよび該化合物の間の相互作用を許容する条件下で接触させること、および、該ポリペプチドに結合した化合物またはその生物活性をモジュレートすることができるものを検出および/または単離することを特徴とする該方法。

【請求項 2 6】

残基 3 3 7 まで伸長する配列番号：2 の配列のポリペプチドの可溶性形態であるポリペプチド、またはその活性をモジュレートすることができる因子を同定および/または単離するための方法であって、所望により未同定であってもよい化合物または種々の化合物を含有する混合物を、残基 3 3 7 まで伸長する配列番号：2 の配列のポリペプチドの可溶性形態であるポリペプチドを表面に発現している細胞と、該化合物が該ポリペプチドに対して親和性を有する場合には該ポリペプチドおよび該化合物の間の相互作用を許容する条件下で接触させること、および、該ポリペプチドに結合した化合物またはその生物活性をモジュレートすることができるものを検出および/または単離することを特徴とする該方法。

10

【請求項 2 7】

8 個の C - 末端残基が以下の 6 個の残基：VRCVTL によって置換されている配列番号：2 の配列のポリペプチドの変異型であるポリペプチドを有効成分として含む医薬組成物。

20

【請求項 2 8】

残基 3 4 3 まで伸長する配列番号：2 の配列のポリペプチドの可溶性形態であるポリペプチドを有効成分として含む医薬組成物。

【請求項 2 9】

残基 3 3 7 まで伸長する配列番号：2 の配列のポリペプチドの可溶性形態であるポリペプチドを有効成分として含む医薬組成物。

【請求項 3 0】

8 個の C - 末端残基が以下の 6 個の残基：VRCVTL によって置換されている配列番号：2 の配列のポリペプチドの変異型であるポリペプチドを含む、I L - 1 3 R の活性をモジュレートすることができる因子をスクリーニングするための組成物。

30

【請求項 3 1】

残基 3 4 3 まで伸長する配列番号：2 の配列のポリペプチドの可溶性形態であるポリペプチドを含む、I L - 1 3 R の活性をモジュレートすることができる因子をスクリーニングするための組成物。

【請求項 3 2】

残基 3 3 7 まで伸長する配列番号：2 の配列のポリペプチドの可溶性形態であるポリペプチドを含む、I L - 1 3 R の活性をモジュレートすることができる因子をスクリーニングするための組成物。

【請求項 3 3】

8 個の C - 末端残基が以下の 6 個の残基：VRCVTL によって置換されている配列番号：2 の配列のポリペプチドの変異型であるポリペプチドの使用によって特徴付けられる、I L - 1 3 R の活性をモジュレートすることができる生成物の製造方法。

40

【請求項 3 4】

残基 3 4 3 まで伸長する配列番号：2 の配列のポリペプチドの可溶性形態であるポリペプチドの使用によって特徴付けられる、I L - 1 3 R の活性をモジュレートすることができる生成物の製造方法。

【請求項 3 5】

残基 3 3 7 まで伸長する配列番号：2 の配列のポリペプチドの可溶性形態であるポリペプチドの使用によって特徴付けられる、I L - 1 3 R の活性をモジュレートすることができる生成物の製造方法。

50

## 【請求項 36】

8 個の C - 末端残基が以下の 6 個の残基：VRCVTLによって置換されている配列番号：2 の配列のポリペプチドの変異型であるポリペプチドの使用によって特徴付けられる、IL - 13 拮抗作用を有する医療生成物の合成方法。

## 【請求項 37】

残基 343 まで伸長する配列番号：2 の配列のポリペプチドの可溶性形態であるポリペプチドの使用によって特徴付けられる、IL - 13 拮抗作用を有する医療生成物の合成方法。

## 【請求項 38】

残基 337 まで伸長する配列番号：2 の配列のポリペプチドの可溶性形態であるポリペプチドの使用によって特徴付けられる、IL - 13 拮抗作用を有する医療生成物の合成方法。

10

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、インターロイキン-13 (IL-13) に対して特異的な受容体活性を有する精製ポリペプチド、その生物学的に活性なフラグメント、および相当する核酸配列、ならびにそれらの適用に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

IL-13 は、最近同定された (1、2)、活性化 T リンパ球、活性化後の B リンパ球および肥満細胞によって分泌される 112 アミノ酸のサイトカインである。

IL-4 と共有するその膨大な生物特性により、IL-13 は IL-4 様サイトカインとして説明されている。その活性は、B-細胞 (3-5)、単球 (6-10) および他の非-造血細胞 (11-12) に対する IL-4 の活性に実際に類似している。一方、IL-4 とは反対に、休止または活性化 T 細胞に対しては特異的な効果を何ら及ぼさないようである (13)。

20

## 【0003】

単球 / マクロファージ、B リンパ球およびある種の造血前駆体に対する IL-13 の種々の生物活性は A.J.Minty によって、ならびに IL-13 の概説論文に詳記されている (例えば 14 を参照されたし)。加えて、幾つかのデータは、このサイトカインが他の細胞型に対して多面的な効果を有することを示している。IL-13 によって直接的に影響を受けるこれらの非-造血細胞は、内皮細胞および小膠細胞、表皮ケラチン細胞、ならびに腎臓および小腸のガン腫である。

30

IL-13 の抗-炎症および免疫調節活性は、例えば、自己免疫疾患、腫瘍およびウイルス病理の治療に有用となり得る。

## 【0004】

しかしながら、臨床レベルにおけるこれらの生物特性の利用には、関連する病理において生物特性を制御および変調させることができるように、それを介してこの効果が発揮されるシグナルおよびメカニズムの完全な認識が要求される。

40

細胞内の生物分子によって伝達されるシグナルの分析におけるステージの 1 つは、その膜受容体を同定することにある。IL-13 受容体のこの側面に対して行った研究実験により、IL-13 および IL-4 が共通の受容体、または非常に少なく見積もっても共通受容体複合体の幾つかのコンポーネント、ならびに共通のシグナル伝達エレメントを有することが示されている (15-18)。この受容体は、考えられる細胞型によって変動し得る数で、種々の細胞型の表面に存在する。IL-13 および IL-4 受容体の比較分布が、A.J.Minty (14) によって示されている。

## 【0005】

Kondo ら (19) は、IL-4 に対して高親和性を有する受容体の構造を記載している。この受容体は、140 kDa の糖蛋白質 (IL-4R) と IL-2 受容体の鎖 (c) と

50

の会合によって形成されるダイマーである。IL-4は高親和性(50~100 pMのKd)で140 kDaの糖蛋白質サブユニット(IL-4Rまたはgp140)に結合することができる(15)。しかしながら、この親和性は、c鎖がgp140と会合した場合には、2~3倍だけ上昇する。加えて、この会合はIL-4により媒介されるある種のシグナルの伝達にも必要である(19、20)。

#### 【0006】

IL-13またはIL-4のいずれかの結合性に関する交差-競合実験により、IL-4はIL-13の結合性を通常妨害し得るが、IL-13は一般的にIL-4のその受容体に対する結合性を部分的にしか妨害できず(17、21)、IL-4受容体の2個のサブユニットのいずれにも、またはそれらの会合によって形成された複合体にも結合しないことが立証されている。これらの知見に基づいて、本発明者らは、IL-13に対して特異的な受容体が、もう1個のIL-13結合性コンポーネント(IL-13R)と会合した受容体複合体IL-4よりなると予想した。

10

#### 【0007】

IL-13およびIL-4に応答して増殖することができる赤白血球細胞系統(TF-1系統)で行った研究実験により、これらの2種のサイトカインがそれらの受容体に結合した後に同様の細胞内事象を生成することが示された(18)。平行して、交差-連結(cross-linking)実験により、gp140が、c鎖または新たなサブユニットのいずれかと分子量55~70 kDaのヘテロダイマーを形成し得ることが示された(17、21)。

#### 【0008】

さらに、マウス胚幹細胞系統で最近行われた研究実験により、424アミノ酸残基のポリペプチド(IL-13R)をコードするゲノムDNAおよびcDNAを単離することが可能となったが、これは、高親和性、すなわちその定数Kdが約10 pM~100 pMの値にある親和性を有する受容体(低親和性受容体は、2 nM~10 nMの値にある定数Kdを有している)(22、23)を構成するように、IL-13受容体がIL-4受容体と共通の鎖を分有していることを示している。

20

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0009】

医療レベルにおける、IL-4およびIL-13の調節の現象の、および特にこれらの2種のサイトカインのいずれかによって創製される効果を分離し、別々に制御することができる可能性の明確な理解の重要性に鑑み、本発明者らは、一方では、高親和性を有するポリペプチド特異的結合性IL-13の特徴付けに、他方では、低親和性でIL-13に単独で特異的に結合し、IL-4受容体と会合するとIL-13に対する高親和性受容体を構成するもう1種のポリペプチドの特徴付けに関心を持った。

30

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0010】

今回、本発明者らは、他の公知のヒト腎臓ガン腫系統(21)よりもより多量にIL-13特異的受容体を発現しているヒトガン腫細胞系統を同定し、今回、IL-4/IL-13受容体に対するIL-13の結合に寄与する、IL-13Rと称する一次サブユニットのクローニング、ならびに2種のサイトカイン間の交差-競合を許容する高親和性受容体を構成するためにIL-13受容体とIL-4受容体によって分有されている、IL-13Rと称する共通鎖のクローニングを行った。しかるに、本発明はIL-13に特異的に結合する精製ポリペプチドに関する。

40

#### 【0011】

さらに特に、本発明の対象は、そのアミノ酸配列がIL-13に対して特異的な受容体(IL-13RおよびIL-13R)の配列に対応する精製ポリペプチド、またはその生物学的に活性なフラグメントである。

また、本発明の対象は、該ポリペプチドまたはその生物学的に活性なフラグメントをコードする単離DNA配列でもある。

50

加えて、本発明は、前記定義のヌクレオチド配列の少なくとも1種を含有する発現ベクター、および該ヌクレオチド配列のうち1種の複製および/または発現を許容する条件下にてこれらの発現ベクターでトランスフェクトした宿主細胞に関する。

トランスフェクトした宿主細胞による組換えIL-13R およびIL-13R またはそれらの生物学的に活性なフラグメントの産生方法も本発明の一部である。

【0012】

また、本発明は、IL-13によって創製される免疫および炎症メカニズムを調節するための、IL-13R および/またはIL-13R またはそれらの生物学的に活性なフラグメントを含む医薬組成物をも含む。加えて、本発明は、IL-13R および/またはIL-13R の活性を変調させることができる剤を同定するための方法、およびこれらの剤をスクリーニングするためのIL-13R および/またはIL-13R またはそれらのフラグメントの使用、ならびにIL-13受容体の活性を変調させることができる新規な生成物の製造方法に関する。

10

【0013】

また、本発明は、IL-13R および/またはIL-13R に対して特異的な抗体または抗体の誘導体をも含む。

【0014】

最後に、本発明は、IL-13R および/またはIL-13R 、それらの生物学的に活性なフラグメントのうち1種、またはこの受容体の活性を特異的に変調させることができる化合物を、医薬上許容されるビヒクルと組合せて患者に投与することを含む、IL-13によって媒介される免疫反応を変調させるための治療処理方法に関する。

20

【発明の効果】

【0015】

本明細書に記載したIL-13R およびIL-13R のクローニングにより、IL-4によって誘導される応答に匹敵する、IL-13によって特異的に誘導される応答に関与する因子の知識を改善することができる。加えて、IL-13がキーとなる役割を演ずる正常および病理状態下の受容体の発現の調節を研究するためのツールを有することができた。

さらに、cDNAの入手可能性により、IL-4/IL-13受容体複合体の再構成に必要な他の蛋白質を容易にクローニングすることができ、また、IL-13の活性の特異的なアンタゴニストとなり得る新規な医薬生成物の製造または合理的なモデリングにも有用である。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

以降の本発明の記載においては、以下の定義を使用する：

高親和性でIL-13に特異的に結合するポリペプチド(IL-13R)：配列番号2のアミノ酸配列を含むポリペプチド、またはそのいずれかの生物学的に活性なフラグメントもしくは誘導体；

【0017】

-低親和性でIL-13に単独で特異的に結合し、IL-4受容体と会合すると高親和性受容体を構成するポリペプチド(IL-13R)：配列番号4のアミノ酸配列を含むポリペプチド、またはそのいずれかの生物学的に活性なフラグメントもしくは誘導体；

40

【0018】

-生物学的に活性な：IL-13に特異的に結合することができ、かつ/または細胞膜のレベルでIL-13によって特異的に生成されるシグナルの伝達に関与することができ、かつ/またはIL-4およびIL-13に結合することができる複合体を形成するように、IL-4に対して特異的な受容体(IL-4R/gp140)と相互作用することができ、かつ/または配列番号2の配列および/または配列番号4の配列のポリペプチドに対して特異的な抗体によって認識され、ならびに/あるいは配列番号2の配列および/または配列番号4の配列のポリペプチドを認識する抗体を誘導することができること；

50

## 【0019】

-誘導体：配列番号2の配列および/または配列番号4の配列のポリペプチドの変異型であるいずれかのポリペプチド、または配列番号2の配列または配列番号4の配列の遺伝的および/または化学的性質の改変から得た、すなわち1個または限定数のアミノ酸の突然変異、欠失、付加、置換および/または化学修飾によって得たいずれかの分子、ならびにいずれかのイソ型配列、すなわち、配列番号2の配列または配列番号4の配列、それらを生物学的に活性とする少なくとも1種の保存された特性を有するD エナンチオマー形、該変異型、修飾またはイソ型配列中に1または2以上のアミノ酸を含有する、それらのフラグメントのうちの1種もしくはそれらの修飾配列のうちの1種に等しい配列。

## 【0020】

本発明の対象は、

a) 配列番号2の配列または配列番号4の配列、および

b) 前記定義による、配列番号2および配列番号4由来のいずれかの生物学的に活性な配列；から選択されるアミノ酸配列を含む精製ポリペプチドである。

誘導体の製造は種々の対象物を有することができ、これには特にIL-13に対する受容体の親和性を上昇させるもの、IL-13とIL-4との間の交差-競合を変調させるもの、それらの産生レベルを向上するもの、プロテアーゼに対するそれらの耐性を上昇させるもの、それらの生物活性を改善するもの、あるいは新規な医薬的および/または生物学的特性をそれらに付与するものが含まれる。

前記定義のポリペプチドの生物学的に活性な変異型の中では、前記のアミノ酸配列のうちの1種をコードする遺伝子の転写物(メッセンジャーRNA)の可変スプライシング(alternate splicing)によって生成されたフラグメントが好ましい。

## 【0021】

有利な変異型においては、配列番号2の配列のポリペプチドの8個のC-末端アミノ酸が以下の6個のアミノ酸：VRCVTLによって置換されている。

もう1つの有利な態様により、本発明は、残基343、好ましくは残基337まで伸長する配列番号2の配列のポリペプチドの細胞外ドメインを特に含む、IL-13R<sub>s</sub>と称するIL-13Rの可溶性形態、ならびに、残基343、好ましくは残基336と342との間の残基まで伸長する配列番号4の配列のポリペプチドの細胞外ドメインを特に含む、IL-13R<sub>s</sub>と称するIL-13Rの可溶性形態に関する。

## 【0022】

配列番号2の配列または配列番号4の配列を含むポリペプチドは、本発明の特定の具体例を表す。実施例から明らかとなるように、このポリペプチドは、機能性IL-13受容体を形成するようにヒト細胞の表面に発現させることができ、かつ/または、IL-2受容体の鎖と共に、IL-4およびIL-13に共通の受容体複合体を形成するようにIL-4受容体と結合させることができる。

## 【0023】

また、本発明の対象は、

a) 配列番号1の配列、

b) 配列番号3の配列、

c) 配列番号1の配列もしくは配列番号3の配列、またはそれらの相補的配列にハイブリダイズすることができ、かつIL-13受容体活性を有するポリペプチドをコードし、またはIL-13およびIL-4に対して高親和性を有する受容体を再構成することができる核酸配列、ならびに

d) 遺伝コードの縮重のために、配列a)、b)およびc)由来となる核酸配列；から選択される単離核酸配列でもある。

## 【0024】

より特には、本発明の対象は、記載した生物特性の少なくとも1つを保存している、IL-13R<sub>s</sub>またはIL-13Rの可溶性部分をコードする配列、およびIL-13RまたはIL-13Rの転写物の可変スプライシングによって生成されるいずれかの変異

10

20

30

40

50

型である。

【0025】

好ましい具体例は、配列番号1の配列のヌクレオチド番号1からヌクレオチド1081まで、好ましくはヌクレオチド1063まで伸長するヌクレオチドのストレッチを含むか、またはそれからなる核酸配列によって表される。

【0026】

もう一つの好ましい具体例は、配列番号3の配列のヌクレオチド番号1からヌクレオチド番号1059まで、好ましくは番号1041と1056との間のヌクレオチドまで伸長するヌクレオチドのストレッチを含むか、またはそれからなる核酸配列によって表される。

10

【0027】

有利には、本発明による核酸配列は、IL-13R またはIL-13R の成熟形態に相当する蛋白質をコードする配列であり、この成熟蛋白質はシグナルペプチドの放出の結果物である。

【0028】

本発明の種々のヌクレオチド配列は、人工的な起源または他のものとし得る。それらは、配列番号1の配列または配列番号3の配列に基づいて作製したプローブにより配列ライブラリーをスクリーニングすることによって得られるDNAまたはRNA配列とし得る。かかるライブラリーは、当業者に知られている慣用的な分子生物学的技術によって調製し得る。

20

【0029】

本発明によるヌクレオチド配列は、化学合成、または別法としてライブラリーのスクリーニングによって得た配列の化学的または酵素的修飾を含む方法の組合せによっても調製し得る。

【0030】

これらのヌクレオチド配列により、本発明によるポリペプチドまたはその生物学的に活性なフラグメントをコードするヌクレオチド・プローブを調製することができる。適当なハイブリダイゼーション条件は、当業者によって日常的に使用されている温度およびイオン強度条件、好ましくは $T_m - 5$  と $T_m - 30$  との間の温度条件、なおより好ましくは $T_m - 5$  と $T_m - 10$  との間の温度条件（高ストリンジェンシー）であり、 $T_m$ とは50%の塩基対形成鎖が分離する温度として定義される溶融温度である。これらは、生物試料中の本発明のポリペプチドに特異的な転写物をハイブリダイゼーション実験によって検出するための、あるいは多形性、突然変異、または不完全な（poor）スプライシングから生じる異常な合成または遺伝的異常を検出するためのイン・ビトロ（in vitro）診断ツールとして用いることができる。

30

【0031】

本発明のプローブは、少なくとも10個のヌクレオチドを含み、最大限、配列番号1の全体のヌクレオチド配列もしくは配列番号3の全体のヌクレオチド配列、またはそれらの相補鎖を含む。

最も短いプローブ、すなわち約10～15ヌクレオチドのものの中では、適当なハイブリダイゼーション条件は当業者により日常的に使用されている温度およびイオン強度条件に相当する。

40

【0032】

好ましくは、本発明のプローブはその使用前に標識する。それに関しては、例えば蛍光、放射能、化学発光、または酵素標識のごとき幾つかの技術が、当業者の能力の範囲内に存在する。

【0033】

IL-13受容体ポリペプチドまたは生物学的に活性なフラグメントをコードする核酸配列のレベルの異型接合性および遺伝子転移の欠失のごとき異常な合成または遺伝的異常の検出にこれらのヌクレオチドプローブを用いるイン・ビトロ診断方法が本発明に包含さ

50

れる。かかるタイプの方法は：

- 所望により、後記のヌクレオチド配列を増幅させる予備工程の後であってもよいが、本発明のヌクレオチドプローブと前記のヌクレオチド配列との間のハイブリダイゼーション複合体の形成を許容する条件下にて、該プローブを生物試料とを接触させ；

- 形成され得るハイブリダイゼーション複合体を検出し；ついで

- 所望により、本発明のプローブとハイブリダイゼーション複合体を形成するヌクレオチド配列を配列決定してもよい；

ことを含む。

#### 【0034】

加えて、本発明のcDNAプローブは染色体異常の検出にも有利に用いることができる 10

。本発明のヌクレオチド配列は、いわゆるPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）技術またはそのいずれか他の変形により、配列決定反応または特異的な増幅反応のセンスおよび/またはアンチセンス・オリゴヌクレオチドプライマーの製造および使用にも有用である。

#### 【0035】

さらに、本発明によるヌクレオチド配列は、メッセンジャーRNAを包含する核酸配列と特異的にハイブリダイズすることができるアンチセンス配列を調製する治療分野においても用途を有し、遺伝子治療にも使用することができる。かくして、本発明の対象は、前記定義のIL-13受容体ポリペプチドの生成を、少なくとも部分的に阻害することができるアンチセンス配列である。かかる配列は、有利には、転写レベルのIL-13R またはIL-13R をコードするリーディングフレームを構成するものからなる。 20

それらは、より特に、アレルギーまたは炎症の治療に使用することができる。

#### 【0036】

さらに、本発明によるヌクレオチド配列は、IL-13受容体活性を有する前記定義の組換えポリペプチドの生成にも使用することができる。

これらのポリペプチドは、当業者に知られている組換え産物を作製するための技術により、前記定義のヌクレオチド配列から作製することができる。この場合においては、使用するヌクレオチド配列を、細胞性宿主中のその発現を許容するシグナルの制御下に置く。使用する細胞性宿主は、細菌のごとき原核生物系、または酵母、昆虫細胞、CHO細胞（チャイニーズハムスター卵巣細胞）または有利に商業的に入手可能ないずれかの他の系のごとき真核生物系から選択することができる。本発明のポリペプチドの発現に好ましい細胞性宿主は、繊維芽細胞系統COS-7またはCOS-3からなる。 30

#### 【0037】

プロモーター、アクチベーターまたは末端配列のごときポリペプチドの発現を制御するシグナルは、使用する細胞性宿主に従って選択する。この終了までに、本発明によるヌクレオチド配列を、選択した宿主内の自己複製性ベクター、または選択した宿主の組込み性ベクターに挿入することができる。かかるベクターは、当業者によって日常的に使用されている方法に従って調製され、得られたクローンは、例えばエレクトロポレーションのごとき標準的な方法によって適当な宿主に導入することができるであろう。

#### 【0038】

前記定義のヌクレオチド配列の少なくとも1種を含む発現ベクターも、本発明の一部である。 40

COS-7またはCOS-3細胞の場合においては、(17)に記載されているのと同様に、ベクターpSE-1を使用してトランスフェクションを行うことができる。

#### 【0039】

加えて、本発明は、これらの発現ベクターによってトランスフェクトした宿主細胞にも関する。これらの細胞は、前記定義のベクターに挿入したヌクレオチド配列を宿主細胞に導入し、つづいてトランスフェクトしたヌクレオチド配列の複製および/または発現を許容する条件下にて該細胞を培養することによって得ることができる。

これらの細胞は、配列番号2の配列または配列番号4の配列の組換えポリペプチドある 50

いはその誘導体の産生方法に使用することができ、該方法はそれ自体が本発明に含まれ、配列番号2の配列もしくは配列番号4の配列の組換えポリペプチドまたは誘導体の発現を許容する条件下にて該トランスフェクトした細胞を培養し、該組換えポリペプチドペプチドを回収することを特徴とする。

【0040】

使用する精製工程は当業者に知られている。組換えポリペプチドペプチドは、分画、クロマトグラフィー法、特異的なモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体を用いるイムノアフィニティー技術のごときを独立で、または組合せて用いる方法によって、細胞溶解物および抽出物から、培養上清から精製することができる。

【0041】

前記定義によるIL-13R および/またはIL-13R を特異的に認識することができるモノ-またはポリクローナル抗体も本発明の一部である。ポリクローナル抗体は、通常的手法により、IL-13R および/またはIL-13R に対して免疫化した動物の血清から得ることができる。

モノクローナル抗体は、KoehlerおよびMilstein(Nature, 1975, 256, 495-497)によって記載されている慣用的なハイブリドーマ培養法に従って得ることができる。

【0042】

有利な抗体は、IL-13R および/またはIL-13R の細胞外ドメインに対して指向された抗体である。

本発明による抗体は、例えば、キメラ抗体、ヒト化(humanized)抗体、FabおよびF(ab')<sub>2</sub>フラグメントである。それらは、標識化抗体または免疫コンジュゲートの形態としても存在し得る。例えば、それらは、ジフテリア毒のごとき毒素と、または放射性物と会合していてもよい。この場合においては、これらのイムノトキシンは、IL-13R および/またはIL-13R の過剰発現に関与するある種の病理の治療に使用することができる治療剤を構成し得る。

本発明の抗体、特にモノクローナル抗体は、例えば、免疫蛍光によってか、または金もしくはペルオキシダーゼ標識によって、特定の組織切片上のIL-13受容体の免疫組織化学分析にも使用することができる。

【0043】

それらは、例えば異常な過剰発現のごときIL-13R および/またはIL-13R の発現を観察することが要求されたり、または膜発現の調節をモニターするいずれの状況においても有利に使用することができる。

しかるに、本発明は、異常なレベルで発現されたIL-13R および/またはIL-13R を含有し得る生物試料中の、IL-13R および/またはIL-13R の異常な発現と関連付けられる病理のイン・ビトロ診断方法にも関し、該方法は、本発明の少なくとも1種の抗体を、IL-13R および/またはIL-13R と該抗体(群)との間の特異的な免疫複合体の可能な形成を許容する条件下にて、該生物試料と接触させ、形成され得る該特異的な免疫複合体を検出することを特徴とする。

【0044】

また、本発明は、生物試料中のIL-13R および/またはIL-13R の異常な発現のイン・ビトロ診断用の、ならびに/あるいは該試料中のIL-13受容体の発現レベルを測定するためのキットにも関し、該キットは、

- 所望により支持体に結合されていてもよい、IL-13R および/またはIL-13R に対して特異的な少なくとも1種の抗体、

- IL-13R および/またはIL-13R と該抗体(群)との間の特異的な抗原/抗体複合体の形成を明らかにするための手段、および/またはこれらの複合体を定量化するための手段を含む。

【0045】

本発明のもう1つの対象は、IL-13R および/またはIL-13R に特異的なリガンドまたはその活性を変調させることができる剤を同定および/または単離するための方

10

20

30

40

50

法に関し、該方法は、所望により未同定であってもよい、当該化合物が受容体に対する親和性を有するであろう場合には、化合物または種々の化合物を含有する混合物を、IL-13受容体と該化合物との間の相互作用を許容する条件下にて、その表面にIL-13Rおよび/またはIL-13Rを発現している細胞と接触させ、IL-13Rおよび/またはIL-13Rに結合した化合物、またはその生物活性を変調させることができるものを検出および/または単離することを特徴とする。

## 【0046】

特定の具体例において、本発明のこの方法は、そのIL-13Rおよび/またはIL-13R受容体についてのIL-13のアゴニストおよびアンタゴニストの同定および/または単離に適用される。

また、本発明は、医薬上許容される担体と結合した、有効成分として、好ましくは可溶性形態の、前記定義に相当するポリペプチドを含む医薬組成物をも含む。

かかるポリペプチドは、細胞表面に発現されたIL-13Rおよび/またはIL-13Rと実際に競合して作用し、それによって、IL-13のその受容体への結合性に特異的なアンタゴニストを構成することができ、病理状態においてIL-13によって媒介される反応を変調させることを意図した医薬生成物の合成に有利に使用することができる。

## 【0047】

最後に、本発明は、医薬上許容されるビヒクルと結合した、IL-13Rおよび/またはIL-13Rを（またはそれらの生物学的に活性なフラグメントの1種を）、またはその生物活性を特異的に変調させることができる化合物を、患者に投与することを含む、IL-13によって媒介される免疫学的反応にリンクした状態の治療処理方法を含む。

## 【0048】

本発明の他の特徴および利点は、以下に説明を表す実施例および図面と残りの説明とで明らかになるであろう。

## 実施例

## 【0049】

## 材料および方法

## 結合性および交差-連結実験：

結合性および交差-連結実験は、[125I][Phe43]-IL-13-GlyTyrGlyTyrについて記載されている(17)のと同様にして行った。

## 【0050】

## IL-6の分泌の誘導：

CaKi-1細胞(ATCC HTB46)を $5 \times 10^4$ 細胞/ウェルの密度で24-ウェルプレートに入れ、培養3日後に、密集した単層を無ウシ胎児血清DMEM培地で3回洗浄した。CaKi-1細胞の刺激は、Y124DIL-4または抗-gp140モノクローナル抗体の不存在または存在下にて、 $30 \text{ ng/ml}$ のIL-4またはIL-13を用いて行った。24時間培養した後に培養培地に放出されたIL-6の量を、ELISA技術(フランス, Innotest社製)によって測定した。

## 【0051】

## ヒトIL-13R cDNAの単離および分析

前記(25)と同様にして、合計RNAをCaKi-1細胞から抽出した。ポリ(A)RNAは、オリゴ(dT)25で被覆した磁気ビーズ(Dynal社製)を用いて合計RNAから単離した。 $2 \times 10^5$ クローンを含有するcDNAライブラリーは、プライマー-アダプター法(26)およびベクターpSE-1(27)を用いて構築した。用いた発現用のクローニング戦略は、以前に記載されている(17)。

## 【0052】

## ヒトIL-13R cDNAの調製：

RNA試料を逆転写酵素でコピーし、それを、配列+52~+71に相当するセンスプライマーおよび+489~+470に相当するアンチセンスプライマー(番号付けは図5および6に示すcDNA配列に基づいて行った)を用いるPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)

10

20

30

40

50

に付した。PCR-増幅産物は、cDNAの配列 + 445 ~ + 461 に相補的なプローブとハイブリダイズした。サイズマーカーを図の左に示す。

【0053】

ヒトIL-13R cDNAの単離および分析

1) げっ歯類IL-13R プローブの調製

a) B9細胞の培養(28)

B9細胞は、10%ウシ胎児血清および50 μg/mlのゲンタマイシンを補充したRPMI培地(Gibco社製)中で培養した。

b) B9細胞のRNAの調製

該細胞を、PBS緩衝液(GIBCO-BRL社製、生理リン酸緩衝液、参照04104040)で2回洗淨した。1,000rpmで10分間遠心分離した後に、細胞ペレットを以下の組成の溶解緩衝液中に懸濁した：4M グアニジン-チオシアネート；25mM クエン酸ナトリウム pH7；0.5%サルコシル；0.1M 2-メルカプトエタノール。

10

【0054】

その懸濁液を、UltraturaxソニケーターNo.231256(JANKE and KUNDEL社製)を用い、最大出力にて1分間超音波処理した。pH4の酢酸ナトリウムを添加して0.2Mとした。その溶液を1容量のフェノール/クロロホルム混合液(v/v:5/1)で抽出した。

水性相に含まれるRNAを1容量のイソプロパノールの援助で-20℃にて沈殿させた。そのペレットを溶解緩衝液中に再懸濁した。その溶液をフェノール/クロロホルム混合液で再度抽出し、イソプロパノールでRNAを沈殿させた。そのペレットを70%ついで100%エタノールで洗淨した後に、RNAを水中に再懸濁させた。

20

【0055】

c) 相補的DNAの調製

cDNAは、ポリT12プライマーを用いて合計RNA5 μgから調製した。合計RNAを、30 μl容量の緩衝液：0.5mM 各デオキシヌクレオチド三リン酸および30単位のRNアシン(Promega社製)を含有する50mM トリス-HCl pH8.3、6mM MgCl<sub>2</sub>、10mM DTT、40mM KCl中、37℃にて1時間、ついで50℃にて10分間、さらに37℃にて10分間、逆転写酵素RNエースH(Gibco-BRL社製、参照8064A)200単位と共にインキュベートした。65℃にて10分間加熱することによって反応を終結させた。

30

【0056】

d) PCR技術によるマウスIL-13R cDNAフラグメントの特異的増幅

重合は、以下の組成：10mM トリス-HCl pH8.3、2.5mM MgCl<sub>2</sub>、50mM KCl、0.2mM 4種のdNTP、2種の核酸プライマー各2 μg/ml、および2.5U TAQ DNAポリメラーゼ(Beckman社製)；の緩衝液50 μl最終容量中、cDNA6 μlを用いて行った。プライマーのペアは、Hilton(22)によって公開されている配列上で選択した。

【0057】

センス・プライマー：ヌクレオチド249~268

5' AGAGGAATTACCCCTGGATG 3'

アンチセンス・プライマー：ヌクレオチド1256~1275

5' TCAAGGAGCTGCTTTCTTCA 3'

反応は、94℃にて1分間、58℃にて1分間、72℃にて4分間の30サイクルにつづいて、72℃にて10分間の最終サイクル行った。

40

【0058】

e) PCR増幅産物の精製

TAE緩衝液(40mM、トリス-HCl、1mM EDTA pH7.9)中の1%アガロースゲル(Sigma社製)上、100ボルトにて1時間流した後に、同緩衝液中の1 μg/ml臭化エチジウム存在下にてゲルを染色した。増幅産物(1027塩基対(bp)

50

)のIL-13R のcDNAフラグメント)に相当するバンドをGlass Maxキット(Gibco社製)を用いて抽出した。

【0059】

f)プローブの調製

マウスIL-13R 受容体に相当する1027bpの精製cDNAフラグメント25ngを、BRL Random Primers DNA 標識化システムキットを用いて、 $2.4 \times 10^9$  dpm/ $\mu$ gの比活性で32Pで標識するか;別法として、100ngを $4 \times 10^8$  dpm/ $\mu$ gの比活性でBoehringerキットを用いたニックトランスレーションによって標識した。

【0060】

2)ヒトIL-13R cDNAの単離および分析

a)合計RNAの調製

合計RNAは、1b章で前記したのと同様にしてCaki-1細胞から抽出した。

【0061】

b)メッセンジャーRNA(ポリA+画分)の精製

RNAのポリA+画分の精製は、製造業者により推奨されている手法に従ってDYNALオリゴ(dT)25 Dynabeadsキット(参照610.05)を用いて行った。原理は、それにポリ(dT)25オリゴヌクレオチドが結合している超常磁性ポリスチレンビーズの使用に基く。ポリA+画分は、磁性支持体に捕捉されたビーズに結合したオリゴ(dT)25オリゴヌクレオチドとハイブリダイズした。

【0062】

c)ノザンプロット

ポリA+メッセンジャーRNA5 $\mu$ gを、MOPS緩衝液(10mM pH7.4、0.5mM EDTA)中の1%アガロース、8%ホルムアルデヒド変性ゲル上に負荷した。移動させ、 $20 \times$ SSC緩衝液中のN+Hybondメンブレン(Amersham社製)上に転移させた後に、そのRNAを真空下、80にてオーブン中で加熱することによって固定化させた。ついでそのメンブレンを、以下の緩衝液:1M NaCl、30%ホルムアミド;1%SDS、5 $\times$ デンハート溶液;100 $\mu$ g/mlサケ精子DNA中、42にて2時間、プレハイブリダイズさせた。2時間のプレハイブリダイゼーション後に、そのメンブレンを $2.5 \times 10^6$  dpm/mlのランダム・プライマー法によって調製した一定濃度のマウスIL-13R プローブと同緩衝液中にて16時間ハイブリダイズさせた。ついでそのメンブレンを $2 \times$ SSC緩衝液、0.1%SDS中、室温にて30分間、ついで同緩衝液中、50にて2時間、2回洗浄した。カセット(Molecular Dynamics社製)中で4日間感光させた後に、ノザンプロットをInstant Imager(Molecular Dynamics社製)で分析した。4200bpの優勢な転写物、および1500bpと2000bpとの二重バンド(doublet)がCaki-1細胞、U373およびU937で検出された。

【0063】

ヒトIL-13R およびIL-13R の特性の特徴付け:

COS-7またはCHO細胞を前記(17)と同様にしてペトリ皿中でトランスフェクトした。24時間後に、その細胞をトリプシン処理し、 $8 \times 10^4$ 細胞/ウェルの密度で24-ウェルプレート中で培養した。37にて48時間培養させた後に、その細胞を、前記(17)と同様のヨウ素化IL-13を用いる結合性実験(3回行ったアッセイは、10%未満の変動を示した)に用いた。トランスフェクションに関しては、COS-7またはCHO細胞を、種々のプラスミド0.6mgを用いて25-cm<sup>2</sup>プレート中でトランスフェクトした。24時間後に、細胞単層をトリプシン処理し、 $8 \times 10^4$ 細胞/ウェルにて12-ウェルプレート中で培養した。3日後に、標識IL-13、ならびに非標識IL-13および/またはIL-4を用いて結合性および競合実験を行った。結果は、別々に行った少なくとも3回の実験の代表なものである。

【0064】

ヒトIL-13R および/またはIL-4Rを発現している細胞の核抽出物のEMSA

10

20

30

40

50

における電気泳動移動度の比較：

2 × 10<sup>6</sup>のCHO細胞を10cmペトリ皿に入れた。24時間後に、その細胞をブラスミドDNA(34)6μgでトランスフェクトした。48時間後に、その細胞を、100ng/ml濃度のIL-13またはIL-4を含むか、または含まない培地3ml中、37℃にて30分間インキュベートした。ついで、その細胞をPBS-0.5mM EDTA緩衝液で2回濯ぎ、ついでPBS1.2ml中に採取した。ついで、その細胞を遠心分離し、細胞抽出物を(35)記載と同様にして調製した。ついで、細胞抽出物10~20μg、および32Pで放射性同位元素標識化したオリゴヌクレオチド・プローブ(50,000-100,000cpm)を用いて、(36)記載と同様にしてEMSAを行った。ここに該プローブはヒトCプロモーターのCエレメントに相当する(37)。合成したオリゴヌクレオチド・プローブは以下の配列を有する：

5' - GATCCACTTCCCAAGAACAGA - 3'

【0065】

実施例

実施例1：

Caki-1細胞表面におけるヒトIL-13Rの発現の分析

最近、ヒト腎臓ガン腫細胞が、IL-4およびIL-13により分有されている受容体に加えて、大過剰量の特異的なIL-13受容体を発現していることが発見された(21)。これらの結果に基づいて、ヒトガン腫細胞系統の試料を前記(17)と同様にしてIL-13の結合について実験した。IL-13に対する結合部位を特に多数発現する特定の系統Caki-1(ATCC HTB46)をより詳細に分析した。飽和実験から得たスキャッチャード曲線は、446 ± 50pMのK<sub>d</sub>および7.2 × 10<sup>4</sup>受容体/細胞の結合能力を有する結合部位が存在することを示した(図1)。競合実験においては、非標識IL-13は用量-依存的な様式で標識化IL-13を完全に置換したが、IL-4は高親和性で標識化IL-13の約10%を置換した。より高濃度のIL-4(100nMよりも高い濃度)でも、残りの90%の結合IL-13を置換しなかった(図2)。

【0066】

これらの結果は、2種の部位、すなわち2種のサイトカインによって分有されている1種と、IL-13に特異的なもう1種；が存在することと合致した。IL-13に対する親和性による交差-連結に対する実験は、約70kDaの複合体を示し、これは、種々の細胞型においてIL-13を用いた同様の交差-連結実験において認められた複合体(17、21)と一致した。標識化IL-13はIL-13によって複合体から完全に置換されたが、IL-4によっては置換されなかった。このことは競合実験と合致した(図3)。

【0067】

実施例2：

IL-4またはIL-13により誘導されるIL-6の分泌の分析

本発明者らは、Caki-1細胞でIL-4またはIL-13によって誘導される分泌を分析した。2種のサイトカインは、同様なレベルのIL-6の分泌を誘導し、該分泌はIL-4Rの鎖に特異的な抗体によって、およびアンタゴニストY124DIL-4によって阻害された(図4)。このことは、Caki-1細胞中の2種のサイトカインによって分有されている受容体がIL-6の分泌の誘導に寄与していることを示している。IL-4およびIL-13によって誘導される蛋白質複合体IRS1/4PS(18)のリン酸化を抗-IL-4R抗体およびIL-4アンタゴニストの存在または不存在下にて分析した場合にも、同様の結果が認められた。

【0068】

これらの結果は、全体として考慮すると、Caki細胞中で発現された受容体複合体IL-4/IL-13が以前に記載されているものと同じであること、および過剰発現しているIL-13に結合する蛋白質(IL-13R)がIL-4Rを含む機能性複合体中のIL-13の認識に寄与する受容体のコンポーネントであることを示している。従って

、このIL-13結合基をクローニングするためのメッセンジャーRNAの供給源として、これらの細胞を使用した。

#### 【0069】

実施例3：

IL-13受容体の一次サブユニット(IL-13R)のクローニング

クローニングおよび発現のストラテジーは以前に記載されているもの(17)を用いた。2×10<sup>5</sup>組換えクローンを含むcDNAライブラリーは、Caki-1細胞を用いて構築した(26)。該ライブラリーを、各バッチのDNAがプラスミド形態であって、COS-7細胞に導入されている(29)1000のcDNAのバッチに分けた。トランスフェクトしたCOS-7細胞に対する標識化IL-13の結合性により、IL-13受容体をコードするクローンのバッチを同定することが可能となった。陽性バッチを分配し、IL-13に結合することができる細胞表面蛋白質の合成を行うことができる単一クローンが同定されるまで再スクリーニングした。2種の独立したIL-13R cDNAを最後に単離した。IL-13R cDNAの完全ヌクレオチド配列およびそれから予想されるアミノ酸配列を図5および6に示す。該cDNAはポリ-Aテイルを除く1298塩基長、および106塩基の短い3'非翻訳領域を有する。典型的な(canonical)AATAAAポリアデニル化シグナルは予想された部位に存在している。ヌクレオチド53と1192との間のオープンリーディングフレームは380アミノ酸のポリペプチドを規定する。該配列は、潜在的なシグナルペプチド、単一の貫膜ドメイン、および短い細胞質内テイルと共に膜蛋白質をコードする。

4箇所の潜在的なN-グリコシル化部位は細胞外領域に位置する。II型ファミリーのサイトカイン受容体の特徴として考えられている2種の共通モチーフ(30)；第1のものはN-末端ジスルフィド架橋ループ構造由来であり、第2のものは細胞外領域のC-末端に位置するWSXWSタイプのモチーフである；も存在していることは重要である。非常に短い細胞質配列は、なぜ細胞内のシグナルを伝達するものがCaki細胞中のIL-4およびIL-13によって分有されている受容体複合体のみであるのかを説明しているのかも知れない。

#### 【0070】

整列実験により、ヒトIL-5R鎖との相同性(51%類似および27%同一、図7)および、より低い程度で、プロラクチン受容体との相同性が立証された。IL-5R複合体が、IL-5に結合するがもう1つの蛋白質を要する鎖と、IL-3およびGM-CSF受容体に共有されている鎖とからなり、シグナルを伝達することができる高親和性受容体を形成することは興味深い(31)。

#### 【0071】

実施例4：

種々の細胞系統におけるヒトIL-13RメッセンジャーRNAの検出

驚くべきことには、Caki-1細胞中においては、大過剰量のIL-13Rが発現されているのだが、IL-13RおよびIL-4Rに対する同様の量のメッセンジャーRNAがノザンプロットによって検出された。この知見は、IL-4R転写物と比較してこのmRNAのより多量の翻訳が存在することを示しており、少数のIL-13結合部位しか発現していない細胞系統におけるIL-13R mRNAの検出の欠如を説明している。RT-PCR分析(図8)は、Caki-1細胞で見出された転写物が、表皮ケラチン細胞系統A431、前骨髄細胞TF-1、プレモサイティック細胞(premocytic cell)U937、および細胞系統BIM9においてもより低レベルで存在することを示した。JurkatT細胞系統またはプレ-BNALM6細胞系統においては全く転写物が検出されなかった。これらの結果は、本発明者らによって以前に記載されたこれらと同一の系統で行ったIL-13結合性実験(17)、およびIL-13の知られている生物学的標的と合致した。

#### 【0072】

実施例5：

10

20

30

40

50

ヒトIL-13R cDNAでトランスフェクトしたCOS-7細胞で行った結合性分析

IL-13R をコードする単離cDNAでトランスフェクトしたCOS-7細胞は、標識化IL-13に特異的に結合した。飽和曲線のスキッチャード解析は、 $250 \pm 30$  pMのKd値と $5.6 \times 10^6$ 受容体/細胞の最大結合能力とを有する単一のコンポーネント部位を示した(図9)。

【0073】

組換え受容体の親和性は、Caki-1細胞中のIL-13R についての446 pMのKd値および幾つかの他の細胞において記載されているもの(17)とよく一致した。その結果、IL-5Rの鎖との配列相同性にも拘わらず、クローン化受容体は高親和性の結合部位を再構成するために第2の鎖を必要としないため、それは異なる挙動をする。

10

【0074】

同様に最近記載されたIL-15に結合する蛋白質(32)が、IL-15R複合体の他の2種のコンポーネント不存在下にて、高親和性でIL-15に結合する特徴を有することは興味深い。

【0075】

競合実験においては、IL-13は、 $1.5 \pm 0.5$  nMの阻害定数(Ki)で、クローン化受容体に対する標識化IL-13の結合性を阻害することができたが、IL-4は該結合性を阻害できなかった。したがって、クローン化受容体の薬理学は、Caki-1細胞中に存在するIL-13R のものと同様であった。交差-連結実験により、70 kDaの放射性同位体標識化バンドが示された。このバンドは、Caki細胞ならびに他の細胞(17)で認められたものと同じの移動度を有する。この複合体は、恐らくは、標識化IL-4を用いて行った交差-連結実験におけるIL-4Rの140 kDaバンドに加えて認められた60-70 kDaのバンドに相当する。また、このことは、機能性受容体複合体における2種の蛋白質間に強い相互作用が存在することも示している。しかるに、本発明者らは、IL-13R とIL-4Rとが細胞膜中で相互作用し、2種のサイトカイン間の交差-競合を許容する受容体を再構成するのかをチェックした。同時発現実験の結果を図11および12に示す。

20

【0076】

別々か同時かのいずれかの2種の受容体の発現が、2種のサイトカインのいずれかを特異的に認識する多数の受容体を生じたことは明らかなようである。しかしながら、それらが一緒に発現した場合には、少数の受容体しか(5~10%)2種のサイトカインを認識することができなかった。IL-4RおよびIL-13R とのc鎖の同時トランスフェクションは、分有される結合部位の数の増加を引き起こさなかった。これらの結果は、IL-13R およびIL-4R鎖が細胞膜中で互いに相互作用して、IL-13とIL-4とが競合関係になり得る受容体を再構成し得ることを示している。再構成受容体の低い%は、IL-13およびIL-4が競合的に結合する受容体複合体の再構成に必要なCOS細胞中に限定量でもう1つの蛋白質(IL-13R)が存在することに賛同する論拠である。

30

【0077】

c鎖でのトランスフェクション実験で得られた結果は、この蛋白質が以前に示された(15)限定因子ではないことを立証した。この結論は、Caki-1細胞中にcメッセンジャーRNAが存在しないこと(21)によっても支持された。

40

【0078】

再構成受容体の少ない数を説明するもう1つの可能な論拠は、不適当な化学量論の2種の蛋白質が細胞膜中に存在することである。しかしながら、異なる相対量のIL-4RおよびIL-13R を用いた同時トランスフェクションは、再構成受容体の数における大きな相違は示さなかった。IL-4Rと相互作用するより大きな結合能力を有するもう1つのIL-13Rが存在するという可能性が、IL-13R cDNAの単離によってマウス(22)およびヒトで確認された(実施例7を参照されたし)。cの発現が、前

50

記されている(19)のと同様にIL-4の結合性を向上したが、IL-13の結合性は低下させたことは注意すべきであり、このことは、異なる鎖の間の複合体相互作用を示している。

#### 【0079】

実施例6:

可溶性形態の受容体によるIL-13のその膜受容体への結合性の阻害の実験

経時的発現(図13)または安定系統(図14)における結果を説明する。

IL-13R およびIL-13R<sub>s</sub>をコードする2種のcDNA配列を、IL-2 cDNAの代りにベクターp7055に挿入した(33)。得られたプラスミドは、各々、2036および2034と称する。

10

#### 【0080】

a) 経時的発現

CHO細胞を3×10<sup>5</sup>細胞/ウェルで12-ウェルプレートに接種し、翌日、COS細胞についてと同様にDEAE-デキストラン法によって、プラスミド2036もしくは2034、または対照としての空プラスミドpSE-1のいずれかでトランスフェクトした。

該細胞は、プラスミド2034でトランスフェクトした細胞の上清にIL-13R<sub>s</sub>が蓄積され、プラスミド2036でトランスフェクトした細胞の膜中においてIL-13R<sub>s</sub>が良好に発現されるように、3日間培養した。

ついで、IL-13R<sub>s</sub>(2034)または陰性対照(空pSE-1)でトランスフェクトした細胞の上清を回収し、IL-13R<sub>s</sub>でトランスフェクトした細胞を用いてIL-13の結合性の阻害を実験した。

20

IL-13R<sub>s</sub>を発現しているCHO細胞(2036)の表面に対するIL-13の結合性は、放射性リガンドで1.5倍に希釈したこれらの粗製上清の存在下または不存在下で測定し、あるいは過剰量の非-放射性同位元素標識化IL-13(NSB)存在下にて測定した。結合性は、300pMの放射性リガンドを含む最終容量500ml中の全細胞に対して3回行った。

#### 【0081】

b) 安定系統

2種の安定な形質転換CHO系統は、完全IL-13R<sub>s</sub>(380残基のポリペプチド)または可溶性形態のIL-13R<sub>s</sub>(IL-13R<sub>s</sub>、IL-13R<sub>s</sub>の残基1~337に相当する切頭ポリペプチド)のコード配列でのトランスフェクションによって得た。これらの配列をベクターp7055に挿入した。

30

CHO-DHFR<sup>-</sup>細胞をプラスミド2036(IL-13R<sub>s</sub>)および2034(IL-13R<sub>s</sub>)でトランスフェクトし、組換えクローンを以前に記載されている(33)のと同様にして選抜した。

#### 【0082】

細胞当たり2~5×10<sup>5</sup>部位を有する、得られたクローンのうちの1種CHO-IL-13R<sub>s</sub>(CHO2036)をウェル当たり10<sup>5</sup>細胞の密度にて12-ウェルプレートに接種し、2日後に、その細胞をIL-13R<sub>s</sub>存在または不存在下の結合性実験に用いた。

40

それに関しては、CHO-IL-13R<sub>s</sub>(CHO2034)クローンを皿当たり5×10<sup>5</sup>細胞にて6cm皿に3回接種した。培養培地中に3日間蓄積させた後に、CHO2036クローンのIL-13R<sub>s</sub>に対するIL-13結合阻害実験用に培地(皿当たり5ml)を収集した。同様にして、可溶性IL-13R<sub>s</sub>を発現していないCHO細胞の上清を収集した。

#### 【0083】

CHO2036-22クローンの表面のIL-13の結合性は、放射性リガンドで1.5倍に希釈したこれらの粗製上清の存在下または不存在下にて、あるいは過剰量の非-放射性同位元素標識化IL-13(NSB)の存在下にて測定した。結合性は、300pM

50

の放射性リガンドを含む500ml容量中、全細胞に対して3回行った。

【0084】

図13および14の柱状グラフは、IL-13R に対するIL-13の結合性のIL-13R sによる阻害を表す。IL-13のその受容体に対する結合性の阻害は、幾つかのクローンで認めることができた。

【0085】

実施例7

ヒトIL-13R 受容体のクローニング

a) Caki-1細胞のポリA+メッセンジャーRNAからのcDNAライブラリーの調製

[32P]dCTPで標識した一本鎖相補的DNA(得られた相補的DNAは3000dpm/ngの比活性を有する)は、ポリA+メッセンジャーRNA0.5μgで出発し、30μl容量の以下の緩衝液:

0.5mMの各種デオキシヌクレオチド三リン酸、[32P]dCTP 30μCi、およびRNアシン(Promega社製) 30Uを含有する50mM トリス-HCl pH 8.3、6mM MgCl<sub>2</sub>、10mM DTT、40mM KCl中にて、以下の配列(BamHI部位を含む):

5' < GATCCGGGCCCTTTTTTTTTTTT < 3'

を有する合成プライマーを用いて調製した。逆転写酵素RNエースH(Giboco-BRL社製) 200単位と共に37 °Cにて1時間、ついで50 °Cにて10分間、さらに37 °Cにて10分間インキュベートした後に、EDTA 4μlを添加した。ついで、2N NaOH溶液6μlを添加し、65 °Cにて5分間インキュベートすることによって、RNA鋳型を分解した。

【0086】

合成プライマーを除去するために、TE緩衝液中で平衡化したSephacryl S400カラム(Pharmacia社製) 1ml上で相補的DNAを精製した。最初の2つの放射性画分を合し、クロロホルムで抽出した後に、10M酢酸アンモニウム溶液1/10容量およびエタノール2.5容量で沈殿させた。ついで、ターミナルトランスフェラーゼ酵素(Pharmacia社製 27073001) 20単位と共にdGホモポリマー性テイルを添加することによってcDNAを5'において伸長させた。つぎに、以下の組成: 30mM トリス-HCl pH 7.6; 1mM 塩化コバルト; 140mM カコジル酸; 0.1mM DTT; 1mM dGTP; を有する緩衝液20μl中、37 °Cにて15分間インキュベーションを行い、ついで0.5M EDTA 2μlを添加した。水酸化ナトリウムでのさらなる処理を加熱することなく行い、つづいてS400カラム上で再精製し、クロロホルムで抽出し、エタノールで沈殿させた。そのペレットをTE緩衝液33μl中に溶解した。つぎのステージは、PstIで切断した後にホモポリマー性dCテイルが予めそれに加えられているクローニングベクターpT7T3-18、cDNAおよびアダプターを組み合わせることにあつた。cDNA(33μl)を、ベクターpT7/T3-18 75ng(5μl)、以下の配列(ApaI部位を含む):

5' AAAAAAAAAAAGGGCCCG 3'

のアダプター120ng(1μl)、200mM NaCl溶液10μlと接触させ、その混合物を65 °Cにて5分間インキュベートし、ついでその反応物を室温まで放冷させた。つぎのステージは、以下の組成: 50mM トリス-HCl pH 7.5; 10mM MgCl<sub>2</sub>、1mM ATP; を有する緩衝液中、酵素T4ファージDNAリガーゼ(Pharmacia社製) 32.5単位を用いて、反応容量100μl中のクローニングベクターと一本鎖cDNAとを15 °Cにて一晚連結させることにあつた。ついで、フェノールでの抽出につづいてクロロホルムで抽出することによって蛋白質を除去し、ついで10mM酢酸アンモニウム溶液1/10容量およびエタノール2.5容量を添加した。その混合物を遠心分離し、ペレットを以下の組成: 33mM トリス-酢酸 pH 7.9、62.5mM 酢酸カリウム、1mM 酢酸マグネシウムおよび1mM DTT; を有する緩衝液中に

10

20

30

40

50

採取し、酵素 T4 フェージ DNA ポリメラーゼ (Pharmacia 社製) 30 単位および 1 mM の 4 種のデオキシヌクレオチド三リン酸の混合物ならびに T4 フェージ 遺伝子 32 の蛋白質 (Pharmacia 社製) 2 単位を含む 30  $\mu$ l 容量中、37 にて 1 時間、第 2 の cDNA 鎖を合成した。その混合物をフェノールで抽出し、P10 カラム (Biogel P10-200-40 0メッシュ - 参照 15011050 - Biorad 社製) 上に沈殿させることによって痕跡を除去した。

#### 【0087】

最終ステージは、製造業者により推奨されている条件下、2.5 kV で使用する Biorad Gene Pulser 装置を用いた組換え DNA のエレクトロポレーションによって E. coli MC1061 細胞を形質転換し、ついでその細菌を以下の組成：バクトトリプトン 10 g/l；酵母エキストラクト 5 g/l；NaCl 10 g/l；を有する LB 培地中で 1 時間培養することになった。

#### 【0088】

得られた独立クローンの数は、1.5% 寒天 (w/v) および 100  $\mu$ g/ml アンピシリンを補充した LB 培地 (以後、LB 寒天培地と称する) を入れた皿上で 1 時間インキュベーションした後の形質転換体からの 1/1000 希釈液を平板することによって測定した。

得られた独立クローンの数は 1,000,000 であった。

#### 【0089】

##### b) cDNA ライブラリーのスクリーニング

全体ライブラリーを Biodyne A メンブレン (PALL 社製、参照 BNG 132) で被覆した寒天培地 (直径 150 mm のペトリ皿) 上に平板した。37 にて一晩放置した後に、新たなメンブレン上に接触させることによってクローンを転移させた。その新たなメンブレンを、下記の組成の溶液に浸漬させた Wathman 3MM ペーパー上にそれを置くことによって処理した：0.5 N NaOH、1.5 M NaCl、5 分間、ついで 0.5 M トリス-HCl pH 8、1.5 M NaCl、5 分間。以下の緩衝液：10 mM トリス-HCl pH 8、10 mM EDTA、50 mM NaCl、0.1% SDS、100  $\mu$ g/ml プロテインキナーゼ K；中、37 にて 30 分間、プロテインキナーゼ K で処理した後に、そのメンブレンを 2x SSC 緩衝液 (クエン酸ナトリウム - NaCl) で完全に洗浄し、ついで真空下、オープン中、80 にて 20 分間乾燥した。

#### 【0090】

##### c) メンブレンのプレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーション

ついで、そのメンブレンを以下の緩衝液：1 M NaCl；30% ホルムアミド；1% SDS；5x デンハート溶液；100  $\mu$ g/ml サケ精子 DNA；中、42 にて 2 時間プレハイブリダイズさせた。2 時間のプレハイブリダイゼーション後に、そのメンブレンを、2.5x10<sup>6</sup> dpm/ml のニックトランスレーションによって調製した一定濃度のマウス IL-13R プローブを含む同緩衝液中にて 16 時間ハイブリダイズさせた。そのメンブレンを 2x SSC、0.1% SDS 緩衝液中、室温にて 30 分間、2 回洗浄し、ついで同緩衝液中、50 にて 2 時間洗浄した。Kodak X-OMAT フィルム存在下、-80 にて一晩感光させた後に、数個の陽性クローンが検出された。

#### 【0091】

##### d) ヒト IL-13R クローンの配列決定および該配列の分析

配列は、Applied Biosystem 社製キット (参照 401628) を用いて得た。IL-13R cDNA の完全核酸配列およびそれから予想されるアミノ酸配列を図 15 および 16 に示す。cDNA はポリ-A テイルを除く 3999 塩基長であり、2145 塩基の長い非翻訳 3' 領域を有している。

#### 【0092】

典型的なポリアデニル化シグナルが予想された部位に存在している。ヌクレオチド 34 と 1851 との間のオープンリーディングフレームは、427 アミノ酸のポリペプチドを規定する。該配列は、潜在的なシグナルペプチドならびに単一の貫膜ドメインおよび短い細胞質外領域と共に膜蛋白質をコードしている。

10

20

30

40

50

## 【0093】

10箇所の潜在的なグリコシル化部位は、細胞外領域に位置する。サイトカイン受容体のII型ファミリーの特徴と考えられる2種の共通モチーフ：1番目のものはN-末端ジスルフィド架橋ループ構造由来のもので、2番目のものは細胞外領域のC-末端に位置するWSXWS型のモチーフである；も存在することは重要である。

## 【0094】

## 実施例8

ヒトIL-13R cDNAでトランスフェクトしたCOS-3またはCHO細胞に対して行った結合性分析

IL-13R をコードする単離したcDNAでトランスフェクトしたCHO細胞は、  
標識化IL-13に特異的に結合した。飽和曲線のスキッチャード解析は、 $4.5 \pm 0.4$  nMのKd値と26000受容体/細胞の最大結合能力とを有する単一のコンポーネント部位を示した(図19Cおよび19G)。

10

同時発現実験の結果を図19Dおよび19Hに示す。

## 【0095】

図19Cの結果の分析により、CHO細胞のクローン2036においてIL-13Rが良好に発現されていることが示された。IL-4Rは、IL-4RおよびIL-13R cDNAで同時トランスフェクトしたCHO細胞におけるIL-13の結合性の60%を置換した(図19H)が、IL-13R に対する7.5 nMのKdを考慮すると、IL-4R部位よりもIL-13R 部位が10倍も多く存在するようであることは注意し得る。

20

## 【0096】

hIL-13R をコードするcDNAでトランスフェクトしたhIL-4Rを発現しているCHO-hIL4R細胞(ヒトIL-4R)は、標識化IL-13に特異的に結合した。

## 【0097】

飽和曲線のスキッチャード解析は、2種のコンポーネント部位； $23 \pm 8.9$  pMのKd値と28000部位/細胞の最大結合能力とを有する高親和性の1種、および $4.2 \pm 1.4$  nMのKd値と150000部位/細胞の最大結合能力とを有する低親和性のもう1種；を明らかに示した(図19D)。

30

## 【0098】

特徴付けした2番目の部位は、単独で発現させたhIL-13R (ヒトIL-13R)と同一の親和性を有し、非会合IL-13R 鎖に相当した。なぜならば、それらはhIL-4Rよりも多量に発現されていたからである。

## 【0099】

2種のhIL-13R およびhIL-4R鎖存在下にて再構成したこれらの高親和性受容体は、2種のサイトカインを認識することができた(図19Dおよび19H)。このことは、IL-4が全ての結合性IL-13を置換する匹敵量で2種のhIL-13R およびhIL-4R鎖を同時発現しているCOS/pSE1細胞でさえより明らかであった。

40

## 【0100】

組換えヒトIL-13R の親和性は、マウスIL-13R 受容体について記載されているもの(2-10 nM)(参照22)に匹敵した。

以前に記載されたhIL-13R 鎖とは反対に、ヒトIL-13R はそれ自体の上を高親和性結合部位を構成しなかった。

したがって、IL-13R およびIL-4Rは、細胞膜中で相互作用して高親和性受容体を再構成する。

## 【0101】

## 実施例9

hIL-13R およびhIL-4Rを同時発現しているCHO細胞におけるIL-13

50

および I L - 4 による S T A T 蛋白質の活性化

ヒト P B M C 細胞において、h I L - 4 および I L - 1 3 は、後期転写因子である S T A T 6 をリン酸化する J A K (janus) ファミリーの 2 種のチロシンキナーゼ、J a k 1 および J a k 2 を活性化した。この活性化された因子は核に入り、I L - 4 によって調節された遺伝子のプロモーター中の特異的エレメントに結合した。

【 0 1 0 2 】

本発明者らは、電気泳動移動度スイッチアッセイ ( E M S A ) におけるプローブとしてヒト C ープロモーターの C ーエレメントを選択して、S T A T 6 と同様な結合因子の I L - 1 3 による活性化を立証した。

【 0 1 0 3 】

1 0 0 n g / m l I L - 1 3 または I L - 4 で、3 7 °C にて 1 0 分間刺激した、I L - 1 3 R 単独、I L - 4 R 単独、または 2 種の鎖を一緒に発現している C H O 細胞の核抽出物を、放射性同位元素標識化 C ーエレメントと共にインキュベートした。

【 0 1 0 4 】

h I L - 1 3 R および h I L - 4 R を同時発現している細胞の核抽出物は、当該細胞が I L - 4 または I L - 1 3 のいずれで誘導されていようが、E M S A において同一の移動度を有する複合体を形成した ( 図 2 0 を参照されたし ) 。一方、いずれかの鎖を単独で発現している細胞を用いると、複合体は全く検出されなかった。

【 0 1 0 5 】

したがって、h I L - 1 3 R および h I L - 4 R を発現している C H O 細胞においては、I L - 1 3 および I L - 4 が同一のシグナリング経路を始動させる。

【 0 1 0 6 】

参照：

- 1 . Minty , A . らによる Nature , 1993 , 362 , 248-250 .
- 2 . McKenzie , A . N . らによる Proc . Natl . Acad . Sci . U . S . A . , 1993 , 90 , 3735-3739 .
- 3 . Defrance , T . らによる J . Exp . Med . , 1994 , 179 , 135-143 .
- 4 . Punnonen , J . らによる Proc . Natl . Acad . Sci . ( USA ) , 1993 , 90 , 3730-3734 .
- 5 . Fior , R . らによる Eur . Cytokine Network , 1994 , 5 , 593-600 .
- 6 . Muzio , M . R . F . らによる Blood , 1994 , 83 , 1738-1743 .
- 7 . De Waal Malefyt , R . らによる J . Immunol . , 1993 , 151 , 6370-6381 .
- 8 . Doyle , A . らによる Eur . J . Immunol . , 1994 , 24 , 1441-1445 .
- 9 . Montaner , L . J . らによる J . Exp . Med . , 1993 , 178 , 743-747 .
- 1 0 . Sozzani , P . らによる J . Biol . Chem . , 1995 , 270 , 5084-5088 .

【 0 1 0 7 】

- 1 1 . Herbert , J . M . らによる Febs Lett . , 1993 , 328 , 268-270 .
- 1 2 . Derocq , J . M . らによる Febs Lett . , 1994 , 343 , 32-36 .
- 1 3 . Zurawski , G . らによる Immunol . Today , 1994 , 15 , 19-26 .
- 1 4 . Interleukin-13 for Cytokines in Health and Disease .  
D . G . Remick および J . S . Frie 編 , Marcel Decker 社 , N . Y . , 1996 .
- 1 5 . Zurawski , S . M . らによる Embo Journal , 1993 , 12 , 2663-2670 .
- 1 6 . Aversa , G . らによる J . Exp . Med . , 1993 , 178 , 2213-2218 .
- 1 7 . Vita , N . らによる Biol . Chem . , 1995 , 270 , 3512-3517 .
- 1 8 . Lefort , S . らによる Febs Lett . , 1995 , 366 , 122-126 .
- 1 9 . Kondo , M . らによる Science , 1993 , 262 , 1874-1883 .
- 2 0 . Russell , S . M . らによる Science , 1993 , 262 , 1880-1883 .
- 2 1 . Obiri , N . らによる J . Biol . Chem . , 1995 , 270 , 8797-8804 .
- 2 2 . Hilton , D . J . らによる Proc . Natl . Acad . Sci . USA , 1996 , 93 , 497-501 .
- 2 3 . Callard , R . E . らによる Immunology Today , 1996 , 17 , 3108-110 .
- 2 4 . Devereux , J . らによる Nucleic Acids Res . , 1984 , 12 , 387-395 .

10

20

30

40

50

- 25 . Chomczynski , P . らによる *N. Anal. Biochem.* , 1987 , 162 , 156-159 .
- 26 . Caput , D . らによる *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 1986 , 83 , 1670-1674 .
- 27 . Minty , A . らによる *Eur. Cytokine Network* , 1993 , 4 , 99-110 .
- 28 . Labit Le Bouteiller , C . らによる *J. of Immunol. Methods* , 1995 , 181 , 1 , 29-36 .
- 29 . Seed , B . らによる *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 1987 , 84 , 3365-3369 .
- 30 . Bazan , J. F . らによる *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 1990 , 87 , 6934-6938 .
- 31 . Honjo , T . らによる *Current Opinion in Cell Biology* , 1991 , 1 , 201-203 .
- 32 . Giri , J. G . らによる *Embo Journal* , 1993 , 14 , 3654-3663 . 10
- 33 . Miloux , B . らによる *Gene* , 1994 , 149 , 341-344 .
- 34 . Sampayrac , L. M . らによる *PNAS USA* , 1981 , 78 , 7575-7578 .
- 35 . Jiang , S-W らによる *Nucleic Acid Res.* , 1995 , 23 , 3607-3608 .
- 36 . Koehler , I らによる *FEBS Letters* , 1994 , 345 , 187-192 .
- 37 . Seidel , H. M . らによる *PNAS USA* , 1995 , 92 , 3041-3045 .
- 【図面の簡単な説明】
- 【0108】
- 【図1】 C a k i - 1 細胞中に存在するヒト I L - 1 3 R 受容体の特徴付けを示す。 [ 1 2 5 I ] で標識した I L - 1 3 の飽和曲線のスキッチャード解析 ( 挿入図 ) 。
- 【図2】 C a k i - 1 細胞中に存在するヒト I L - 1 3 R 受容体の特徴付けを示す。上昇してゆく濃度の非標識 I L - 1 3 ( ・ ) および I L - 4 ( ) 存在下における [ 1 2 5 I ] [ Phe43 ] - I L - 1 3 - GlyTyrGlyTyr の結合性。 20
- 【図3】 C a k i - 1 細胞中に存在するヒト I L - 1 3 R 受容体の特徴付けを示す。非標識 I L - 1 3 不存在下 ( レーン a ) 、 および 1 0 0 倍過剰量の非 I L - 1 3 ( レーン b ) または I L - 4 ( レーン c ) 存在下にて放射性 I L - 1 3 を用いた交差-連結実験。
- 【図4】 C a k i - 1 細胞中に存在するヒト I L - 1 3 R 受容体の特徴付けを示す。 I L - 4 R 鎖に対して特異的なモノクローナル抗体および I L - 4 アンタゴニスト Y 1 2 4 D I L - 4 存在下における、 I L - 1 3 および I L - 4 によって誘導される I L - 6 の分泌の阻害。
- 【図5】 I L - 1 3 R の c D N A のヌクレオチド配列を示す。 I L - 1 3 R の c D N A のヌクレオチド配列。核酸配列の予想シグナルペプチドに相当するアミノ酸はイタリックで示し、貫膜ドメインに相当するアミノ酸は太字で示す。潜在的な N - グリコシル化部位 ( Asn-X-Ser/Thr ) には下線を引いている。 30
- 【図6】 I L - 1 3 R の c D N A のヌクレオチド配列を示す。 I L - 1 3 R の c D N A のヌクレオチド配列。核酸配列の予想シグナルペプチドに相当するアミノ酸はイタリックで示し、貫膜ドメインに相当するアミノ酸は太字で示す。潜在的な N - グリコシル化部位 ( Asn-X-Ser/Thr ) には下線を引いている。
- 【図7】 I L - 5 R および I L - 1 3 R の蛋白質配列の比較を示す。 I L - 1 3 R および I L - 5 R 配列のアミノ酸の整列を示す。 I L - 1 3 R および I L - 5 R の蛋白質配列を前記 ( 2 4 ) と同様に整列させている。受容体のこのファミリーに特徴的なシステイン残基および W S X W S モチーフは四角で囲んでいる。 40
- 【図8】 I L - 1 3 R m R N A の発現パターンを示す。 R N A は以下の細胞から調製した : C a k i - 1 ( レーン a ) 、 A 4 3 1 ( レーン b ) 、 T F - 1 ( レーン c ) 、 U 9 3 7 ( レーン d ) 、 J u r k a t ( レーン e ) および I M 9 ( レーン f ) 。
- 【図9】 I L - 1 3 についての組換え I L - 1 3 R 受容体の特徴付けを示す。 C O S - 7 細胞を I L - 1 3 R c D N A でトランスフェクトし、飽和曲線のスキッチャード解析による放射性同位元素標識化 I L - 1 3 の結合性に関する実験 ( 挿入図 ) 。
- 【図10】 I L - 1 3 についての組換え I L - 1 3 R 受容体の特徴付けを示す。 C O S - 7 細胞を I L - 1 3 R c D N A でトランスフェクトし、不存在 ( レーン a ) 、 および 1 0 0 倍過剰量の非標識 I L - 1 3 存在 ( レーン b ) 下にて放射性同位元素標識化 I L 50

- 13を用いた交差-連結実験。

【図11】クローン化IL-13R、IL-4R(gp140)およびc鎖を用いた同時トランスフェクション実験につづく放射性同位元素標識化IL-13の結合性を示す。斜線棒グラフおよび白抜き棒グラフは、IL-13の特異的結合性を表す。

【図12】クローン化IL-13R、IL-4R(gp140)およびc鎖を用いた同時トランスフェクション実験につづく放射性同位元素標識化IL-4の結合性を示す。斜線棒グラフおよび白抜き棒グラフは、IL-4の特異的結合性を表す。

【図13】経時発現の可溶性形態の受容体(IL-13R<sub>s</sub>)によるIL-13のIL-13Rへの結合性の阻害。2034でトランスフェクトした細胞上清中のIL-13R<sub>s</sub>の発現を、IL-13R(2036)でトランスフェクトした細胞に対するIL-13の結合性の阻害によって試験したグラフを示す。該上清は、ヨウ素化リガンド中でそれを1.5倍に希釈することによって粗製状態で試験した。2036NSB:過剰量  
10  
の非標識IL-13存在下における非特異的結合性。2036BT:2036でトランスフェクトした細胞に対する合計結合性。2036+sgt2034:2034でトランスフェクトした細胞の上清存在下における、2036でトランスフェクトした細胞に対する結合性。2036+sgt pSE1:対照

【図14】安定系統上の可溶性形態の受容体(IL-13R<sub>s</sub>)によるIL-13のIL-13Rへの結合性の阻害を示す。T2036-22:IL-13R<sub>s</sub>を分泌するクローン上清不存在下における、IL-13R(2036-22)に対する合計結合性(参照100%)  
20  
2034-4 2034-6 2034-19

4種のクローン IL-13R<sub>s</sub> 2034-21 1274-20:IL-13R<sub>s</sub>を発現していないCHO細胞の上清存在下(対照)。

【図15】IL-13R cDNAのヌクレオチド配列を示す。IL-13R cDNAのヌクレオチド配列。核酸配列から予想されるシグナルペプチドに相当するアミノ酸には点線の下線が引かれており、貫膜ドメインに相当するアミノ酸には二重線の下線が引かれている。潜在的なN-グリコシル化部位(Asn-X-Ser/Thr)は四角で囲んでいる。

【図16】IL-13R cDNAのヌクレオチド配列を示す。IL-13R cDNAのヌクレオチド配列。核酸配列から予想されるシグナルペプチドに相当するアミノ酸には点線の下線が引かれており、貫膜ドメインに相当するアミノ酸には二重線の下線が引かれている。潜在的なN-グリコシル化部位(Asn-X-Ser/Thr)は四角で囲んでいる。  
30

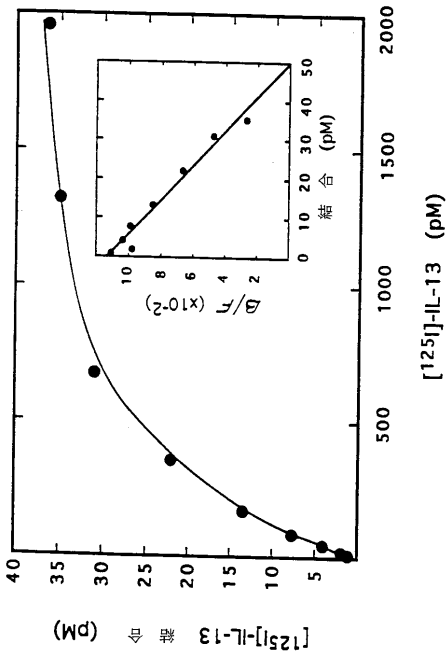
【図17】ヒトIL-13Rおよびげっ歯類IL-13Rのアミノ酸の整列を示す。ヒトIL-13Rおよびげっ歯類IL-13Rの蛋白質配列を前記(24)と同様に整列している。受容体のこのファミリーに特徴的なシステイン残基およびモチーフWSXWSは四角で囲んでいる。

【図18】IL-13についての組換えIL-13R受容体の特徴付けを示す。CHOまたはCOS-3細胞をIL-13Rおよび/またはIL-4R cDNAでトランスフェクトし:IL-13R cDNAでトランスフェクトした(図AおよびE)、IL-13R cDNAおよびIL-4R cDNAでトランスフェクトした(図BおよびF)CHO細胞を用いた飽和曲線のスキッチャード解析および該CHO細胞に対する[125I]-IL-13の結合性の競合実験。白抜きおよび斜線棒グラフは、各々、過剰量(1,000倍多い)のIL-13またはIL-4存在下の放射性同位元素標識化IL-13の特異的結合性を表し、黒塗り棒グラフは合計結合性を表している。  
40

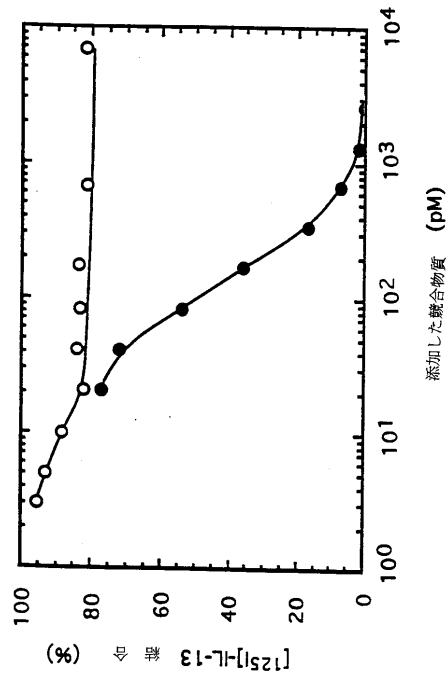
【図19】IL-13についての組換えIL-13R受容体の特徴付けを示す。CHOまたはCOS-3細胞をIL-13Rおよび/またはIL-4R cDNAでトランスフェクトし:IL-13R cDNAでトランスフェクトした(図CおよびG)、およびIL-13R cDNAおよびIL-4R cDNAでトランスフェクトした(図DおよびH)CHO細胞を用いた飽和曲線のスキッチャード解析および該CHO細胞に対する[125I]-IL-13の結合性の競合実験。白抜きおよび斜線棒グラフは、各々、過剰量(1,000倍多い)のIL-13またはIL-4存在下の放射性同位元素標識化IL-13の特異的結合性を表し、黒塗り棒グラフは合計結合性を表している。  
50

【図20】IL-4RまたはIL-13存在下にてCHO細胞を活性化した後の(4または13)IL-4単独に対する受容体を(CHO-4)、IL-13R単独に対する受容体を(CHO-13)、または結合受容体IL-13RおよびIL-4Rを(CHO-4-13)発現している細胞抽出物のEMSAにおける電気泳動移動度の比較。cは非活性化対照を表している。

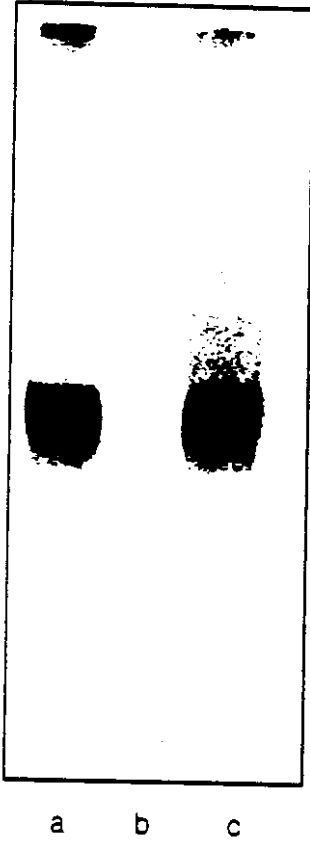
【図1】



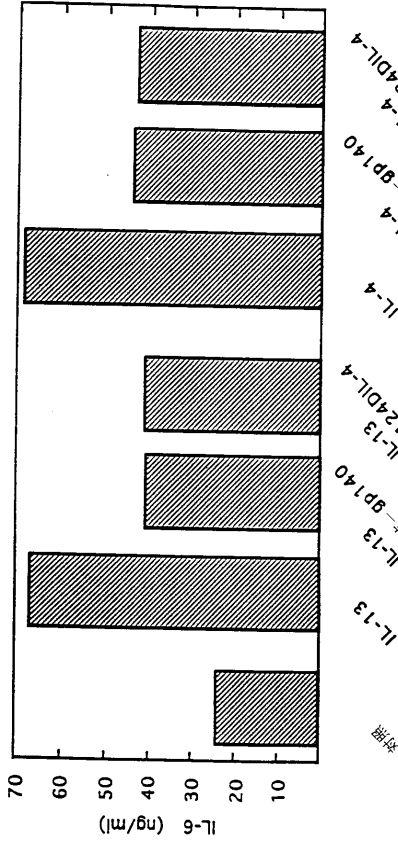
【図2】



【 3 】



【 4 】



【 5 】

1 1 GGTGCTCTCGGGGGAGAGGCAATATCAAGGTTTAAATCTCGGAATGCGCT 58  
 2 MetAla  
 59 TTCGTTTGCTTGGCTATCGGATGCTTATACCTTCTGATACGACACAACTTGGCTGT 118  
 3 PheValCysLeuAlaIleGlyCysLeuTyrThrPheLeuIleSerThrThrPheGlyCys 22  
 119 ACTTCATCTCAGACACCGGAGATAAAGTTAACCCCTCCTCAGGATTTGAGATGTTGAT 178  
 23 ThrSerSerSerThrGluIleValAsnProGlnAspPheGluIleValAsp 42  
 179 CCGGATACTAGGTTATCTTCAATTCGCAATGGCAACCCCACTGCTCTCGATCATTTT 238  
 43 ProGlyTyrLeuGlyTyrLeuTyrLeuGlnTrpGlnProLeuSerLeuAspHisPhe 62  
 239 AAGGAATGCACAGTGGAAATGACTAAATACCAACCAATTCGTAAGCAAG 298  
 63 LysGluCysThrValGluTyrGluLeuLysTyrArgAsnIleGlySerGluThrTrpLys 82  
 289 ACGATCAATTAAGCAATCTACATCAAAAGATGGTTTGATCTTAACAGCCCAATTGAA 358  
 83 ThrIleIleThrLysAsnLeuHisTyrLysAspGlyPheAspLeuAsnLysGlyIleGlu 102  
 359 GCGAAGATACACACCCCTTTACCAATGGCAATGCAAAATGGATCAGAAGTTCAAAGTTC 418  
 103 AlaLysIleHisThrLeuLeuProTrpGlnCysThrAsnGlySerGluValGlnSerSer 122  
 419 TGGCAGAACTACTTATGGATATCACCAAGCAATTCAGAACTAAAGTTCAGAT 478  
 123 TrpAlaGluThrThrTyrTrpIleSerProGlnGlyIleProGluThrLysValGlnAsp 142  
 479 ATGGATTGGCTATACAAATGGCAATATTACTCTCTTCTGGAACTGGCATAGGT 538  
 143 MetAspCysValTyrTyrAsnTrpGlnTyrLeuLeuCysSerTrpLysProGlyIleGly 162  
 539 GTACTCTTGATACCAATACAACTTGTTTACTGGTATGAGCGCTTGGATCATGATTA 598  
 163 ValLeuLeuAspThrAsnTyrAsnLeuPheTyrTrpTyrGluGlyLeuAspHisAlaLeu 182  
 599 CAGTGTCTTACTATCAAGCTGATGGCAAAATAGATGAGATTCAGATTCCTATTGG 658  
 183 GlnCysValAspTyrIleLysAlaAspGlyGluAsnIleGlyCysArgPheProTyrLeu 202

【 6 】

659 GAGGATCAGACTAAGNTTCTATTTGTTGTTATGATCATCAGAAACAACGCT 718  
 203 GluAlaSerAspTyrLysPheTyrIleCysValAsnGlySerSerGluAsnLysPro 222  
 719 ATCAGATCCAGTATTTCACCTTTACGCTTCAAAATATAGTTAAACCTTTGCCCGCAGTC 778  
 223 IleArgSerSerTyrPheThrPheGlnLeuGlnAsnIleValLysProLeuProVal 242  
 779 TATCTTACTTTTACTCGGAGGTTCTAGTGAAATTAAGCTGAAATGGACATACCTTTG 838  
 243 TyrLeuThrPheThrArgGluSerSerCysGluIleLysLeuLysTrpSerIleProLeu 262  
 839 GGACCTATCCAGCAGGTTTGTATTAAGAAATGAGATCAGAAAGATGACTACC 898  
 263 GlyProIleProAlaArgCysPheAspTyrGluIleGluIleArgGluAspAspThrThr 282  
 899 TTGGTACTGCTACAGTTGAAATGAAACATACACCTTGAACCAACAAATGAAACCCGA 958  
 283 LeuValThrAlaThrValGluAsnGlnThrTyrThrLeuLysThrAsnGlnThrArg 302  
 959 CAATATGCTTTGTAGTAGAAGCAAGTGAATATTTATGCTCAGATGACGGAATTTGG 1018  
 303 GlnLeuCysPheValValAlaArgSerLysValAsnIleTyrCysSerAspAspGlyIleTrp 322  
 1019 AGTCAGTGGATGATAACAATCTGGAGGAGTGAACCTATCGAAGAACTTCTGTA 1078  
 323 SerGluTrpSerAspLysSerCysTrpGluIleGluAspLeuSerLysThrLeuLeu 342  
 1079 CCGTTCTGGCTACCAATGGTTTCATCTTAATATAGTATATTTGTAACCGGCTCGCTT 1138  
 343 ArgPheTrpLeuProPheIleLeuLeuValIlePheValThrGlyLeuLeu 362  
 1139 TTGGTAAACCAACACTCCCAAAATGATCCAGAAATTTTCTGTATACATGAAGA 1198  
 363 LeuArgLysProAsnThrTyrProLysMetIleProGluPhePheCysAspThr 381  
 1199 CTTTCCATATCAGAGCATGGTTTACTCAACAGTTCACAGTTCAGTCATGGCCAAATGTCA 1258  
 1259 ARIAGTCTCATTAACATGAAATTTTCTGGCAATGTTG 1298

【 図 7 】

```

IL13R  MAFVCLAIGCLYTFLEISTFGCTSSSDTEIKVNPQDFEIVDPGLVLY 50
IL5R   ..MIIARVLLILLGATELQADLLPDEKISLLPPVNFIIKVTG.LAQVL 47

IL13R  LQWQPPLSLDHFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIIITKNLHYKDGFDLNGK 100
IL5R   LQWKPNPDQEQ.RVNWLEYQVKINAPKEDDYETRITES...KCVTILHKG 93

IL13R  IEAKIHTLLPWQCTNGSEVQSSWAETTYMSPQGIPEKVDMDIV.... 146
IL5R   FSASVRTILQ...NDHSLASSWASAE.LHAPPGSPGTSIVNLTITNTT 139

IL13R  ..YYNWQ...YLLCSWKPGIGVLLDTNVLNLFYWYEGLDHALQIVDYIK 189
IL5R   EDNYSRLRSYQVSLH...LWLVGTDAPEDTQVFLYRYGSWTE...EQQEYSK 187

IL13R  AD.GQNIIGRFP...YLEASDYKDFYICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNI 236
IL5R   DTLGRNIA...QWFRFIFILSKGRDWLSVLVNGSSKHSAIRPFDQLFALHA 237

IL13R  KPLPPVYLTFRESSCEIKLKWSTPLGPIPARCFDYEIEIREDDTTLVTA 286
IL5R   QINPPLNVTAEIEGT.RLSIQWEKPVSAFFIHCDFYEVKIHNRNGYLQI 286

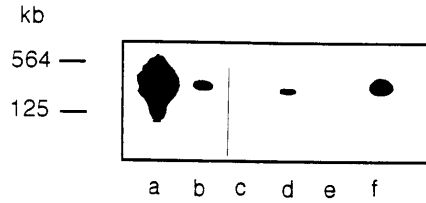
IL13R  TVENETYLLKTTNETRQLCFVVRSKVNIYCSDDGINSWEDKQCWEGEDL 336
IL5R   EKLMTNAFISIIDDLSKYDVQVRAAVSSMCREAGLNSWESQ.PIYVGNDE 335

IL13R  SKKTLRLRPWLPFGFILLVIVFTGLLLRKPNTYPMIP.....EF 376
IL5R   HKPLREWFVIVIMATICFILLILSLICKICHLWIKLFPPIPAKSNIKDL 385

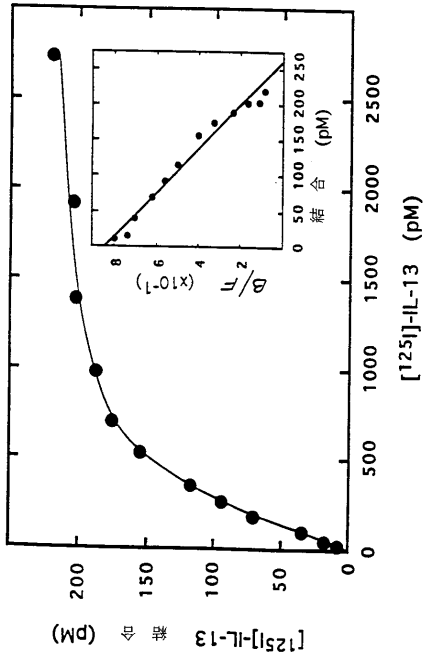
IL13R  FCDT..... 380
IL5R   FVTNVEKAGSSETEIEVICYIEKPGVETLEDSVF 420

```

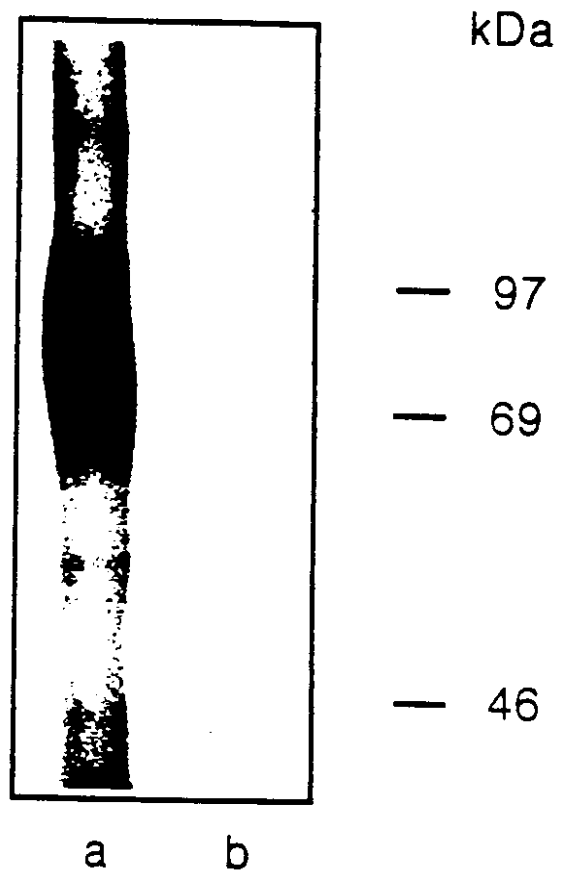
【 図 8 】



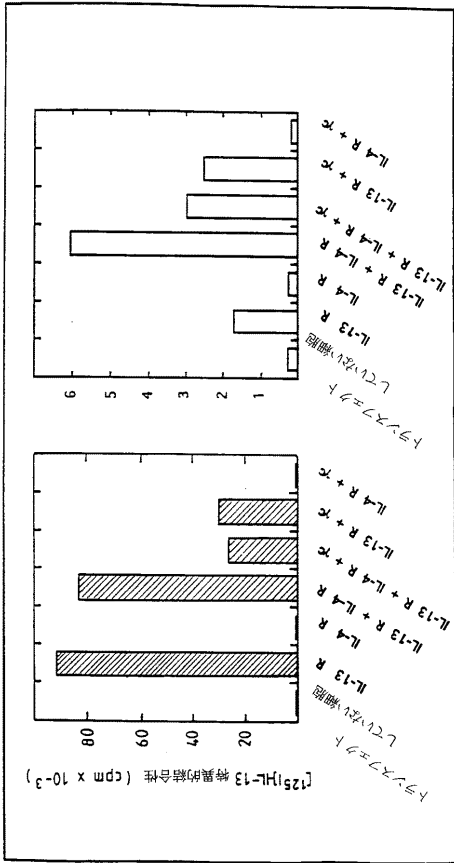
【 図 9 】



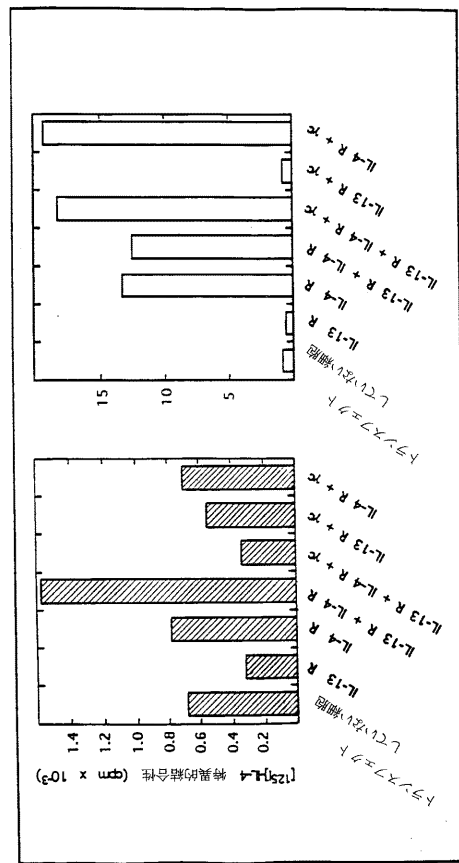
【 図 10 】



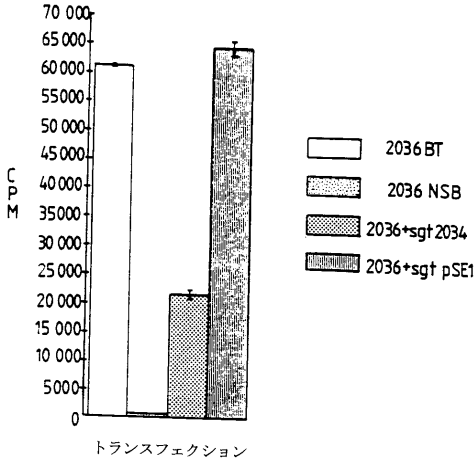
【 図 1 1 】



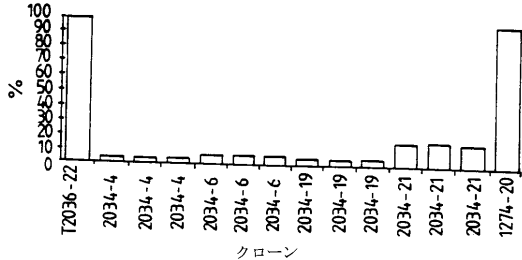
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 図 1 5 】

```

1 TCAGCCCGCCGGGCTCCGAGGCGAGAGGCTGCATGGAGTGGCGGGCGGGCTCTCGGGG 60
-10 M E W P A R L L C E
61 CTGTGGGCGCTGCTGCTCTGCGCCGGCGGGGGCGGGGGCGGGGGCGGGGGCGGGGGCTACG 9
10 L W A L L L C A G G G G G G G G A A P T 29
121 GAACTCAGCCACCTGTGACAAATTTGAGTGTCTCTGTTGAAAACCTTCGCACAGTAATA 180
30 E T Q P P V T N L S V I S V E N L C T V I 49
181 TGGACATGGAATCCACCCGAGGGAGCCAGCTCAAATTTGAGTGTCTGAGTATTTAGTCAT 240
50 W T W N P P E G A S S N C S L W Y F S H 69
241 TTTGGCGCAAAACAAGATAAGAAAATAGCTCCGGAACCTCGTCTCAATAGAAGTACCC 300
70 F G D K Q D K K I A P E T R R S I E V P 89
301 CEGATGAGAGGATTTGTCSCAAGTGGGGTCCAGTGTAGCACCAATGAGAGTGAGAAG 360
90 L W E R I C L Q V G S Q C S T N E S E K 109
361 CCTAGCATTGGTTGAAAATGACATCTCACCCCGAAGGTGATCCCTGAGTCTGCTGTG 129
110 P S I I V E F E I S P F E H I P F R A V 129
421 ACTGAGCTTCAATGATTTGSCACAACTGAGCTAGATGAAGTGTCTTGGCTCCCTGGA 480
130 T E L Q C I W H N L S Y M K C S W L P G 149
481 AGGAATACCAGTCCCGACACTACTTACTTACTTACTTGGCAGAGACCTGGA AAA 540
150 R N T S P D T N Y T Y Y W H R S L E K 159
541 ATTCATCAATGTA AAAACTCTTTAGAGAAGGCCAATCTTTGGTGTTCCTTTGATCTG 600
170 I H Q C E N I F R E G Q Y F G C S F D L 189
601 ACCAAGTGAAGGATTCAGTTTGAACAACAGTGTCCAAATAATGGTCAAGGATAAT 660
190 T K V K D S S F E Q H S V Q I M V K D N 209
661 GCAGGAAAAATAAACCATCTTCAATATAGTGCCTTAACTTCCCGTGTGAAACCTGAT 720
210 A G K I K P S F N I V P L T S R V K P D 229
721 CCTCCACATATTA AAAACCTCTCTCCACAATGATGACCTATATGTGCAATGGGAGAAT 780
230 P P H I K N L S F H N D D L Y V Q W E N 249
781 CCACAGAAATTTATAGCAGATGCCTATTTTGAAGTGAAGATCAATAACAGCCAAACT 840
250 P Q N F I S R C L F Y E V E V N N S Q T 269
841 GAGACACATAATGTTTCTACGTCCAAGAGGCTAAATGTGAGAATCCAGAAATTTGAGAGA 900
270 E T H N V F Y V Q E A K C E N P E F E R 289
901 AATGTGAGAAATACATCTTGTTCATGTCCTCGGTGTTCTTCTGATACTTTGACACAA 960
290 N V E H T S F M V P G V L P D T L N T 309
961 GTCAGAAATAGAGTCAAAAATAAGTTATGCTATGAGGATGACAAACTCTGGAGTAAT 1020
310 V R I R V R T N K L C Y E D D K L W S N 329
1021 TGGAGCAAGAAATGAGTATAGGTAGAAGCCAAATCCACACTTACATAACCATGTTA 1080
330 W S Q E M S I G K K R N S T Q V I T M L 349
1081 CTCATTGTCCAGTCACTGCGCAGGTGCAATCATAGTACTCTGCTTACCTAAAAGG 1140
350 L I V P V E I V A G A I I V L L L Y L K R 369
1141 CTCAGATATATATTCCTCCAAATTCCTGATCTCGGAGAGATTTTAAAGAAATGTTT 1200
370 L K I I I F P P I P D P G K I F K E M P 389
1201 GGAGACCAGAAATGATGACTCTGCACTGGAAGAAGTACGACATCTAGAGAAGCAAAC 1260
390 G D Q N D D T L H W K K Y D I Y E K Q T 409
1261 AAGGAGAAACCGACTCTGTAGTGTGATAGAAAACCTGAAGAAAGCTCTCAGTGTGG 1320
410 K E E T D S V V L I E N L K K A S Q * 429

```

【 16 】

```

1381 TATCTGGGAACCTAATTAATGSAACCTGAACTACTGCACCATTAAAAACAGGCAGCTC 1440
1441 AFAAGAGCCACAGCTCTTATGTTGAGTCCGCCACCGAAAAAATAAATGAGCGCTC 1500
1501 TTGGAGAAGAGTCTGGAGCTATGCAATGAAATTATAAAAGCCAGAGGCTTCAAACTG 1560
1561 GGGACAAGCAAAAAGTATGATAGTGGAGTTTAACTCAATCAAGAGTGTGACAACCT 1620
1621 TCCTGAGGGATCTACTTGGCTTGTGTTCTTTGGTCAACATGACAAATTTATTTT 1680
1681 AGGGGAACCTATTTGGGGTGCAAATCCAAATGCAAACTTGAAGTCAAAAGACATGAG 1740
1741 AAAACAAAATGGATAAAATCTGATATGTAATTTTGGGAGCTTAAACCACTGTTTGTG 1800
1801 GCTATTAACACTCTTTTAAACAGCTGGGGTGGGTCGCGTGGCTCACGCCCTGTAATCC 1860
1861 CAATTTGGAGTCCGAGGGCGGGGATCACTCGAGGTCCAGGAGTCCAGCAGCAGCTGAC 1920
1921 CAAAATGGTGAACCTCTCTCTACTAAACTCAAAAAATAAAGTGGGTGGTGGCGCG 1980
1981 TGCCGTAAATCCAGCTACTCGGGAGCTGAGGAGGTAATGTTTGAACCTGGGAGGT 2040
2041 GGAGGTTGCACTGACAGAGATCACACCCTGACCTAGCCCTGGGTGACAGAGCAAGC 2100
2101 TCTGTCTAAAAAACAACAAACAAACAAACAAACAAACAAACCTCTTAATATCTGGAGT 2160
2161 CATCATTCCTTCGACAGCAATTCCTCTTGTCTTAAAGCCCGAAGAAATGATGTTTGG 2220
2221 ATGATGACAACTACAGAAAAACAGAGGAGCTCTTTCGCAAGACCTTCAAAGCCATT 2280
2341 AAGTCTCAACAATGATTTTCTTCACTCTGACTCAAGTAGCATTACTGTGCTTT 2400
2401 GGTFTGTGCTAGGCCCGGGGTGTGAAGCAGACAGCCCTCCAGGGGTTACAGTCTAT 2460
2461 TGAGACTCCTCAGTCTTGGCACTTTTTTTTAAATCTCCACCAGTCAATTTTCAGACT 2520
2521 TTTAACTCCTCAATCCAACACTGATTTCCCTTTTGGATTCTCCCTCTCCCTCTCT 2580
2581 GTAGCCTTTGACTTTCATGGAAATTAGGATGTAATCTGCTCAGGAGACTGGAGGAG 2640
2641 CAGAGGATATAGCATCTCAGTCTTAACTGTGATATCTGAGAACAATGACTAAATCT 2700
2701 TGCAATTTTGTAACTTCCATGTGAGGTTTCCAGCATTGATATTTGTGCATTTCTTAA 2760
2761 CAGAGATGAGGTGGTATCTCAGCTAGACATGGTATTCCTGTGAGAAAAAGAAATG 2820
2821 TTGAACCTATTTCTCTCTTTTACAGATGGGTCCAGGATTCCTCTTCTGCAAT 2880
2881 ATGATTAATAAATAGCTTTTGTGCTTACATGGTAGCCAGCCAGCCAGGCTCTGTT 2940
2941 ATGCTTTTGGGGGCAATATTTGGTTCATTTCCACTATCCACAACATATCCOTAT 3000
3001 ATATCCCTCTACTCTACTTCTCCCAAAATTTAAGAAATGAGGAAATGAGAGGCAAT 3060
3061 CCCCACCCCAATTTCTCTCTCACACAGACTATATTAATGTTAGGAACTTGAGACT 3120
3121 TTATTTCCAAATTTGTTCAAACATTTACCAATCATATTAATCAATGATGCTATTTGCA 3180
3181 TCTGCTCTAGGGGAGGGAGATAGAAACCTCCTCTCAGGTTTGGGTACAAAT 3240
3241 GGCACCTGCTTCCATGGCCGTGAGAGCATGGTCCCTGGCTTCTGAGGAAAGCTGG 3300
3301 GGTTATGACAAATGGCAGATGTAAGTATTTCTTGAAGTCAGATTGAGGCTGGGAGCAG 3360
3361 CCGTAGTAGATGTTCTACTTTGTCTGCTGCTCTAGAAAGAAATTTGGTTTCTGCT 3420
3421 ATGGAATGAGATTTTCTTCCAGGATTTTATAATTTCTGGAAGCAAAACCCATGC 3480
3481 CTCCTCAGGCAATTTACTGTTATCTTATAGATGGCCATGAAGAGGATGCTGTGAA 3540
3541 ATCCCAACAACAATGATGCTGACATGATGCTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGTCT 3600
3601 GTTCCATCTCTTCTTTAGCATAAATAGCTGAGGAAAGGGAGGAAAGGAAAT 3660
3661 FATGGGAATACCTGGGTGGTGTGATGCTTCCCTGGGAGCTTGGAGGTGCTGT 3720
3721 ATCAGTGGATTTCCCTCCCTGGGAAATAGTAGGCTCAATTAAGTGTGTTAGGTTCT 3780
3781 GCCTATGTGGATTTTCTCAACTACTAAGCAAAACCCAGTGTGACAGATGTAATCT 3840
3841 ATCTTCTGTTCAAGTAAATTTTCCCTTCACTGGGCACTGAAGGATATGTAAGAAA 3900
3901 TGTTAAACTTTTGGTAGTCTCAACAGGAGATGTTTCTGTTTAACTCTTATAGAAA 3960
3961 GCTTGAGTAAAAAATATGCTCTTTGATGTCACCAAAAAA 4009

```

【 17 】

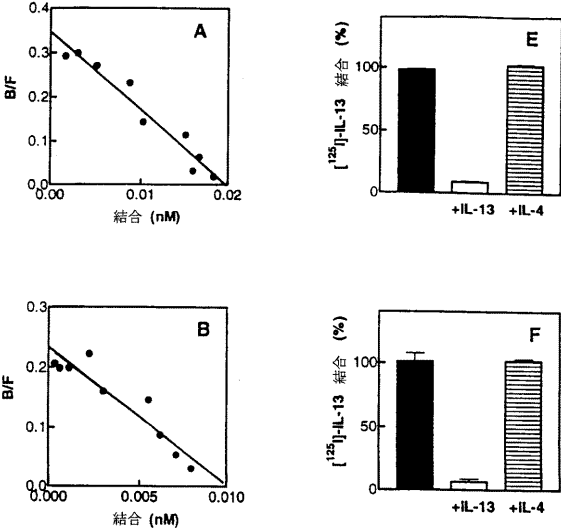
IL-13α ヒト  
IL-13α マウス

```

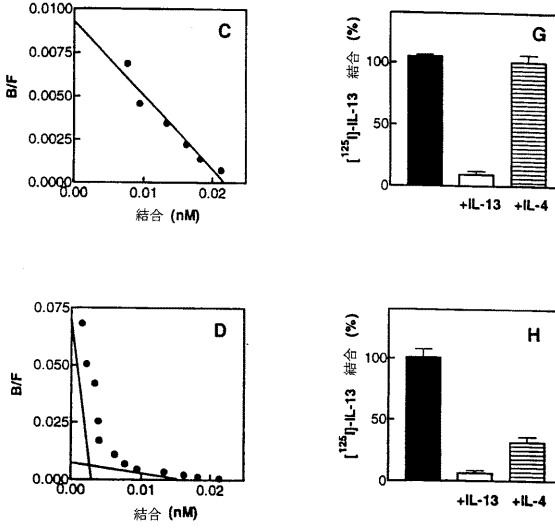
1 MEWPARLCLGLWLLLCAGGGGGGGAAPTETQPPVTLNLSVSVENLCTIVW 50
1 MARPALLGELLVLLL..WTATVGVQVAATEVQPPVTLNLSVSVENLCTIIV 48
51 TWNPPEGASNSLSLWYTFSHFGKDKKQKDIAPETRRSIEVPLNERICLQVGS 100
49 TWSPPEGASPNCTLRVTFSHFDQDKKIAPEHTRKEELPLDEKICLQVGS 98
101 QCSTNESEKPSILVEKCI SPPEGDPEAVTELQIWHNLSYMKQSWLPGR 150
99 QCSANESEKPSPLVKKCISPPEGDPESAVTELKQIWHNLSYMKQSWLPGR 148
151 NTSPTNNTLYYWHRSLEKIHQENIFREGQVFCFSFDLTKVKDSSFEQH 200
149 NTSPTDHYVTLVYWSLSEKSRQENIYREGQVHICFSFKLTKV..EPSFEHQ 197
201 SVQIMVKDNAGKIKPSFNIVPLTSRVKPDPPHKLKLSFHNDLLYVQWENP 250
198 NVQIMVKDNAGKIRPCKIVSLTSVVKPDPPIKHLKLLKNGALLVQWKNP 247
251 QNFISRCLFYEVEVNSQTFETHNVFYVQEAKECENPEFERNVENTSCFMVP 300
248 QNFRSRCLTYEVEVNTQTDHRNILEVEEDKQNSSEDRNMEGTSCFQLP 297
301 GVLPDFLNTVIRVRKTNKLCYEDDKLWNSNSQEMSIGKRNSTLYITMLL 350
298 GVLDVAVTVRVRKTNKLCFDNKLMSDMSQAQSIGKEQNSTFYITMLL 347
351 IVPVIVAGAIIVLLLYLKLKIIIFPPIPDGKIFKEMFGDQNDLTLHWK 400
348 TIPVFAVAVIILLFLYLLKLIIFPPIPDGKIFKEMFGDQNDLTLHWK 397
401 KYDIYEKQTKKEETDSVVLLENLKRASQ 427
398 KYDIYEKQSKKEETDSVVLLENLKAAP 424

```

【 18 】



【 19 】



【 20 】

CHO CHO-4 CHO-13 CHO-4-13  
4 13 4 13 c 4 13 c 4 13 c



【配列表】

2005323595000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/18	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 15/09	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 P 21/02	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	C 1 2 N 15/00	A
	A 6 1 K 37/02	

(72)発明者 パスクアル・フェララ

フランス、エフ - 3 1 2 9 0 アヴィニョレ - ロラゲ、リブイーユ・サン - アシスクル

(72)発明者 パトリック・ロラン

フランス、エフ - 3 1 1 9 0 オテリーヴ、"クロシェート"、シュマン・カルモンテ

(72)発明者 ナタリオ・ヴィータ

フランス、エフ - 3 1 4 5 0 モンジスカール、シュマン・アル - セール4 5 ビス番

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA41 BA61 BA63 CA04 CA09 CA11 CA20 DA02  
 DA06 EA04 GA11 HA01 HA14  
 4B063 QA01 QA06 QA13 QA18 QA19 QQ08 QQ13 QQ43 QQ53 QQ79  
 QR32 QR36 QR48 QR55 QR62 QS25 QS34 QX02  
 4B064 AG03 AG20 CA02 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13  
 4C084 AA02 AA06 AA13 BA01 BA22 CA27 CA56 DA12 DA46 NA01  
 NA14 ZB011 ZB021 ZB261 ZB331 ZC021  
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA02 DA51 DA75 DA76 EA20  
 EA50 FA74

专利名称(译)	IL-13受体多肽		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005323595A</a>	公开(公告)日	2005-11-24
申请号	JP2005135217	申请日	2005-05-06
[标]申请(专利权)人(译)	赛诺菲		
申请(专利权)人(译)	赛诺菲 - 安万特		
[标]发明人	ダニエルカピユ パスクアルフェラ パトリックロラン ナタリオヴィータ		
发明人	ダニエル・カピユ パスクアル・フェララ パトリック・ロラン ナタリオ・ヴィータ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/00 A61K31/70 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P29/00 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/715 C07K16 /18 C07K16/28 C12N5/10 C12N15/00 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 C12R1/91 G01N33/566		
CPC分类号	A61K38/00 A61P29/00 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/08 A61P43/00 C07K14 /7155		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A A61P31/12 A61P35/00 A61P37/00 A61P43/00.111 C07K16/18 C12P21/02.C C12Q1 /02 G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.A A61K37/02 A61K38/00 A61K38/16 A61K38 /17 A61K38/20 C12N15/00.AZN.A C12P21/08 C12Q1/68.A C12Q1/68.AZN.A G01N33/50.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/BA61 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024 /CA11 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA06 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063 /QQ43 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG03 4B064/AG20 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064 /CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/CA27 4C084/CA56 4C084/DA12 4C084/DA46 4C084/NA01 4C084/NA14 4C084 /ZB011 4C084/ZB021 4C084/ZB261 4C084/ZB331 4C084/ZC021 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045 /AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA02 4H045/DA51 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 2G045/AA35 2G045/CB02 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045 /FB03		
代理人(译)	矢野正树		
优先权	1995014424 1995-12-06 FR		
其他公开文献	JP4185070B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

为了在医学水平上分开和分别控制IL-4和IL-13 (白介素13) 的调节作用, 特别是这两种细胞因子中的任一种所产生的作用。能够产生该多肽的IL-13受体多肽及其产生方法。 SOLUTION: 它能够与IL-13特异性结合的特定序列的片段组成, 和/或在细胞膜水平上参与IL-13特异性产生的信号的转导, 并且能够对被对特定序列的多肽特异的抗体识别和/或引发识别特定序列的多肽的抗体的纯化的多肽。 [选择图]无

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 P 31/12	4 B O 6 3
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 35/00	4 B O 6 4
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 37/00	4 C O 8 4
A 6 1 P 37/00	A 6 1 P 43/00 I 1 1	4 H O 4 5
	審査請求 有 請求項の数 38 O L	(全 32 頁) 最終

(21) 出願番号	特願2005-135217 (P2005-135217)	(71) 出願人	399050909
(22) 出願日	平成17年5月6日 (2005.5.6)		サノフィー-アベンティス
(62) 分割の表示	特願2002-271902 (P2002-271902) の分割		フランス75013パリ、アヴニ ・フランス 174番
原出願日	平成8年11月7日 (1996.11.7)	(74) 代理人	100062144
(31) 優先権主張番号	95/14424		弁理士 青山 隆
(32) 優先日	平成7年12月6日 (1995.12.6)	(74) 代理人	100086405
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		弁理士 河宮 治
		(74) 代理人	100106231
			弁理士 矢野 正樹
		(72) 発明者	ダニエル・カピユ
			フランス、エフ-31290アヴ -ロラゲ、ラ・ブスキエール