

(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2002 - 543786

(P2002 - 543786A)

(43)公表日 平成14年12月24日(2002.12.24)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 0 7 K 14/715	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/715		16/28	4 B 0 6 3
16/28		19/00	4 B 0 6 4
19/00		C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15		1/19	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全162数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 616347(P2000 - 616347)

(86)(22)出願日 平成12年5月11日(2000.5.11)

(85)翻訳文提出日 平成13年11月9日(2001.11.9)

(86)国際出願番号 PCT/US00/12924

(87)国際公開番号 W000/68381

(87)国際公開日 平成12年11月16日(2000.11.16)

(31)優先権主張番号 09/309,861

(32)優先日 平成11年5月11日(1999.5.11)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ザイモジェネティクス, インコーポレイテ
イド
アメリカ合衆国, ワシントン 98102, シアト
ル, イーストレイク アベニュー イースト
1201

(72)発明者 プレズネル, スコット アール.
アメリカ合衆国, ワシントン 98407, タコマ
, ノース ブゲット サウンド アベニュー
2902

(74)代理人 弁理士 石田 敬 (外 4 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 サイトカイン受容体マウス Z C Y T O R 1 0

(57)【要約】

新規ポリペプチド、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び関連する組成物及び方法が、マウス zcytor10、すなわち新規マウスサイトカイン受容体について開示される。前記ポリペプチドは、造血、リンパ性及び骨髄細胞の増殖及び/又は進化を刺激するリガンドを検出するための方法内に使用され得る。リガンド - 結合受容体ポリペプチドはまた、リガンド活性を阻害するためにも使用され得る。マウス zcytor10をコードするポリヌクレオチドは、ヒトオルト体を同定するために使用され得る。本発明はまた、タンパク質を生成するための方法、そのための使用及びそれに対する抗体を包含する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 配列番号2に示されるアミノ酸番号15(Cys)～アミノ酸番号230(Pro)のアミノ酸配列；

(b) 配列番号35に示されるアミノ酸番号17(Ala)～アミノ酸番号232(Pro)のアミノ酸配列；

(c) 配列番号2に示されるアミノ酸番号25(Gly)～アミノ酸番号230(Pro)のアミノ酸配列；

(d) 配列番号2に示されるアミノ酸番号15(Cys)～アミノ酸番号251(Leu)のアミノ酸配列；

(e) 配列番号35に示されるアミノ酸番号17(Ala)～アミノ酸番号253(Leu)のアミノ酸配列；

(f) 配列番号2に示されるアミノ酸番号252(Arg)～アミノ酸番号357(Leu)のアミノ酸配列；

(g) 配列番号2に示されるアミノ酸番号15(Cys)～アミノ酸番号357(Leu)のアミノ酸配列；

(h) 配列番号35に示されるアミノ酸番号17(Ala)～アミノ酸番号359(Leu)のアミノ酸配列；

(i) 配列番号2に示されるアミノ酸番号1(Met)～アミノ酸番号357(Leu)のアミノ酸配列；

(j) 配列番号35に示されるアミノ酸番号1(Met)～アミノ酸番号359(Leu)のアミノ酸配列；

から成る群から選択されたアミノ酸配列に対して少なくとも90%同一であるアミノ酸残基の配列を含んで成るポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項2】 前記ポリペプチドが、

(a) 配列番号2に示されるアミノ酸番号15(Cys)～アミノ酸番号230(Pro)のアミノ酸配列；

(b) 配列番号35に示されるアミノ酸番号17(Ala)～アミノ酸番号232(Pro)のアミノ酸配列；

(c) 配列番号2に示されるアミノ酸番号25 (Gly) ~ アミノ酸番号230 (Pro) のアミノ酸配列 ;

(d) 配列番号2に示されるアミノ酸番号15 (Cys) ~ アミノ酸番号251 (Leu) のアミノ酸配列 ;

(e) 配列番号35に示されるアミノ酸番号17 (Ala) ~ アミノ酸番号253 (Leu) のアミノ酸配列 ;

(f) 配列番号2に示されるアミノ酸番号252 (Arg) ~ アミノ酸番号357 (Leu) のアミノ酸配列 ;

(g) 配列番号2に示されるアミノ酸番号15 (Cys) ~ アミノ酸番号357 (Leu) のアミノ酸配列 ;

(h) 配列番号35に示されるアミノ酸番号17 (Ala) ~ アミノ酸番号359 (Leu) のアミノ酸配列 ;

(i) 配列番号2に示されるアミノ酸番号1 (Met) ~ アミノ酸番号357 (Leu) のアミノ酸配列 ;

(j) 配列番号35に示されるアミノ酸番号1 (Met) ~ アミノ酸番号359 (Leu) のアミノ酸配列 ;

から成る群から選択されたアミノ酸残基の配列を含んで成る請求項1記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項3】 前記ポリペプチドがさらに、配列番号2の残基231 (Leu) ~ 251 (Leu) から成るトランスメンブランドメインを含んで成る請求項1記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項4】 前記ポリペプチドがさらに、配列番号2の残基252 (Arg) ~ 357 (Leu) から成る細胞内ドメインを含んで成る請求項1記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項5】 次の作用可能に連結された要素 :

転写プロモーター ;

配列番号2に示されるアミノ酸番号15 (Cys) 又は25 (Gly) ~ アミノ酸番号357 (Leu) のアミノ酸配列に対して少なくとも90%同一であるか ; あるいは配列番号35に示されるアミノ酸番号17 (Ala) ~ アミノ酸番号232 (Pro) のアミノ酸配

列に対して少なくとも90%同一であるzcytor10ポリペプチドをコードするDNAセグメント；及び

転写ターミネーター；

を含んで成り、ここで前記プロモーターが前記DNAセグメントに作用可能に連結されており、そして前記DNAセグメントが前記転写ターミネーターに作用可能に連結されていることを特徴とする発現ベクター。

【請求項6】 前記DNAセグメントに作用可能に連結された分泌シグナル配列をさらに含んで成る請求項5記載の発現ベクター。

【請求項7】 請求項5記載の発現ベクターを含んで成る培養された細胞であって、前記DNAセグメントによりコードされたポリペプチドを発現する細胞。

【請求項8】 前記DNAセグメントが、配列番号2に示されるアミノ酸番号15 (Cys) 又は25 (Gly) ~ アミノ酸番号230 (Pro) のアミノ酸配列；あるいは配列番号35に示されるアミノ酸番号17 (Ala) ~ アミノ酸番号232 (Pro) のアミノ酸配列、を含んで成るzcytor10ポリペプチド；及び

転写ターミネーターをコードし、

ここで前記プロモーター、DNAセグメント及びターミネーターが作用可能に連結されている請求項5記載の発現ベクター。

【請求項9】 前記DNAセグメントに作用可能に連結された分泌シグナル配列をさらに含んで成る請求項8記載の発現ベクター。

【請求項10】 前記ポリペプチドがさらに、配列番号2の残基231 (Leu) ~ 251 (Leu) から成るトランスメンブランドメインを含んで成る、請求項8記載の発現ベクター。

【請求項11】 前記ポリペプチドがさらに、配列番号2の残基252 (Arg) ~ 357 (Leu) から成る細胞内ドメインを含んで成る、請求項8記載の発現ベクター。

【請求項12】 請求項8記載の発現ベクターを導入されている培養された細胞であって、前記DNAセグメントによりコードされた可溶性受容体ポリペプチドを発現する細胞。

【請求項13】 融合タンパク質をコードするDNA構造体であって、

(a) 配列番号2のアミノ酸番号1 (Met) ~ アミノ酸番号14 (Gly) のアミノ酸配列 ;

(b) 配列番号35のアミノ酸番号1 (Met) ~ アミノ酸番号16 (Ala) のアミノ酸配列 ;

(c) 配列番号2のアミノ酸番号15 (Cys) ~ アミノ酸番号230 (Pro) のアミノ酸配列 ;

(d) 配列番号35のアミノ酸番号17 (Ala) ~ アミノ酸番号232 (Pro) のアミノ酸配列 ;

(e) 配列番号2のアミノ酸番号25 (Gly) ~ アミノ酸番号230 (Pro) のアミノ酸配列 ;

(f) 配列番号2のアミノ酸番号15 (Cys) ~ アミノ酸番号251 (Leu) のアミノ酸配列 ;

(g) 配列番号2のアミノ酸番号17 (Ala) ~ アミノ酸番号253 (Leu) のアミノ酸配列 ;

(h) 配列番号2のアミノ酸番号231 (Leu) ~ アミノ酸番号251 (Leu) のアミノ酸配列 ;

(i) 配列番号2のアミノ酸番号231 (Leu) ~ アミノ酸番号357 (Leu) のアミノ酸配列 ;

(j) 配列番号2のアミノ酸番号252 (Arg) ~ アミノ酸番号357 (Leu) のアミノ酸配列 ;

(k) 配列番号2のアミノ酸番号15 (Cys) ~ アミノ酸番号357 (Leu) のアミノ酸配列 ;

(l) 配列番号2のアミノ酸番号17 (Ala) ~ アミノ酸番号359 (Leu) のアミノ酸配列 ;

から成る群から選択されたアミノ酸残基の配列に対して少なくとも90%同一であるポリペプチドをコードする第1セグメント ; 及び

追加のポリペプチドをコードする少なくとも1つの他のDNAセグメント ;
を含んで成り、ここで前記第1及び他のDNAセグメントが読み取り柄を整合して連結され ; そして前記第1及び他のDNAセグメントが前記融合タンパク質をコー

ドすることを特徴とするDNA構造体。

【請求項14】 次の作用可能に連結された要素：

転写プロモーター；

請求項13記載の融合タンパク質をコードするDNA構造体；及び

転写ターミネーター；

を含んで成り、ここで前記プロモーターが前記DNA構造体に作用可能に連結されており、そして前記DNA構造体が前記転写ターミネーターに作用可能に連結されていることを特徴とする発現ベクター。

【請求項15】 請求項14記載の発現ベクターを含んで成る培養された細胞であって、前記DNA構造体によりコードされるポリペプチドを発現する細胞。

【請求項16】 融合タンパク質の製造方法であって、

請求項15記載の細胞を培養し；そして

前記細胞により生成されるポリペプチドを単離する；

ことを含んで成る方法。

【請求項17】 (a) 配列番号2に示されるアミノ酸番号15(Cys)～アミノ酸番号230(Pro)のアミノ酸配列；

(b) 配列番号35に示されるアミノ酸番号17(Ala)～アミノ酸番号232(Pro)のアミノ酸配列；

(c) 配列番号2に示されるアミノ酸番号25(Gly)～アミノ酸番号230(Pro)のアミノ酸配列；

(d) 配列番号2に示されるアミノ酸番号15(Cys)～アミノ酸番号251(Leu)のアミノ酸配列；

(e) 配列番号35に示されるアミノ酸番号17(Ala)～アミノ酸番号253(Leu)のアミノ酸配列；

(f) 配列番号2に示されるアミノ酸番号252(Arg)～アミノ酸番号357(Leu)のアミノ酸配列；

(g) 配列番号2に示されるアミノ酸番号15(Cys)～アミノ酸番号357(Leu)のアミノ酸配列；

(h) 配列番号35に示されるアミノ酸番号17(Ala)～アミノ酸番号359(Leu)

)のアミノ酸配列；

(i) 配列番号2に示されるアミノ酸番号1 (Met) ~ アミノ酸番号357 (Leu

)のアミノ酸配列；

(j) 配列番号35に示されるアミノ酸番号1 (Met) ~ アミノ酸番号359 (Leu

)のアミノ酸配列；

から成る群から選択されたアミノ酸配列に対して少なくとも90%同一であるアミノ酸残基の配列を含んで成る単離されたポリペプチド。

【請求項18】 前記アミノ酸残基の配列が、

(a) 配列番号2に示されるアミノ酸番号15 (Cys) ~ アミノ酸番号230 (Pro

)のアミノ酸配列；

(b) 配列番号35に示されるアミノ酸番号17 (Ala) ~ アミノ酸番号232 (Pro

)のアミノ酸配列；

(c) 配列番号2に示されるアミノ酸番号25 (Gly) ~ アミノ酸番号230 (Pro

)のアミノ酸配列；

(d) 配列番号2に示されるアミノ酸番号15 (Cys) ~ アミノ酸番号251 (Leu

)のアミノ酸配列；

(e) 配列番号35に示されるアミノ酸番号17 (Ala) ~ アミノ酸番号253 (Leu

)のアミノ酸配列；

(f) 配列番号2に示されるアミノ酸番号252 (Arg) ~ アミノ酸番号357 (Leu

)のアミノ酸配列；

(g) 配列番号2に示されるアミノ酸番号15 (Cys) ~ アミノ酸番号357 (Leu

)のアミノ酸配列；

(h) 配列番号35に示されるアミノ酸番号17 (Ala) ~ アミノ酸番号359 (Leu

)のアミノ酸配列；

(i) 配列番号2に示されるアミノ酸番号1 (Met) ~ アミノ酸番号357 (Leu

)のアミノ酸配列；

(j) 配列番号35に示されるアミノ酸番号1 (Met) ~ アミノ酸番号359 (Leu

)のアミノ酸配列；

から成る群から選択される請求項17記載の単離されたポリペプチド。

【請求項19】 前記ポリペプチド分子が、

配置M1 - {32 - 35} - M2 - {31 - 32} - M3 - {14 - 15} - M4 - {11} - M5 - {22 - 24} -

M6 :

[ここで、M1は、“モチーフ1”、すなわち配列番号43に示されるようなアミノ酸の配列であり、

M2は、“モチーフ2”、すなわち配列番号44に示されるアミノ酸配列であり、

M3は、“モチーフ3”、すなわちLKPから成るアミノ酸の配列であり、

M4は、“モチーフ4”、すなわちVTVから成るアミノ酸の配列であり、

M5は、“モチーフ5”、すなわち配列番号45に示されるようなアミノ酸の配列であり、

M6は、“モチーフ6、すなわちGLDから成るアミノ酸配列であり、そして

{数}は、モチーフ間のアミノ酸の数を示す]

において、N - 末端からC - 末端の方に一定の間隔離れて存在するモチーフ1, 2, 3, 4, 5及び6をコードする請求項17記載の単離されたポリペプチド。

【請求項20】 前記ポリペプチドがさらに、配列番号2の残基231 (Leu) ~ 251 (Leu) から成るトランスメンブランドメインを含んで成る請求項17記載の単離されたポリペプチド。

【請求項21】 前記ポリペプチドがさらに、配列番号2の残基252 (Arg) ~ 357 (Leu) から成る細胞内ドメインを含んで成る請求項17記載の単離されたポリペプチド。

【請求項22】 zcytor10ポリペプチドの製造方法であって、
請求項7記載の細胞を培養し；そして
前記細胞により生成されるzcytor10ポリペプチドを単離する；
ことを含んで成る方法。

【請求項23】 (a) 配列番号2に示されるアミノ酸番号15 (Cys) 又は25 (Gly) ~ アミノ酸番号230 (Pro) のアミノ酸配列；

(b) 配列番号35に示されるアミノ酸番号17 (Ala) ~ アミノ酸番号232 (Pro) のアミノ酸配列；及び

(c) 上記(a)又は(b)に対して少なくとも90%同一である配列；

から成る群から選択されたアミノ酸セグメントを含んで成り、ここで前記ポリペプチドが、造血受容体により通常会合されるトランスメンブラン及び細胞内ドメインを実質的に有さない請求項17記載の単離されたポリペプチド。

【請求項24】 zcytor10ポリペプチドの製造方法であって、
請求項12記載の細胞を培養し；そして
前記細胞により生成されるzcytor10ポリペプチドを単離する；
ことを含んで成る方法。

【請求項25】 zcytor10ポリペプチドに対する抗体の生成方法であって、
(a) 配列番号2におけるアミノ酸番号15(Cys)～アミノ酸番号357(Leu)のアミノ酸の連続配列に対して少なくとも90%同一である、9～343個のアミノ酸から成るポリペプチド；

(b) 配列番号35におけるアミノ酸番号17(Ala)～アミノ酸番号359(Leu)のアミノ酸の連続配列に対して少なくとも90%同一である、9～343個のアミノ酸から成るポリペプチド；

(b) 配列番号2のアミノ酸番号25(Gly)～アミノ酸番号230(Pro)のアミノ酸配列から成るポリペプチド；

(c) 配列番号2のアミノ酸番号114(Lys)～アミノ酸番号121(Val)のアミノ酸配列から成るポリペプチド；

(d) 配列番号2のアミノ酸番号177(Arg)～アミノ酸番号186(Ala)のアミノ酸配列から成るポリペプチド；

(e) 配列番号2のアミノ酸番号252(Arg)～アミノ酸番号357(Leu)のアミノ酸配列から成る2ポリペプチド；

(f) 配列番号2のアミノ酸番号260(Leu)～アミノ酸番号267(Pro)のアミノ酸配列から成るポリペプチド；

(g) 配列番号2のアミノ酸番号298(Thr)～アミノ酸番号302(Asp)のアミノ酸配列から成るポリペプチド；

(h) 配列番号2のアミノ酸番号150(Arg)～アミノ酸番号155(Asp)のアミノ酸配列から成るポリペプチド；

(i) 配列番号2のアミノ酸番号254(Arg)～アミノ酸番号259(Ala)のアミノ酸配列から成るポリペプチド；

ノ酸配列から成るポリペプチド；

(j) 配列番号2のアミノ酸番号296 (Ala) ~ アミノ酸番号301 (Glu) のアミノ酸配列から成るポリペプチド；

(k) 配列番号2のアミノ酸番号297 (Arg) ~ アミノ酸番号302 (Asp) のアミノ酸配列から成るポリペプチド；及び

(l) 配列番号2のアミノ酸番号310 (Lys) ~ アミノ酸番号315 (Glu) のアミノ酸配列から成るポリペプチド；

から成る群から選択されたポリペプチドを動物に接種し、ここで前記ポリペプチドが、抗体を生成するために動物において免疫応答を誘発し；そして

前記動物から抗体を単離する；

ことを含んで成る方法。

【請求項26】 zcytor10ポリペプチドに対して特異的に結合する、請求項25記載の方法により生成される抗体。

【請求項27】 前記抗体が、モノクローナル抗体である請求項26記載の抗体。

【請求項28】 請求項17記載のポリペプチドに対して特異的に結合する抗体。

【請求項29】 zcytor10タンパク質活性のモジュレーター - の存在を、試験サンプルにおいて検出する方法であって、

請求項8記載の発現ベクターが導入されている細胞を培養し、ここで前記細胞が試験サンプルの存在及び不在下でDNAセグメントによりコードされるマスクzcytor10タンパク質を発現し；

生物学的又は生化学的アッセイにより、試験サンプルの存在及び不在下でのマウスzcytor10の活性のレベルを比較し；そして

試験サンプルにおけるzcytor10活性のモジュレーターの存在を、前記比較から決定する；

ことを含んで成る方法。

【請求項30】 試験サンプル内のzcytor10受容体リガンドの検出方法であって、

配列番号2に示されるアミノ酸番号15(Cys)又は25(Gly)～アミノ酸番号230(Pro)のアミノ酸配列を含んで成る請求項17記載のポリペプチドと試験サンプルとを接触せしめ；そして

前記サンプルにおけるリガンドへの前記ポリペプチドの結合を検出する；
ことを含んで成る方法。

【請求項31】 前記ポリペプチドが培養された細胞内で膜結合性であり，
そして前記検出段階が培養された細胞における生物学的応答を測定することを含
んで成る請求項30記載の方法。

【請求項32】 前記生物学的応答が、細胞増殖又はレポーター遺伝子の転
写の活性化である請求項31記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

発明の背景：

ホルモン及びポリペプチド増殖因子は、多細胞生物の細胞の増殖及び分化を制御する。それらの拡散性分子は、細胞のお互いの連絡を可能し、そして細胞、及び器官の形成、そして損傷された組織の修復に関して作用する。ホルモン及び成長因子の例は、ステロイドホルモン（例えば、テストステロン）、副甲状腺ホルモン、卵胞刺激ホルモン、インターロイキン、血小板由来の成長因子（PDGF）、上皮成長因子（EGF）、顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、エリトロポエチン（EPO）及びカルシトニンを包含する。

【0002】

ホルモン及び成長因子は、受容体に結合することによって細胞代謝に影響を及ぼす。受容体は、細胞内のシグナル化経路、例えば第2メッセンジャーシステムに結合される内在性膜タンパク質であり得る。他の種類の受容体は、可溶性分子、例えば転写因子である。サイトカイン、すなわち細胞の増殖及び/又は分化を促進する分子のための受容体が、特に興味の対象である。サイトカインの例は、赤血球細胞の成長を刺激するエリトロポエチン（EPO）；巨核球系の細胞の成長を刺激するトロンボポエチン（TPO）；及び好中球の成長を刺激する顆粒球 - 刺激因子（G-CSF）を包含する。それらのサイトカインは、貧血、血小板減少症及び好中球減少症を有する患者における正常な血液細胞レベルの回復、又は癌のための化学療法の受容において有用である。

【0003】

それらのサイトカインファミリーの例示されたインビボ活性は、他のサイトカイン、サイトカインアゴニスト及びサイトカインアンタゴニストの莫大な臨床学的可能性及びそれらの必要性を示す。本発明は、新規造血サイトカイン受容体、及び関連する組成物及び方法を提供することにより、それらの必要性と取り組む。

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

【0004】

発明の特定の記載：

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

【0005】

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

【0006】

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

【0007】

用語“対立遺伝子変異体”とは、同じ染色体遺伝子座を占める遺伝子の複数の遺伝子の二者択一形のいずれかを示すために、本明細書において使用される。対立遺伝子変異は、突然変異を通して天然では生じ、そして集団内の表現型多型現象をもたらすことができる。遺伝子突然変異は、サイレントであり(コードされたポリペプチドにおいて変化がない)、又は変更されたアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードすることができる。用語、対立遺伝子変異体はまた、遺伝子

の対立遺伝子変異体によりコードされるタンパク質を示すために本明細書において使用される。

【0008】

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

【0009】

用語“相補体 / 抗 - 相補体対”とは、適切な条件下で、非共有的に会合される安定した対を形成する非同一性成分を示す。例えば、ビオチン及びアビジン(又はストレプトアビジン)は、相補体 / 抗 - 相補体対の基本型メンバーである。他の典型的な相補体 / 抗 - 相補体対は、受容体 / リガンド対、抗体 / 抗原(又はハプテン又はエピトープ)対、センス / アンチセンス ポリヌクレオチド対、及び同様のものを包含する。補体 / 抗 - 補体対の続く解離が所望される場合、その相補体 / 抗 - 相補体対は好ましくは、 $< 10^9 \text{ M}^{-1}$ の結合親和性を有する。

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

【0010】

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

用語“縮重ヌクレオチド配列”とは、1又は複数の縮重コドンを含むヌクレオ

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

【0011】

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

【0012】

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

【0013】

“単離された”ポリペプチド又はタンパク質は、その生来の環境以外の条件、例えば血液及び動物組織とは別の条件下で見出されるポリペプチド又はタンパク質である。好ましい形においては、単離されたポリペプチドは、他のポリペプチド、特に動物起源の他のポリペプチドを実質的に含まない。高く精製された形、すなわち95%以上の純度、より好ましくは99%以上の純度でポリペプチドを

供給することが好ましい。この状況下で使用される場合、用語“単離された”とは、他の物理的形、例えばダイマー形又は他のグリコシル化された又は誘導体化された形での同じポリペプチドの存在を排除しない。

【0014】

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

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

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

【0015】

“ポリヌクレオチド”は、5'末端から3'末端に読み取られるデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド塩基の一本鎖又は二本鎖ポリマーである。ポリヌクレオチドは、RNA及びDNAを包含し、そして天然源から単離され、インビトロで合成され、又は天然及び合成分子の組み合わせから調製され得る。ポリヌクレオチドのサイズは、塩基対(略語“bp”)、ヌクレオチド(“nt”)、又はキロ塩基(“kb”)として表される。

【0016】

ここで、後者の2つの用語は、一本鎖又は二本鎖であるポリヌクレオチドを記載する。この用語が二本鎖分子に適用される場合、それは全体の長さを示すために使用され、そして用語、“塩基対”に等しいことが理解されるであろう。二本鎖ポリヌクレオチドの二本の鎖は長さにおいてわずかに異なり、そしてその末端が酵素分解の結果として異なることは、当業者により理解されており；従って、二本鎖ポリヌクレオチド分子内のすべてのヌクレオチドは一对に成り得ない。

【0017】

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

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

【0018】

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

【0019】

用語“受容体”は、生物活性分子(すなわち“リガンド”)に結合し、そして細胞上のリガンドの効果を仲介する細胞関連タンパク質、又はそのようなタンパク質のポリペプチドサブユニットを示す。受容体へのリガンドの結合は、細胞におけるエフェクタードメインと他の分子との間の相互作用を引き起こす受容体におけるコンホメーション変化(及び多くの場合、受容体多重化、すなわち同一油又は異なった受容体サブユニットの会合)をもたらす。

【0020】

この相互作用は、細胞の代謝の変更を誘導する。受容体-リガンド相互作用に連結される代謝現象は、遺伝子転写、リン酸化、脱リン酸化、細胞増殖、cAMP生成の上昇、細胞カルシウムの代謝、膜脂質の代謝、細胞付着、イノシトール脂質の加水分解、及びリン脂質の加水分解を包含する。細胞-表面サイトカイン受容体は、下記により詳細に記載されるように、多-ドメイン構造により特徴づけ

られる。それらの受容体は、正に荷電された残基（Lys又はArg）を通常、端に有する、疎水性アミノ酸残基（典型的には、約21 - 25個の残基）の配列により特徴づけられるトランスメンブランダメインに固定され得る。

【0021】

一般的に、受容体は、膜結合され、シトソール性又は核性であり；モノマー（例えば甲状腺刺激ホルモン受容体、 α -アドレナリン性受容体）、又はマルチマー（例えばPDGF受容体、成長ホルモン受容体、IL - 3受容体、GM-CSF受容体、G-CSF受容体、エリトロポイエチン受容体及びIL - 6受容体）であり得る。用語“受容体ポリペプチド”とは、受容体ポリペプチド鎖及びその一部、例えば単離された機能的ドメイン（例えば、リガンド - 結合ドメイン）を表すために使用される。

【0022】

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

【0023】

“可溶性受容体”とは、細胞膜に結合されない受容体ポリペプチドである。可溶性受容体は、最も通常には、トランスメンブラン及び細胞質ドメインを欠いているリガンド - 結合受容体ポリペプチドである。可溶性受容体は、追加のアミノ酸残基、例えばポリペプチドの精製を提供し、又は基質へのポリペプチドの結合のための部位、又は免疫グロブリン不変領域配列を提供する親和性標識を含んで成る。多くの細胞 - 表面受容体は、タンパク質加水分解により、又は交互にスプライシングされたmRNAから翻訳される天然に存在する可溶性相対物を有する。受容体ポリペプチドは、それがそれぞれ、膜固定化又はシグナルトランスダクションを提供するために、それらのセグメントの十分な部分を欠いている場合、トランスメンブラン及び細胞内ポリペプチドセグメントを実質的に有さないと言われる。

【0024】

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

【0025】

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

本明細書に引用されるすべての文献はそれらのすべてを引用により組み込まれる。

本発明は、クラスIサイトカイン受容体の構造を有するタンパク質をコードする新規ネズミDNA配列の発現に一部、基づかれている。推定されるアミノ酸配列は、コードされた受容体が、EPO受容体を包含する受容体サブファミリーに属することを示した。そのポリペプチドがマウスzcytor10として命名された。

【0026】

本発明の新規マウスzcytor10ポリペプチドは、最初に、ESTデータベースに質問することによって同定された。ESTが見出し、そしてその対応するcDNAが配列決定された。cDNAによりコードされる新規ポリペプチドは、クラスIサイトカイン受容体との相同性を示した。マウスzcytor10ポリヌクレオチド配列は、予測されるタンパク質の完全なコード配列をコードする。マウスzcytor10は、細胞増殖又は分化、アポプトシス細胞経路、細胞-細胞シグナル化分子、成長因子受容体又は成長因子ホルモン活性を有する細胞外マトリックス関連タンパク質、又は同様のものに関連することができる新規サイトカイン受容体である。

【0027】

マウスzcytor10ポリペプチドの配列は、その対応するポリヌクレオチド配列を含む単一のクローンから推定される。クローンは、ネズミ胚及び胎盤ライブラリーから得られた。そのような配列についてまた調べられ得る他のライブラリーは、PBL、胸腺、脾臓、リンパ節、ヒト赤白血病細胞系（例えば、TF - 1）、Raji細胞、急性単球白血病細胞系、他のリンパ球及び造血細胞系、及び同様のものを包含する。

【0028】

代表的マウスzcytor10 - コードDNAのヌクレオチド配列は、配列番号1（ヌクレオチド215～1285）に記載され、そしてその推定される357個のアミノ酸配列は、配列番号2に記載される。他のスプライジングされたマウスzcytor10 - コードDNAは、配列番号34（ヌクレオチド74～1151）に記載され、そしてその推定される359個のアミノ酸配列は、配列番号35に記載される。全体としては、マウスzcytor10ポリペプチドは、完全な長さのポリペプチドセグメント（配列番号2の残基1（Met）～残基357（Leu）；又は他方では、配列番号35の残基1（Met）～残基359（Leu））を表す。マウスzcytor10ポリペプチドのドメイン及び構造特徴は、下記にさらに記載される。

【0029】

配列番号1のDNA配列によりコードされるマウスzcytor10ポリペプチドの分析は、14個のアミノ酸残基（配列番号2の残基1（Met）～残基14（Gly））の予測される分泌シグナルペプチドを含んで成る、読み取り枠コードの357個のアミノ酸（配列番号2）、及び343個のアミノ酸（配列番号2の残基15（Cys）～残基357（Leu））の成熟ポリペプチドを表した。さらに、WSXWSモチーフ（配列番号3）に対して構造的及び機能的類似性を有するモチーフ（この後、“WSXWS - 様モチーフ”として言及される）が、マウスzcytor10に存在し、そして配列番号2の残基199～203に対応する。

【0030】

マウスzcytor10受容体はさらに、約200個のアミノ酸残基（配列番号2の残基15（Cys）～230（Pro））のサイトカイン - 結合ドメイン；ドメインリンカー（配

列番号2の残基114 (Lys) ~ 121 (Val)) ; 最後から2番目の鎖領域 (配列番号2の残基177 (Ala) ~ 185 (Arg)) ; トランスメンブランドメイン (配列番号2の残基231 (Leu) ~ 251 (Leu)) ; “ Box I ” シグナル化部位 (配列番号2の残基260 (Leu) ~ 267 (Pro)) 及び “ Box II ” シグナル化部位 (配列番号2の残基298 (Thr) ~ 302 (Asp)) を含む完全な細胞内シグナル化ドメイン (配列番号2の残基252 (Arg) ~ 357 (Leu)) を含んで成る。当業者は、それらのドメイン境界がおおよそであり、そして既知のタンパク質との一列整列及びタンパク質折りたたみの予測に基づかれることを認識するであろう。

【0031】

それらのドメインの他に、コードされる受容体における保存された受容体特徴は、(配列番号2に示されるように)、位置135及び159での保存されたTrp残基、及び位置は185での保存されたArg残基を包含する。上記に記載されるマウスzcytor10ポリペプチド領域、ドメイン、モチーフ、残基及び配列をコードするその対応するポリヌクレオチドが、配列番号1で示される。

【0032】

配列番号1のDNA配列の分析はまた、メッセージからスプライシングされる場合、他のzcytor10ポリペプチド配列を表す可能性あるイントロン配列を表した。可能性あるイントロンは、配列番号1における番号153 - 154でのG及びTヌクレオチドでのスプライスドナー部位と、配列番号1における番号287 - 288でのA及びGヌクレオチドでのスプライス受容体との間に存在する。スプライスされる場合、他の形のzcytor10 cDNAが、配列番号34に示されるように、生じる。その対応するスプライス変異体zcytor10ポリペプチドが、配列番号35に示される。

【0033】

配列番号35の分析は、16個のアミノ酸残基 (配列番号35の残基1 (Met) ~ 残基16 (Ala)) の予測される分泌シグナルペプチドを含んで成る359個のアミノ酸 (配列番号35) をコードするクラスIサイトカイン受容体ポリペプチド、及び343個のアミノ酸 (配列番号35の残基17 (Ala) ~ 残基359 (Leu)) の成熟ポリペプチドを示した。他の形のマウスzcytor10受容体は、配列番号2について上記のようなすべて特徴、例えば配列番号35の残基201 ~ 205に対応する “ WSXWS - 様モチ

ーフ”を有する。

【0034】

マウスzcytor10受容体はさらに、約200個のアミノ酸残基（配列番号35の残基17 (Ala) ~ 232 (Pro)）のサイトカイン - 結合ドメイン；ドメインリンカー（配列番号35の残基116 (Lys) ~ 123 (Val)）；最後から2番目の鎖領域（配列番号35の残基179 (Ala) ~ 187 (Arg)）；トランスメンブランドメイン（配列番号35の残基233 (Leu) ~ 253 (Leu)）；“BoX I”シグナル化部位（配列番号35の残基262 (Leu) ~ 269 (Pro)）及び“Box II”シグナル化部位（配列番号35の残基300 (Thr) ~ 304 (Asp)）を含む完全な細胞内シグナル化ドメイン（配列番号35の残基254 (Arg) ~ 359 (Leu)）を含んで成ることができる。

【0035】

当業者は、それらのドメイン境界がおおよそであり、そして既知のタンパク質との一列整列及びタンパク質折りたたみの予測に基づかれることを認識するであろう。それらのドメインの他に、コードされる受容体における保存された受容体特徴は、（配列番号35に示されるように）、位置137及び161での保存されたTrp残基、及び位置は187での保存されたArg残基を包含する。上記に記載されるマウスzcytor10ポリペプチド領域、ドメイン、モチーフ、残基及び配列をコードするその対応するポリヌクレオチドが、配列番号34で示される。

【0036】

ネズミzcytor10のN末端でのCXW部位（Val-Thr-Trp；配列番号2のアミノ酸残基39 (Val) ~ 41 (Trp)；配列番号35のアミノ酸残基41 (Val) ~ 43 (Trp)）においては、システイン残基が不在であり、そしてバリンにより置換される。これは、部位の異常な修飾であるが、しかしながら、細胞ドメインに偶数のシステインが存在し、無対のシステインを残さず、そして従って、zcytor10サイトカイン受容体立体構造を維持しない。さらに、ネズミzcytor10 WSXWS-様モチーフの配列は、それが第1のトリプトファンでプロリン及び第2のセリンの位置でトレオニンを含むことにおいて異常である：PSWEY（配列番号40）。このWSXWS-様モチーフは、IL-3R及びIL-3Rサブユニットのモチーフに類似する。

【0037】

IL - 3R は、そのリガンドIL - 3を結合する場合、IL - 3R とヘテロ二量体化する通常の サブユニットであり ; しながら、IL - 3R は、リガンドGM - CSFを結合する場合、GM - CSF受容体サブユニットとヘテロ二量化する。同様に、IL - 3R及びIL - 2R 共通サブユニット (本明細書において論じられる) に対する類似性を有するzcytor10受容体は、ヘテロダイマーを形成し、そして種々のサイトカイン受容体サブユニットを結合し、そして同様に、異なったりリガンドからシグナルを変換する。zcytor10及びBox I及びBox II部位は、この受容体ファミリーのための典型的な配列を含む。

【0038】

さらに、細胞内シグナル化ドメイン内に、配列番号42のBox 1に哺乳類コンセンサス配列を含む配列番号41を含んで成る、高く保存された哺乳類シグナル化モチーフを含んで成るBox IIシグナル化部位の開始近くのBox Iシグナル化部位からのzcytor10配列の領域が存在する。シグナル化モチーフ及びBox I内の保存は、zcytor10のこの領域が機能的な有意性を有し、そして従って、細胞内シグナル化ドメイン内に融合体を企画し、又は変異体zcytor10ポリペプチドを製造することにおいて、この領域及びBox Iコンセンサス内に保存された残基を維持することが好ましいことを示唆する。

【0039】

さらに、zcytor10中に他の保存されたモチーフが存在する。他のタンパク質ファミリーのメンバーとzcytor10との複数の一列整列は、細胞外結合ドメイン内の保存されたアミノ酸の次の領域及びモチーフを示した :

1) “ブロック1”として、この後に言及される第1領域は、配列番号2のアミノ酸残基25 (Gly) ~ アミノ酸残基230 (Pro) に対応する。ブロック1は、zcytor10の変異体形 (配列番号2及び35) 間の共通する細胞外サイトカイン結合ドメインを明確にする。

2) ブロック1内に、いくつかの保存されたモチーフが存在する。“モチーフ1”として、この後に言及される第1モチーフは、配列番号43に記載され、そして配列番号2のアミノ酸残基34 (Leu) ~ アミノ酸残基41 (Trp) に対応する。

【0040】

“モチーフ2”として、この後に言及される第2モチーフは、配列番号44に記載され、そして配列番号2のアミノ酸残基77(Thr)～アミノ酸残基80(Cys)に対応する。

“モチーフ3”として、この後に言及される第3モチーフは、Leu-Lys-Pro(LKP)であり、そして配列番号2のアミノ酸残基113(Leu)～アミノ酸残基115(Pro)に対応する。

“モチーフ4”として、この後に言及される第4モチーフは、Val-Thr-Val(VTV)であり、そして配列番号2のアミノ酸残基131(Val)～アミノ酸残基133(Val)に対応する。

【0041】

“モチーフ5”として、この後に言及される第5モチーフは、配列番号45に記載され、そして配列番号2のアミノ酸残基145(Tyr)～アミノ酸残基148(Gln)に対応する。

“モチーフ6”として、この後に言及される第6モチーフは、Gly-Leu-Asp(GLD)であり、そして配列番号2のアミノ酸残基173(Gly)～アミノ酸残基173(Asp)に対応する。

【0042】

モチーフ1～6の保存は、zcytor10内のそれらのモチーフが構造的又は機能的有意性を有し、そして従って、細胞外結合ドメイン内に融合体を企画し、又は変異体zcytor10ポリペプチドを製造することにおいて、細胞外サイトカイン-結合ドメイン内にそれらの保存されたモチーフを維持することが好ましいことを示唆する。

モチーフ1～6は、次の式により表される配置で、細胞外結合ドメイン内でN-末端からC-末梢方向に一定の間隔離れて存在する：

M1 - {32 - 35} - M2 - {31 - 32} - M3 - {14 - 15} - M4 - {11} - M5 - {22 - 24} - M6 :

ここで、M数は、上記に開示される特定のモチーフを示し、そして[数]は、モチーフ間のアミノ酸の数を示す。

【0043】

トランスメンブラン領域、及び保存され、そして低い変動性のモチーフの存在

は一般的に、タンパク質における重要な構造領域と相互関係するか、又はその領域を定義する。低い変動性の領域（例えば、疎水性クラスター）は、一般的に、構造的に重要な領域に存在する（Sheppard, P. など., 前記）。低い変動性のそのような領域はしばしば、まれな又は数少ないアミノ酸、例えばトリプトファンを含む。そのような保存され且つ低い変動性のモチーフを端に有し、そしてそのモチーフ間の領域は、より変動性であるが、しかし、それらは重要な構造及び活性、例えば結合ドメイン、生物学的及び酵素学的活性、シグナルトランスダクション、細胞 - 細胞相互作用、組織極性ドメイン及び同様のものに関連し、又はそれらを明確にすることができるので、しばしば機能的に有意である。

【0044】

上記のマウスzcytor10における保存されたアミノ酸残基の領域は、新規ファミリーメンバーを同定するための手段として使用され得る。例えば、逆転写 - ポリメラーゼ鎖反応（RT - PCR）は、種々の組織源又は細胞系から得られるRNAからの保存された領域をコードする配列を増幅するために使用され得る。特に、マウスzcytor10配列から企画された高い変性プライマーがこの目的のために有用である。そのような変性プライマーの企画及び使用は、当業者により容易に実施され得る。

【0045】

本発明はまた、ポリヌクレオチド分子、例えば本明細書に開示されるマウスzcytor10ポリペプチドをコードするDNA及びRNA分子を提供する。当業者は、遺伝子コードの縮重の観点から、相当の配列変動がそれらのポリヌクレオチド分子間で可能であることを容易に認識するであろう。配列番号4及び39は、配列番号2及び35のマウスzcytor10ポリペプチドをコードするすべてのDNAを包含する縮重DNA配列である。当業者はまた、配列番号4及び39の変性配列がUとTとを置換することによって、それぞれ、配列番号2及び35をコードするすべてのRNA配列も供給することを理解するであろう。

【0046】

従って、配列番号4のヌクレオチド1 - 1071及び配列番号39のヌクレオチド1 - 1077を含んで成るマウスzcytor10ポリペプチド - コードのポリヌクレオチド及

びそれらのRNA相当物は、本発明により包含される。表1は、縮重ヌクレオチド位置を示すために、配列番号4及び39内に使用される1文字コードを示す。“決定”は、コード文字により示されるヌクレオチドである。“補体”とは、相補的ヌクレオチドのためのコードを示す。例えば、コードYはC又はTのいずれかを示し、そしてその補体RはA又はGを示し、AはTに対して相補的であり、そしてGはCに対して相補的である。

【0047】

【表1】

表1

ヌクレオチド	解	相補体	解
A	A	T	T
C	C	G	G
G	G	C	C
T	T	A	A
R	A G	Y	C T
Y	C T	R	A G
M	A C	K	G T
K	G T	M	A C
S	C G	S	C G
W	A T	W	A T
H	A C T	D	A G T
B	C G T	V	A C G
V	A C G	B	C G T
D	A G T	H	A C T
N	A C G T	N	A C G T

与えられたアミノ酸のためのすべての可能なコドンを含む配列番号4及び39に使用される縮重コドンが表2に示される。

【0048】

【表2】

表2

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

【0049】

当業者は、いくらかのあいまいさが、個々のアミノ酸をコードするすべての可能なコドンの代表である縮重コドンの決定において導入されることを理解するで

あろう。例えば、セリン (WSN) のための縮重コドンは、ある環境下で、アルギニン (AGR) をコードすることができ、そしてアルギニン (MGN) のための縮重コドンは、ある環境下で、セリン (AGY) をコードすることができる。類似する関係が、フェニルアラニン及びロイシンをコードするコドン間に存在する。従って、縮重配列により包含されるいくつかのポリヌクレオチドは、変異体アミノ酸配列をコードすることができるが、しかし当業者は、配列番号2又35のアミノ酸配列への参照によりそのような変異体配列を容易に同定することができる。変異体配列は、本明細書に記載のようにして官能性について容易に試験され得る。

【0050】

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

【0051】

例えば、アミノ酸トレオニン (Thr) は、ACA、ACC、ACG、又はACTによりコードされるが、しかし哺乳類細胞においては、ACCが最も通常に使用されるコドンであり；他の種においては、例えば昆虫細胞、酵母、ウィルス又は細菌においては、異なったThrコドンが好ましい。特定の種のための選択的コドンは、当業界において知られている種々の方法により、本発明のポリヌクレオチド中に導入され得る。例えば、組換えDNA中への選択的コドン配列の導入は、特定の細胞型又は種内でタンパク質の翻訳により効果的にすることによって、そのタンパク質の生成を増強する。

【0052】

従って、配列番号4及び39に開示される縮重コドン配列は、当業界において通

常使用され、そして本明細書において開示される種々の細胞型及び種においてポリペプチドの発現を最適化するための鋳型として作用する。選択コドンを含む配列は、種々の種における発現について試験され、そして本明細書に開示される官能性について試験され得る。

【0053】

本発明の好ましい態様においては、単離されたポリヌクレオチドは、配列番号1、34又はそれに対して相補的な配列の類似するサイズの領域に対して、緊縮条件下でハイブリダイズするであろう。一般的に、緊縮条件は、定義されたイオン強度及びpHで、特定の配列のための熱溶融点 (T_m) よりも約5 低くあるよう選択される。 T_m は、標的配列の50%が好ましく適合されたプローブに対してハイブリダイズする温度 (定義されたイオン強度及びpH下で) である。

【0054】

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

【0055】

配列分析ソフトウェア、例えばOLIG6.0 (LSR; Long Lake, MN) 及びPrimer Premier 4.0 (Premier Biosoft International; Palo Alto, CA), 並びにインターネット上のサイトが所定の配列を分析し、そして使用者の定義された基準に基づいて T_m を計算するための手段を入手できる。そのようなプログラムはまた、定義された条件下で所定の配置を分析し、そして適切なプローブ配列を同定することができる。典型的には、50以上の塩基対の長いポリヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションは、計算された T_m よりも約20~25 低い温度で行われる。50以下の塩基対の小さなプローブに関しては、ハイブリダイゼーションは典型的には

、 T_m 又はそれよりも5～10以下で行われる。

【0056】

これは、DNA-DNA及びDNA-RNAハイブリッドに関して、最大速度のハイブリダイゼーションを可能にする。低い温度でのより高い程度の緊縮性は、緩衝溶液における個々の1%ホルムアミドに関して、約1ハイブリッドの T_m を低めるホルムアミドの添加により達成され得る。適切な緊縮ハイブリダイゼーション条件は、約40～50%のホルムアミド、約6×までのSSC、約5×のDenhardt's溶液、0～約10%のデキストラン硫酸及び約10～20 μ g/mlの変性された市販のキャリアーDNAを含んで成る溶液において約42での5時間～一晩インキュベーションに等しい。一般的に、そのような緊縮条件は、20～70の温度及び6×までのSSC及び0～50%のホルムアミドを含むハイブリダイゼーション緩衝液を包含し；次にハイブリダイゼーションに続いて、約2×までのSSCによるフィルター洗浄を伴う。

【0057】

例えば、適切な洗浄緊縮性は、0.1×のSSC～2×のSSC、0.1%のSDS、55～65の温度に等しい。異なった程度の緊縮性が、標的配列に対する最大の特異的結合を達成するためには、ハイブリダイゼーション及び洗浄の間に使用され得る。典型的には、ハイブリダイゼーションに続く洗浄は、ハイブリダイズされた複合対からハイブリダイズされていないポリヌクレオチドプローブを除去するために、高い程度の緊縮性で行われる。緊縮ハイブリダイゼーション及び洗浄条件は、プローブの長さに依存し、 T_m 、ハイブリダイゼーション及び使用される洗浄溶液において影響され、そして通常当業者により実験的に決定される。

【0058】

前で示されたように、本発明の単離されたポリヌクレオチドは、DNA及びRNAを包含する。DNA及びRNAを調製するための方法は、当業界において良く知られている。一般的には、RNAは、多量のマウスcytor10 RNAを生成する組織又は細胞から単離される。そのような組織及び細胞は、ノザンプロット(Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5201, 1980)により同定され、そしてPBL、脾臓、胸腺、リンパ組織、Raji細胞、ヒト赤白血病細胞系(例えば、TF-1)、急性単球白

血病細胞系、他のリンパ球及び造血細胞系、及び同様のものを包含する。前記活性、又はRNA生成細胞又は組織が同定されると、全RNAは、グアニジウム HCl抽出、続くCsClグラジエントにおける遠心分離による単離により調製され得る (Chirgwinなど., Biochemistry 18:52 - 94, 1979)。

【0059】

ポリ(A)⁺ RNAは、Aviv and Leder (Proc.Natl. Acad. Sci.USA 69: 1408 - 1412, 1972)の方法を用いて全RNAから調製される。相補的DNA(cDNA)は、既知の方法を用いて、ポリ(A)⁺ RNAから調製される。他方では、ゲノムDNAが単離され得る。次に、zcytor10ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが、例えばハイブリダイゼーション又はポリメラーゼ鎖反応(PCR)により同定され、そして単離される (Mullis, アメリカ特許第4,683,202号)。

【0060】

マウスzcytor10をコードする十分な長さのクローンは、従来のクローニング方法により得られる。相補的DNA(cDNA)クローンが好ましいが、但し、いくつかの用途(例えば、トランスジェニック動物における発現)に関しては、ゲノムクローンを使用し、又は少なくとも1つのゲノムイントロンを含むようcDNAクローンを修飾することが好ましい。cDNA及びゲノムクローンを調製するための方法は、よく知られており、そして当業者のレベルの範囲内であり、そしてライブラリーをプローブし又は感作するために、本明細書に開示される配列又はその一部の使用を包含する。発現ライブラリーは、マウスzcytor10、受容体フラグメント、又は他の特定の結合パートナーに対する抗体によりプローブされ得る。

【0061】

本発明のポリヌクレオチドはまた、DNA合成機械を用いても合成され得る。化学的に合成された二本鎖DNAがDNA又はDNAフラグメントの合成のために必要とされる場合、個々の相補的鎖が、当業界において知られているホスホラミジット方法により別々に製造される。短い遺伝子(60~80bp)の生成は技術的に直接的であり、そして相補的鎖の合成及び続いて、それらのアニーリングにより達成され得る。しかしながら、より長い遺伝子(300bp以上)の生成に関しては、特定の工程が通常使用される。

【0062】

例えば、合成DNA（二本鎖）が、20～100個の長さのヌクレオチドである一本鎖フラグメントから調整形でアセンブルされる。合成DNAを構築するための1つの方法は、1組のオーバーラップする相補的オリゴヌクレオチドの生成を包含する。DNAの個々の内部部分は、隣接する部分を正確に有する塩基対に企画される相補的3'及び5'末端延長を有する。DNAがアセンブルされた後、その工程は、2本鎖の主鎖に沿ってニックを連結することによって完結される。

【0063】

タンパク質コード配列の他に、クローニングベクターの制限エンドヌクレアーゼ部位中への挿入を促進する末端配列を有する合成DNAが企画され得る。十分な大きさのDNAを調製するためのもう1つの手段は、当業界において知られている。例えば、Glick and Pasternak, *Molecular Biotechnology, Principles & Applications of Recombinant DNA*, (ASM Press, Washington, D.C. 1994); Itakura など., *Annu.Rev. Biochem.* 53: 323-56, 1984及びClimie など., *Proc. Natl. Acad. Sa. USA* 87: 633-7, 1990を参照のこと。

【0064】

本発明はさらに、他の種（オルト体）からの相対物リガンド及びポリヌクレオチドを供給する。これらの種は、哺乳類、鳥類、両性類、八虫類、魚類、昆虫及び他の脊椎及び無脊椎動物種を包含するが、但しそれらだけには限定されない。特に興味あるものは、他の哺乳類種、例えばヒト、他のネズミ（例えば、ラット）、ブタ、羊、ウシ、犬、ネコ、馬及び他の霊長類ポリペプチドからのzcytor10ポリペプチドである。マウスzcytor10ポリペプチドのオルト体は、従来のクローニング技法と組合して、本発明により供給される情報及び組成物を用いてクローン化され得る。例えば、cDNAは、zcytor10を発現する組織又は細胞型から得られるmRNAを用いてクローン化され得る。

【0065】

mRNAの適切な源は、本明細書に開示される配列から企画されたプローブによりノザン プロットをプローブすることによって同定され得る。次に、ライブラリーが陽性の組織又は細胞系のmRNAから調製される。次に、オルト体のzcytor1

0 - コードの c DNAが種々の方法、例えば完全な又は部分的なヒト c DNAにより、又は前記開示される配列に基づく 1 又は複数の変性プローブにより、プローブすることによって単離され得る。c DNAはまた、本明細書に開示される代表的なマウス zcytor10 配列から企画されたプライマーを用いて、PCR (Mullis, 前記) を用いてもクローン化され得る。さらなる方法においては、c DNAライブラリーが宿主細胞を形質転換し、又はトランスフェクトするために使用され、そして興味ある c DNAの発現がマウス zcytor10 ポリペプチドに対する抗体により検出され得る。類似する技法がまた、ゲノム クローンの単離に適用され得る。

【0066】

マウス zcytor10 受容体のラットオルト体についてのポリヌクレオチド配列は、同定されており、そして配列番号15に示され、そしてその対応するアミノ酸配列は配列番号16に示されている。配列番号15のDNA配列によりコードされるラット zcytor10 ポリペプチドの分析は、ラット細胞内サイトカインシグナル化ドメイン、例えばトランスメンブランドメインの一部 (配列番号16の残基 1 (Ala) ~ 12 (Leu)) ; “ Box I ” シグナル化部位 (配列番号16の残基21 (Leu) ~ 28 (Pro)) 及び “ Box II ” シグナル化部位 (配列番号16の残基59 (Glu) ~ 63 (Asp)) を含む機能的細胞内シグナル化ドメイン (配列番号16の残基13 (Arg) ~ 113 (Leu)) を含んで成る110個のアミノ酸 (配列番号16) をコードする部分配列を示した。

【0067】

ラット及びマウスアミノ酸配列の比較は、両オルト体ポリペプチドが上記の対応する構造特徴を含むことを示す。完全なラット配列は、配列番号15内のプライマーを用いて、通常の5' RACEを行うことによって得られる。上記ラット zcytor10 ポリペプチド領域、ドメイン、モチーフ、残基及び配列をコードするその対応するポリヌクレオチドは、配列番号15に示される。

【0068】

サイトカイン受容体サブユニットは、細胞外ドメイン、細胞膜にポリペプチドを固定するトランスメンブランドメイン、及び細胞内ドメインを含んで成る多重 - ドメイン構造により特徴づけられる。細胞外ドメインはリガンド - 結合ドメイ

ンであり得、そして細胞内ドメインはシグナルトランスダクションに包含されるエフェクタードメインであり得るが、但しリガンド - 結合及びエフェクター機能は、マルチマー受容体の別々のサブユニット上に存在する。マルチマー受容体は、ホモダイマー（例えば、PDGF受容体 及び イソフォーム、エリトロポエチン受容体、MPL及びG - CSF受容体）、サブユニットがそれぞれリガンド - 結合及びエフェクタードメインを有するヘテロダイマー（例えば、PDGF受容体 イソフォーム）、及び種々の機能を有する成分サブユニットを有するマルチマー（例えば、IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7及びGM - CSF受容体）を包含する。

【0069】

いくつかの受容体サブユニットは、多くの受容体に共通する。例えば、単独ではリガンドを結合できないが、しかし細胞内シグナルトランスダクションドメインを包含するAIC2Bサブユニットは、IL-3, GM-CSF及びIL-5受容体の成分である。多くのサイトカイン受容体は、その構造及び機能に基づいて、4種の関連するファミリーの1つに配置され得る。例えば、造血受容体は、保存されたシステイン残基及びWSXWSモチーフ（配列番号3）を含むドメインの存在により特徴づけられる。サイトカイン受容体構造は、Urdal, Ann. Reports Med. Chem. 26: 221-228, 1991及びCosman, Cytokine 5:95-106, 1993により再考されている。新規生物学的機能を生物が獲得するための選択的圧力下で、新規のファミリーメンバーは、多重遺伝子ファミリーの存在を導く存在する受容体遺伝子の重複から、たぶん生まれる。

【0070】

従って、ファミリーメンバーは、祖先遺伝子の痕跡を含み、そしてそれらの特徴は、追加のファミリーメンバーの単離及び同定において利用され得る。従って、サイトカイン受容体スーパーファミリーは、いくつかのファミリー、例えば免疫グロブリンファミリー（例えば、CSF - 1, MGF, IL - 1及びPDGF受容体）；ヘマトポイエチンファミリー（例えば、IL - 2受容体 - サブユニット、GM - CSF受容体の - サブユニット、GM - CSF受容体 - サブユニット、及びG - CSF, EPO, IL - 3, IL-5, IL-6, IL-7及びIL-9受容体）；TNF受容体ファミリー（例えば、TNF（

p80) TNF (p60) 受容体、CD27, CD30, CD40, Fas及びNGF受容体) に再分割される。

【0071】

マウスzcytor10配列の分析は、それがEPO及び成長ホルモン受容体と同じ受容体サブファミリーのメンバーであることを示唆する。このサブファミリーにおける一定の受容体(例えば、G-CSF)は、シグナルを形質導入するホモダイマーを形成するために会合する。サブファミリーの他のメンバー(例えば、IL-6, IL-11及びLIF受容体)は、リガンドを結合し、そしてシグナルを形質導入するために第2サブユニット(β-サブユニットと呼ばれる)と結合する。特定のβ-サブユニットは、多くの特定のサイトカイン受容体サブユニットと会合する。

【0072】

例えば、β-サブユニットgp130(Hibiなど., Cell63:1149-1157, 1990)は、IL-6, IL-11及びLIFに対して特異的な受容体サブユニットと会合する(Gearingなど., EMBOJ. 10:2839-2849, 1991; Gearingなど., アメリカ特許第5,284,755号)。オンコスタチンM(Oncostatin M)は、LIF受容体及びgp130のヘテロダイマーに結合する。CNTFは、CNTF受容体、LIF受容体及びgp130サブユニットを含んで成るトリマー受容体に結合する。

【0073】

zcytor10は、IL-2Rr(ガンマ共通受容体; γc)、上記で論じられたIL-3R、及び他のサイトカイン受容体サブユニットとヘテロダイマー又はマルチマー複合体を形成することが知られているIL-7Rに対する配列及び構造相同性を示す。例えば、IL-7Rは、IL-7リガンドのための受容体を形成するためにγcとヘテロダイマー化する。さらに、TSLP-Rと呼ばれるもう1つのヘテロダイマー受容体はまた、新規リガンド、TSLPのための受容体を形成するために、IL-7Rとヘテロダイマー化することが示されている(Levine, SDなど., J. Immunol. 162:683, 1999; Isaksen, DEなど., J. Immunol. 163:5971-5977; 1999; Ray, RJなど., Eur. J. Immunol. 26:10-16, 1996; Friend, SLなど., Exper. Hematol. 22:321-328, 1994)。

【0074】

従って、zcytor10が、c受容体ファミリーにおける他の受容体サブユニットとヘテロダイマー化するか又はマルチマーを形成し、他の新規サイトカインのための受容体を創造することは可能である。それらのサイトカインは、IL7及びTSLPに良くあることだが、c-相互作用サイトカインの機能とオーバーラップする機能を有することができる。しかしながら、その効果は非常にお互い異なっており、又は異なった時間又は異なった条件下で存在することも可能である。従って、他のサイトカイン受容体サブユニットと共に、zcytor10相互作用するサイトカインを同定することが重要である。

【0075】

アッセイ細胞系は、本明細書に記載される細胞系、例えばBaF3中へのzcytor10及び追加のサイトカイン受容体サブユニットのトランスフェクションにより創造され得る。既知のサイトカイン及び少なくとも100個の細胞系からのならし培地の収穫物、並びに組織調製物及び精製されたサイトカイン調製物は、この同時トランスフェクトされた細胞系の増殖を支持する能力について急速に試験され得る。そのような活性を含むサンプルはさらに、共通受容体に対する中和抗体（例えば、PharMinger International, San Diego, CAからの抗-IL-2受容体モノクローナル抗体）の存在下で評価され、BaF3細胞における内因性cが受容体複合体に関係しないことが確認される。

【0076】

さらに、特異性が、同時トランスフェクトされたサブユニットに対する抗体（種々の製造業者から市販されている）、本明細書に記載される抗-zcytor10抗体、又は本明細書に記載される可溶性zcytor10受容体による増殖の阻害を示すことによって評価され得る。次に、非-c-介在性増殖を支持する活性を生成する細胞系が、リガンドクローニングのためのcDNAライブラリーを生成するために使用され得る。

【0077】

そのようなBaF3アッセイ細胞系は、他の受容体複合体により同時発現されたzcytor10、例えば1又は複数のIL-2受容体成分（IL-2R α 、IL-2R β 、IL-2R γ ）を含んで成るサイトカイン受容体融合体と組合してのzcytor10受容体、1又は複数

のIL-4/IL-13受容体ファミリー受容体成分（IL-4R α 、IL-13R α 、IL-13R α 2）と組合してのzcytor10受容体、及び他のインターロイキン受容体（例えば、IL-15R α 、IL-7R α 、IL-9R α 、IL-21R（Z α 11受容体；アメリカ特許出願番号09/404,641号所有））により創造され得る。

【0078】

当業者は、配列番号1に開示される配列がマウスzcytor10の単一の対立遺伝子を表し、そして対立遺伝子変動及び交互のスプライシングが生じることが予測されることを認識するであろう。この配列の対立遺伝子変異体は、標準の方法に従って、異なった個人からのcDNA又はゲノムライブラリーをプローブすることによってクローン化され得る。配列番号1に示されるDNA配列の対立遺伝子変異体、例えばサイレント突然変異を含むそれらの変異体及び突然変異がアミノ酸配列変更をもたらすそれらの変異体は、配列番号2の対立遺伝子変異体であるタンパク質と同じように、本発明の範囲内である。

【0079】

マウスzcytor10ポリペプチドの性質を保持する、もう1つのスプライスされたmRNA、例えば配列番号34から生成されるcDNAは、そのようなcDNA及びmRNAによりコードされるポリペプチドと同じように、本発明の範囲内に包含される。それらの配列の対立遺伝子変異体及びスプライス変異体は、当業界において知られている標準の方法に従って、異なった個人又は組織からのcDNA又はゲノムライブラリーをプローブすることによってクローン化され得る。

【0080】

本発明はまた、配列番号2又は35のポリペプチド、及びそれらのオルト体に対して実質的に類似する単離されたマウスzcytor10ポリペプチドも提供する。用語“実質的に類似する”とは、配列番号2又は35に示される配列又はそれらのオルト体に対して、少なくとも70%、及びより好ましくは少なくとも80%の配列同一性を有するポリペプチドを示すために本明細書において使用される。そのようなポリペプチドは、より好ましくは、配列番号2又は35、又はそのオルト体に対して、少なくとも90%、及び最も好ましくは95%又はそれ以上同一であろう。%配列同一性は、従来の方法により決定される。

【0081】

例えば、Altschulなど., Bull. Math. Bio. 48 : 603 - 616, 1986及びHenikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 10915 - 10919, 1992を参照のこと。手短かに言及するば、2種のアミノ酸配列が、10のギャップ開始ペナルティー、1のギャップ拡張ペナルティー、及び表3（アミノ酸は標準の1文字コードにより示される）に示されるようなHenikoff and Henikoff（前記）の“blosum 62” 評点マトリックスを用いて、その整合評点を最適化するために整合される。次に、%同一性が次のようにして計算される：

【0082】

【数1】

同一の適合の合計数

$$\frac{\text{同一の適合の合計数}}{\text{[長い方の配列の長さ + 2種の配列を整合するために
長い方の配列中に導入されるギャップの数]}} \times 100$$

【0083】

【表3】

表3

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

【0084】

ポリヌクレオチド分子の配列同一性は、上記に開示されるような割合を用いて、類似する方法により決定される。

当業者は、2種のアミノ酸配列を整列するために多くの確立されたアルゴリズムが存在することを理解している。Pearson and Lipmanの“FASTA”類似性調査アルゴリズムは、本明細書に開示されるアミノ酸配列及び推定上の変異体zpep14のアミノ酸配列により共有される同一性のレベルを試験するための適切なタンパク質整列方法である。前記FASTAアルゴリズムは、Pearson and Lipman, Proc. N

at ' I Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), 及びPearson, Meth. Enzymol. 183: 63 (1990) により記載される。

【0085】

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

【0086】

“カットオフ”値（配列の長さ及びktup値に基づいて予定された式により計算される）よりも高い評点を有するいくつかの領域が存在する場合、その整えられた初期領域が、その領域がギャップとのおおよそその一列配列を形成するために結合され得るかどうかを決定するために試験される。最終的に、2種のアミノ酸配列の最高評点領域が、アミノ酸挿入及び欠失を可能にする、Needleman-Wunsch アルゴリズム（Needleman and winsch, J. Mol. Biol. 48: 444, 1970; Sellers, SIAM J. Appl. Math. 26: 787, 1974）の変法を用いて整列される。FASTA 分析のための例示的なパラメーターは次のものである：ktup = 1、ギャップ開始ペナルティー = 10、ギャップ拡張ペナルティー = 1 及び置換マトリックス = BLOSUM 62。それらのパラメーターは、Appendix 2 of Pearson, 1990（前記）に説明されるように、評点マトリックスを調節することによってFASTAプログラム中に導入され得る。

【0087】

FASTAはまた、上記に開示されるような割合を用いて、核酸分子の配列同一性を決定するためにも使用され得る。ヌクレオチド配列比較のためには、ktup値は、誤りとして設定される他のFASTAパラメーターを伴って、1～6、好ましくは3～6、最も好ましくは3であり得る。

【0088】

BLOSUM62表(表3)は、関連するタンパク質の500以上のグループの高く保存された領域を表す、タンパク質配列セグメントの約2,000の局所の複数整列に由来するアミノ酸置換マトリックスである [Henikoff and Henikoff, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89: 10915 (1992)]。従って、BLOSUM62置換頻度は、本発明のアミノ酸配列中に導入され得る保存性アミノ酸置換を定義するために使用され得る。化学的性質に基づいてのみアミノ酸置換を企画することが可能であるが(上記のように)、用語“保存性アミノ酸置換”とは、-1よりも大きなBLOSUM62値により表される置換を言及する。

【0089】

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

【0090】

変異体又は実質的に相同のマウスzcytor10ポリペプチドは、1又は複数のアミノ酸置換、欠失又は付加を有するものとして特徴づけられる。それらの変化は、好ましくは、保存性アミノ酸置換(表4を参照のこと)及びタンパク質及びポリペプチドの折りたたみ又は活性に実質的に影響を及ぼさない他の置換;小さな欠失、典型的には1~約30個のアミノ酸の欠失;及び小さなアミノ-又はカルボキシル-末端の延長、例えばアミノ-末端メチオニン残基、約20~25個までの残基の小さなリンカーペプチドの延長、又は親和性標識の延長である。870%、好ましくは少なくとも90%、及びより好ましくは95%又はそれ以上の同一性を有する配列を含んで成る、約489~約568個のアミノ酸残基のポリペプチドを包含する。親和性標識を含んで成るポリペプチドはさらに、マウスzcytor10ポリペプチドと親和性標識との間にタンパク質分解部位を含む。好ましいそのような部位は、トロンビン分解部位及び第Xa因子分解部位を含む。

【0091】

【表4】

表4

保存性アミノ酸置換

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

【0092】

本発明はさらに、種々の他のポリペプチド融合体、及び1又は複数のポリペプチド融合体を含んで成る関連するマルチマータンパク質を提供する。例えば、マウスzcytor10ポリペプチドは、アメリカ特許第5,155,027号及び第5,567,584号に開示されるようなダイマータンパク質への融合として調製され得る。それに関するの好ましいダイマータンパク質は、免疫グロブリン不変領域ドメインを包含する。免疫グロブリン - zcytor10ポリペプチド融合体は、種々のマルチマーマウス

zcytor10類似体を生成するために、遺伝子的に構築された細胞において発現され得る。

【0093】

補助ドメインは、特定の細胞、組織又は高分子（例えば、コラーゲン）に対してそれらを標的化するためにマウスzcytor10ポリペプチドに融合され得る。マウスzcytor10ポリペプチドは、複数の成分、例えば精製のための親和性標識及び標的化ドメインに融合され得る。ポリペプチド融合はまた、特にドメイン間に、1又は複数の切断部位を含むことができる。Tuanなど., *Connective Tissue Research* 34: 1-9, 1996を参照のこと。

【0094】

本発明のタンパク質はまた、天然に存在しないアミノ酸残基を含んで成る。天然に存在しないアミノ酸は、トランス-3-メチルプロリン、2,4-メタプロリン、シス-4-ヒドロキシプロリン、トランス-4-ヒドロキシプロリン、N-メチルグリシン、アロ-トレオニン、メチルトレオニン、ヒドロキシエチルシステイン、ヒドロキシエチルホモシステイン、ニトログルタミン、ホモグルタミン、ピペコリン酸、チアゾリジンカルボン酸、デヒドロプロリン、3-及び4-メチルプロリン、3,3-ジメチルプロリン、tert-ロイシン、ノルバリン、2-アザフェニルアラニン、3-アザフェニルアラニン、4-アザフェニルアラニン、及び4-フルオロフェニルアラニンを包含する。天然に存在しないアミノ酸残基をタンパク質中に導入するためのいくつかの方法が当業界において知られている。

【0095】

例えばナンセンス突然変異が化学的にアミノアシル化されたサプレッサー-tRNAを用いて抑制されるインビトロシステムが使用され得る。アミノ酸を合成し、そしてtRNAをアミノアシル化するための方法は、当業者において知られている。ナンセンス突然変異を含むプラスミドの転写及び翻訳は、E.コリS30抽出物及び市販の酵素及び他の試薬の含んで成る細胞フリーシステムにおいて実施される。タンパク質は、クロマトグラフィーにより精製される。例えば、Rovertsonなど., *J. Am. Chem. Soc.* 113:2722, 1991; Eilman など., *Meth. Enzymol.* 202: 30

1,1991; Chung など., Science 259: 806 - 09, 1993; 及びChungなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10145 - 49, 1993を参照のこと。

【0096】

第2の方法においては、翻訳は、突然変異誘発されたmRNA及び化学的にアミノアミル化されたサプレッサ - tRNAのマイクロインジェクションによりアフリカツメガエル卵母細胞において行われる(Turcatti など., J. Biol. Chem. 271: 1991 - 98, 1996)。第3の方法においては、E. コリ細胞が、置換される予定である天然のアミノ酸(例えば、フェニルアラニン)の不在下で及び所望する天然に存在しないアミノ酸(例えば、2 - アザフェニルアラニン、3 - アザフェニルアラニン、4 - アザフェニルアラニン又は4 - フルオロフェニルアラニン)の存在下で培養される。

【0097】

天然に存在しないアミノ酸は、その天然の相対物の代わりにタンパク質中に導入される。Koide など., Biochem. 33: 7470 - 46, 1994を参照のこと。天然に存在するアミノ酸残基は、インビトロ化学的に修飾により天然に存在しない種に転換され得る。化学的修飾は、置換の範囲をさらに拡張するために特定部位の突然変異誘発と組み合わせられ得る(Wynn and Richards, Protein Sci. 2: 395 - 403, 1993)。

限定された数の非保存性アミノ酸、遺伝子コードによりコードされないアミノ酸、天然に存在しないアミノ酸、及び不自然なアミノ酸が、マウスzcytor10アミノ酸により置換され得る。

【0098】

本発明のポリペプチドにおける必須アミノ酸は、当業界において知られている方法、例えば特定部位の突然変異誘発又はアラニン - 走査突然変異誘発により同定され得る(Cunningham and Wells, Science 244: 1081 - 1085, 1989; Bass など., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 4498 - 502, 1991)。後者の技法においては、単一のアラニン突然変異が分子中のあらゆる残基で導入され、そして得られる変異体分子が、前記分子の活性に対して決定的であるアミノ酸残基を同定するために、下記に開示されるようして、生物学的活性(例えば、リガンド結合及

びシグナルトランスダクション) について試験される。

【0099】

また、Hiltonなど., J. Biol. Chem. 271: 4699 - 5708, 1996を参照のこと。
リガンド - 受容体相互作用の部位はまた、推定上の接触部位アミノ酸の突然変異に関して、核磁気共鳴、結晶学、電子回折又は光親和性ラベリングのような技法により決定され得る。例えば、de Vos など., Science 255: 306 - 312, 1992; Smith など., J. Mol. Biol. 224: 899 - 904, 1992; Wlodaver など., FEBS Lett. 309: 59 - 64, 1992を参照のこと。必須アミノ酸の同一性は、関連する受容体による相同体の分析からも推定され得る。

【0100】

構造統合性の維持に対して決定的である領域又はドメイン内に存在するアミノ酸残基の決定が行われ得る。それらの領域内で、多かれ少なかれ、変化に耐性であり、そして分子の全体的な三次構造を維持するであろう特定の残基を決定することができる。配列構造を分析するための方法は、高いアミノ酸又はヌクレオチド同一性を有する複数配列の一例整列、及び利用できるソフトウェア（例えば、the Insight II (商標) viewer and homology modeling tools; MSI, San Diego, CA)、二次構造性質、二元パターン、相補的パッケージング及び埋もれた極性相互作用を用いてのコンピューター分析を包含するが、但しそれらだけには限定されない (Barton, Current Opin. Struct. Biol. 5:372-376, 1995及びCorde sなど., Current Opin. Struct. Biol. 6: 3-10, 1996)。一般的に、分子への修飾を企画するか又は特定のフラグメントを同定する場合、構造の決定は、修飾された分子の活性を評価することによって付随されるであろう。

【0101】

アミノ酸配列の変更が、生物学的活性に対して必須である高次構造体の破壊を最少にするためにzcytor10ポリペプチド、例えば、zcytor10可溶性受容体及びヘテロダイマー受容体ポリペプチドにおいて行われる。例えば、zcytor10ポリペプチド、zcytor10可溶性受容体及びヘテロダイマー受容体ポリペプチドが1又は複数のヘリックスを含む場合、アミノ酸残基の変更が、分子のヘリックス幾何学的及び他の成分を破壊しないよう行われ、ここでコンホメーションの変化が、いく

らかの決定的な機能、例えば分子の、その結合パートナー、例えばA及びDヘリックス、すなわち配列番号2の残基44, 47及び135への結合を妨害する。

【0102】

アミノ酸配列の変更の効果は、例えば上記に開示されるようなコンピューターモデルにより予測され得、又は結晶構造の分析により決定され得る（例えば、Lapthornなど., *Nat. Struct. Biol.* 2: 266-268, 1995）。当業界において良く知られている他の技法は、標準の分子（例えば、生来のタンパク質）と変異体タンパク質の折りたたみを比較する。例えば、変異体及び標準の分子におけるシステインパターンの比較が行われ得る。質量分光及び還元及びアルキル化を用いての化学的修飾は、ジスルフィド結合に関連するか又はそのような関連を有さないシステイン残基を決定するための方法を提供する（Beanなど., *Anal. Biochem.* 201: 216-226, 1992; Gray, *Protein Sci.* 2: 1732-1748, 1993; 及びPattersonなど., *Anal. Chem.* 66: 3727-3732, 1994）。

【0103】

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

【0104】

配列番号2及び35に示されるようなzcytor10ポリペプチド、zcytor10可溶性受容体及びヘテロダイマー受容体タンパク質配列のHopp/Woods親水性プロフィールが生成され得る（Hoppなど., *Proc Natl. Acad. Sci.* 78: 3828, 1981; Hopp, *J. Immun. Meth.* 88: 1-18, 1986及びTriquierなど., *Protein Engineering* 11: 153-169, 1998）。前記プロフィールは、スライドする6 - 残基窓（sliding si

x-residue window) に基づかれている。埋もれたG, S及びT残基及び暴露されたH, Y及びW残基は無視された。

【0105】

例えば、zcytor10ポリペプチドにおいては、親水性領域は、(1) 配列番号2のアミノ酸番号150 (Arg) ~ アミノ酸番号155 (Asp) ; (2) 配列番号2のアミノ酸番号254 (Arg) ~ アミノ酸番号259 (Ala) ; (3) 配列番号2のアミノ酸番号296 (Ala) ~ アミノ酸番号301 (Glu) ; (4) 配列番号2のアミノ酸番号297 (Arg) ~ アミノ酸番号302 (Asp) ; 及び(5) 配列番号2のアミノ酸番号310 (Lys) ~ アミノ酸番号315 (Glu) を包含する。配列番号35のその対応するzcytor10親水性ペプチドはまた、配列番号35に対する上記親水性ペプチド配列番号2の比較を包含する。

【0106】

当業者は、親水性又は疎水性が、全体的な構造及び生物学的プロフィールを破壊しないよう、zcytor10ポリペプチド、zcytor10可溶性受容体及びヘテロダイマー受容体ポリペプチドのアミノ酸配列における修飾を企画する場合、考慮されるであろうことを認識するであろう。Val, Leu及びIleから成る群、又はMet, Gly, Ser, Ala, Tyr及びTrpから成る群から選択された疎水性残基の置換が特に興味の対象である。例えば、置換に耐性の残基は、配列番号2及び35に示されるような残基を包含する。システイン残基は、置換に対して比較的耐性であろう。

【0107】

必須アミノ酸の正体はまた、zcytor10ポリペプチド、例えばzcytor10可溶性受容体及びヘテロダイマー受容体による、クラスIサイトカイン受容体ファミリーメンバー間の配列類似性の分析から推定され得る。前に記載された“FASTA”分析のような方法を用いて、高い類似性の領域が、タンパク質ファミリー内に同定され、そして保存された領域のためのアミノ酸配列を分析するために使用される。構造に基づいて変異体zcytor10、zcytor10可溶性受容体及びヘテロダイマー受容体ポリヌクレオチドを同定するためのもう1つのアプローチは、可能性ある変異体ポリヌクレオチドをコードする核酸分子が、上記で論じられたように、配列番号1又は34のヌクレオチド配列を有する核酸分子にハイブリダイズできるかど

うかを決定することである。

【0108】

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

【0109】

本発明はまた、zcytor10ポリペプチド、zcytor10可溶性受容体及びヘテロダイマー受容体ポリペプチドの機能的フラグメント、及びそのような機能的フラグメントをコードする核酸分子を包含する。“機能的”zcytor10ポリペプチドは、zcytor10可溶性受容体を包含し、そして本明細書において定義されるようなヘテロダイマー受容体又はそのフラグメントは、その増殖又は分化活性により、特殊化された細胞機能を誘発し、又は阻害するその能力により、又は可溶性又は固定された抗-zcytor10抗体、zcytor10リガンド又はサイトカインのいずれかに特異的に結合するその能力により特徴づけられる。前に本明細書において記載されたように、zcytor10受容体はクラスIサイトカイン受容体構造により特徴づけられる。

【0110】

本発明はさらに、(a)本明細書に記載される細胞外又は細胞内ドメインを含んで成るホモダイマー又はマルチマーポリペプチド分子；及び(b)1又は複数のそれらのドメインを含んで成る機能的フラグメントを包含する融合タンパク質を提供する。融合タンパク質の他のポリペプチド部分は、もう1つのクラスIサ

イトカイン受容体、例えばIL-2R α 、IL-2受容体 β -サブユニット及び γ -共通受容体(すなわち、IL-3、IL-5及びGM-CSF受容体 β -サブユニット)、IL-13 α 、IL-13 β 、IL-7 α 、IL-15又はIL-21(z α 11)受容体サブユニットにより、又は可溶性融合タンパク質の分泌を促進する非生来の及び/又は関連のない分泌シグナルペプチドにより寄与され得る。

【0111】

核酸分子の通常の欠失分析は、zcytor10ポリペプチド、zcytor10可溶性受容体及びヘテロダイマー受容体ポリペプチドをコードする核酸分子の機能的フラグメントを得るために行われ得る。例示されるように、配列番号1のヌクレオチド配列又はそのフラグメントを有するDNA分子は、一連の欠失を得るためにBal31ヌクレアーゼにより消化され得る。次に、それらのDNAフラグメントが正しい読み取り枠を整合して発現ベクター中に挿入され、そして発現されたポリペプチドが単離され、そしてzcytor10ポリペプチド、例えばzcytor10可溶性受容体及びヘテロダイマー受容体活性について、又は抗-zcytor10抗体又はzcytor10受容体を結合する能力について試験される。

【0112】

エキソヌクレアーゼ消化のための1つの方法は、欠失を導入するためにオリゴヌクレオチド-指図された突然変異誘発を使用し、又は所望するzcytor10ポリペプチド、例えばzcytor10可溶性受容体及びヘテロダイマー受容体フラグメントの生成を特定するために停止コドンを使用することである。他方では、zcytor10ポリペプチド、例えばzcytor10可溶性受容体及びヘテロダイマー受容体ポリヌクレオチドの特定のフラグメントは、ポリメラーゼ鎖反応を用いて合成され得る。

【0113】

機能的ドメインを同定するための標準の方法は、当業者に良く知られている。例えば、インターフェロンのいずれかの又は両末端での切断に対する研究が、Horisberger and Di Marco, *pharmac. Ther.* 66: 507 (1995) により要約されている。さらに、タンパク質の機能的分析のための標準技法は、例えばTreutterなど., *Molec. Gen. Genet.* 240: 113 (1993), Content など., "Expression and preliminary deletion analysis of the 42 kDa 2-5A synthetase induced by h

uman interferon” , in Biological Interferon Systems, Proceedings of ISIR -TNO Meeting on Interferon Systems, Cantell (ed.), Pages 65-72 (Nijhoff 1987), Herschman, “ The EGF Enzyme ” , in Control of Animal Cell Proliferation, Vol. 1, Boynton など., (eds.) pages 169-199 (Academic Press 1985) , Counaillieu など., J. Biol. Chem. 270: 29270 (1995); Fukunaga など., J. Biol. Chem. 270: 25291 (1995); Yamaguchi など., Biochem. Pharmacol. 50 : 1295 (1995); 及びMeiselなど., Plant Molec. Biol. 30: 1 (1996)により記載される。

【 0 1 1 4 】

複数アミノ酸置換は、突然変異誘発及びスクリーニングの既知方法、例えばReidhaar - Olson and Sauer (science 241: 53 - 57, 1988) 又はBowie and Sauer (Proc. Natl. Acad. Sci. USA86:2152 - 2156,1989) により開示される方法を用いて行われ、そして試験される。手短に言及すれば、それらの著者は、ポリペプチドにおける複数の位置を同時ランダム化し、機能的ポリペプチドをスクリーンし、そして次に個々の位置での可能な置換の範囲を決定するために、突然変異誘発されたポリペプチドを配列決定するための方法を開示する。使用され得る他の方法は、ファージ表示 (例えば、Lowman など., Biochem. 30 : 10832 - 10837 ,1991; Ladner など., アメリカ特許第5,223,409号; Huse, WIPO公開WO 92 / 062 04号)、及び領域 - 指図された突然変異誘発 (Derbyshire など., Gene 46 : 14 5, 1986; Ner など., DNA 7 : 127, 1988) を包含する。

【 0 1 1 5 】

開示されるマウスzcytor10 DNA及びポリペプチド配列の変異体は、Stemmer, Nature 370 : 389 - 91, 1994, Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10747 - 51, 1994及びWIPO公開WI97 / 20078により開示されるように、DNA シャフリングを通して生成され得る。手短に言及すれば、変異体DNA分子が、ランダムに導入された点突然変異をもたらす、親DNAのランダム断片化、続く、PCRを用いてのアセンブリーによるインビトロ相同組換えにより生成される。この技法は、前記工程中に追加の変動性を導入するために、親DNAのファミリー、例えば異なった種からの対立遺伝子変異体又はDNAを用いて改良され得る。所望する活性の選択

又はスクリーニング、突然変異誘発及びアッセイの続くさらなる相互作用が、有害な変化に対して同時に選択しながら、所望する突然変異について選択することによって、配列の急速な“進化”を提供する。

【0116】

本明細書に開示されるような突然変異誘発方法は、宿主細胞におけるクローン化された突然変異誘発されたマウスzcytor10受容体ポリペプチドの活性を検出するために高処理量の自動化されたスクリーニング方法と組み合わせられ得る。これに関する好ましいアッセイは、下記に記載される、細胞増殖アッセイ及びバイオセンサー - に基づくリガンド - 結合アッセイを包含する。活性受容体又はその一部（例えば、又はリガンド - 結合フラグメント、シグナル化ドメイン及び同様のもの）をコードする突然変異誘発されたDNA分子が、宿主細胞から回収され、そしてすぐに、近代的装置を用いて配列され得る。それらの方法は、興味あるポリペプチドにおける個々のアミノ酸残基の重要性の急速な決定を可能にし、そして未知の構造のポリペプチドに適用され得る。

【0117】

本明細書に論議される方法を用いて、当業者は、シグナルトランスダクション又はリガンド結合活性を保持する、配列番号2又は35の種々のポリペプチドフラグメント又は変異体を同定し、そして/又は調製することができる。例えば、細胞 - 結合ドメイン（配列番号2の残基15（Cys）～230（Pro）；配列番号35の残基17（Ala）～232（Pro））又はその対立遺伝子変異体又は種オルト体に対して実質的に相同であり、そして野生型マウスzcytor10タンパク質のリガンド - 結合活性を保持する種々のポリペプチドを調製することによって、マウスzcytor10を、“可溶性受容体”にすることができる。

【0118】

そのようなポリペプチドは、トランスメンブラン及び細胞内ドメインの一部又はすべてからの追加のアミノ酸を包含することができる。そのようなポリペプチドはまた、一般的に本明細書に開示されるような追加のポリペプチドセグメント、例えばラベル、親和性標識及び同様のものも包含することができる。

【0119】

変異体及び融合タンパク質を包含するいずれかのマウスzcytor10ポリペプチド、例えば変異体、可溶性受容体及び融合ポリペプチド又はタンパク質に関しては、当業者は、上記表1及び2に示される情報を用いて、その変異体をコードする十分な縮重ポリヌクレオチド配列を用意に生成することができる。

【0120】

本発明のマウスzcytor10ポリペプチド、例えば十分な長さのポリペプチド、生物学的に活性のフラグメント及び融合ポリペプチドは、従来技法に従って、遺伝的に構築された宿主細胞において生成され得る。適切な宿主細胞は、外因性DNAにより形質転換又はトランスフェクトされ得、そして培養において増殖され得るそれらの細胞型であり、そして細菌、菌類細胞、及び培養された高等真核細胞を包含する。真核細胞、特に多細胞生物の培養された細胞が好ましい。クローン化されたDNA分子を操作し、そして種々の宿主細胞中に外因性DNAを導入するための技法は次の文献に開示される：Sambrook など., Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, 及びAusubel など., eds., Current Protocol in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Ins., NY, 1987。

【0121】

一般的に、本発明のマウスzcytor10ポリペプチドをコードするDNA配列は、その発現のために必要とされる他の遺伝子的要素、例えば一般的に、発現ベクター内の転写プロモーター及びターミネーターに作用可能に連結される。ベクターはまた、通常、1又は複数の選択マーカー及び1又は複数の複製の起点を含むであろうが、しかし当業者は、一定のシステム内で、選択マーカーが別のベクター上に供給され得、そして外因性DNAの複製が宿主細胞ゲノム中への組み込みにより供給され得ることを認識するであろう。プロモーター、ターミネーター、選択マーカー、ベクター及び要素の選択は、当業者のレベルの範囲内の通常のことである。多くのそのような要素は文献に記載されており、そして商業的供給者を通して入手できる。

【0122】

マウスzcytor10ポリペプチドを、宿主細胞の分泌路中に方向づけるためには、

分泌シグナル配列（又は、シグナル配列、リーダー配列、プレプロ配列又はプレ配列としても知られている）が、発現ベクターに供給される。分泌シグナル配列は、マウスzcytor10の配列であり得、又はもう1つの分泌されたタンパク質（例えばt-PA）に由来し、又は新たに合成され得る。

【0123】

分泌シグナル配列は、マウスzcytor10 DNA配列に作用可能に連結され、すなわち2つの配列は正しく読み取り枠を整合して連結され、そして宿主細胞の分泌経路中に新しく合成されたポリヌクレオチドを方向づけるように配置される。分泌シグナル配列は通常、興味あるポリペプチドをコードするDNA配列の5'側に位置するが、但し一定の分泌シグナル配列は、興味あるDNA配列の他の場所に位置することもできる（例えば、Welchなど., アメリカ特許第5,037,743号; Hollandなど., アメリカ特許第5,143,830号を参照のこと）。

【0124】

他方では、本発明のポリペプチドに含まれる分泌シグナル配列は、分泌路中に他のポリペプチドを方向づけるために使用される。本発明はそのような融合ポリペプチドを提供する。シグナル融合ポリペプチドが製造され得、ここで配列番号2のアミノ酸1 (Met) ~ アミノ酸19 (Gly) 又は配列番号35のアミノ酸1 (Met) ~ アミノ酸16 (Ala) に由来する分泌シグナル配列が当業界において知られている方法及び本明細書に開示される方法を用いて、もう1つのポリペプチドに作用可能に連結されている。

【0125】

本発明の融合ポリペプチドに含まれる分泌シグナル配列は好ましくは、分泌路中い追加のペプチドを方向づけるためにその追加のペプチドにアミノ末端的に融合される。そのような構造体は、当業界において知られている多くの用途を有する。例えば、それらの新規の分泌シグナル配列融合構造体は通常分泌されないタンパク質の活性成分の分泌を方向づけることができる。そのような融合は、分泌路を通してペプチドを方向づけるためにインビボ又はインビトロで使用され得る。

。

【0126】

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

【0127】

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

【0128】

追加の適切な細胞系は当業界において知られており、そして公的な寄託所、例えば American Type Culture Collection, Manassas, VA から入手できる。一般的に、強い転写プロモーター、例えば SV - 40 又は サイトメガロウイルスからのプロモーターが好ましい。例えば、アメリカ特許第4,956,288号を参照のこと。他の適切なプロモーターは、メタロチオネイン遺伝子からのプロモーター (アメリカ特許4,579,821号及び第4,601,978号)、アデノウイルス主要後期プロモーターを包含する。

【0129】

薬物選択は一般的に、外来性DNAが挿入されている、培養された哺乳類細胞を選択するために使用される。そのような細胞は通常、“トランスフェクタント”として言及される。選択剤の存在下で培養され、そしてそれらの子孫に興味ある

遺伝子を伝達することができる細胞は、“適切なトランスフェクタント”として言及される。好ましい選択マーカーは、抗生物質ネオマイシンに対する耐性をコードする遺伝子である。選択は、ネオマイシン型薬物、例えばG-418又は同様のもの存在下で実施される。“増幅”として言及される方法である選択システムは、興味ある遺伝子の発現レベルを高めるためにも使用される。

【0130】

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

【0131】

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

【0132】

昆虫細胞は、オートグラフィア・カリホルニカ (*Autographa californica*) 核多角体病ウイルス (AcNPV) に通常由来する組換えバキュロウイルスにより感染され得る。King, L. A. and Possee, R.D., *The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide*, London, Chapman & Hall; O'Reilly, D. R., *Bacul*

ovirus Expression Vector: A Laboratory Manual, New York, Oxford University Press., 1994; 及びRichardson, C. D., Ed., Baculovirus Expression Protocols. Methods in Molecular Biology, Totowa, NJ, Humana Press, 1995を参照のこと。

【0133】

組換えマウスzcytor10バキュロウィルスを製造するための第2の方法は、Luckow (Luckow, VA, など., J. Virol 67: 4566 - 79, 1993) により記載されるトランスポゾンに基づくシステムを利用する。トランスファーベクターを利用するこのシステムは、Bac - to - Bac™キット (Life Technologies, Rockville, MD) として市販されている。このシステムは、“bacmid” と呼ばれる大きなプラスミドとして、E. コリに維持されるバキュロウィルスゲノム中に、マウスzcytor10ポリペプチドをコードするDNAを移動せしめるために、Tn7トランスポゾンを含むトランスファーベクター、pFastBacI™ (Life Technologies) を利用する。

【0134】

Hill - Perkins, M.S. and Possee, R.D., J. Gen. Virol. 71: 971 - 6, 1990; Bonning, B.C. など., J. Gen. Virol. 75: 1551 - 6, 1994; 及びChazenbalk, G. D., and Rapoport, B., J. Biol Chem. 270: 1543 - 9, 1995 を参照のこと。さらに、トランスファーベクターは発現されたマウスzcytor10ポリペプチドのC - 又はN - 末端でエピトープ標識、例えばGlu - Glu エピトープ標識をコードするDNAとのイン - フレーム融合体を含むことができる (Grussenmeyer, T. など., Peoc. Natl. Acad. Sci. 82: 7952 - 6, 1985)。

【0135】

当業界において知られている技法を用いて、マウスzcytor10を含むトランスファーベクターにより、E. コリが形質転換され、そして組換えバキュロウィルスの表示である断続的lacZ遺伝子を含むbacmida についてスクリーンされる。組換えバキュロウィルスゲノムを含むbacmid DNA が、通常の技法を用いて単離され、そしてスポドプテラ・フルギペルダ (Spodoptera frugiperda) 細胞、例えばSf9 細胞をトランスフェクトするために使用される。マウスzcytor10を発現する組換えウィルスが結果的に生成される。組換えウィルス ストックは、当業者に

において通常使用される方法により製造される。

【0136】

組換えウィルスは、宿主細胞、典型的には、アワヨトウの幼虫、スポドプテラ・フルギペルダに由来する細胞系を感染せしめるために使用される。一般的には、Glick and Pasternak, Molecular Biotechnology: Principles and Application of Recombinant DNA, ASM Prss, Washington, D.C., 1994を参照のこと。もう一つの適切な細胞系は、トリコプルシア・ニ (Trichoplusia ni) に由来するHigh FiveTM細胞系 (Invitrogen) である (アメリカ特許第5,300,435号)。市販の血清フリー培地は、細胞を増殖し、そして維持するために使用される。

【0137】

適切な培地は、Sf9細胞のためには、SF900IITM (Life Technologies), 又はEST 921TM (Expression Systems); 及びT. ni 細胞のためには、Ex-Cell10405TM (JRH Biosciences, Lenza, KS) 又はExpress Five0TM (Life Technologies) である。使用される方法は一般的に、入手できる実験用マニュアルに記載されている (King, L. A. and Possee, R. D., 前記; O'Reilly, D. R. など., 前記; Richardson, C. D., 前記)。上清液からのマウスzytor10ポリペプチドの続く精製は、本明細書に記載される方法を用いて達成され得る。

【0138】

菌類細胞、例えば酵母細胞はまた、本発明内で使用され得る。これに関して、特に興味ある酵母種は、サッカロミセス・セレビシアエ (Saccharomyces cerevisiae), ピチア・パストリス (Pichia pastoris) 及びピチア・メタノリカ (Pichia methanolica) を包含する。外因性DNAによりS. セレビシアエ細胞を形質転換し、そしてそれから組換えポリペプチドを生成するための方法は、例えばKawasaki, アメリカ特許第4,599,311号; Kawasaki など., アメリカ特許第4,931,373号; Brake, アメリカ特許第4,870,008号; Welchなど., アメリカ特許第5,037,743号; 及びMurray など., アメリカ特許第4,845,075号により開示される。

【0139】

形質転換された細胞は、選択マーカー、通常、耐薬物性、又は、特定の栄養物 (例えばロイシン) の不在下で増殖する能力により決定される表現型により選択

される。サッカロミセス・セレビシアエへの使用のための好ましいベクターシステムは、グルコース含有培地における増殖により形質転換された細胞の選択を可能にする、Kawasaki など. (アメリカ特許第4,931,373号)により開示されるPOT 1ベクターシステムである。酵母への使用のための適切なプロモーター及びターミネーターは、解糖酵素遺伝子(例えば、Kawasaki, アメリカ特許第4,599,311号; Kingsmanなど., アメリカ特許第4,615,974号; 及びBitter, アメリカ特許第4,977,092号を参照のこと)及びアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子からのものを包含する。

【0140】

また、アメリカ特許第4,990,446号; 第5,063,154号; 第5,139,936号; 及び第4,661,454号を参照のこと。他の酵素、例えばハンセヌラ・ポリモルファ(*Hansenula polymorpha*)、シゾサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)、クレイベリミセス・ラクチス(*Kluyveromyces lactis*)、クレイベリミセス・フラギリス(*Kluyveromyces fragilis*)、ウスチラゴ・マイジス(*Ustilago maydis*)、ピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)、ピチア・メタノリカ(*Pichia methanolica*)、ピチア・ゲイレルモンジ(*Pichia guilliermondii*)、及びカンジタ・マルトサ(*Candida maltosa*)のための形質転換システムは、当業界において知られている。

【0141】

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

【0142】

組換えタンパク質の生成のための宿主としてのピチア・メタノリカの使用は、WIPO公開W097/17450, W097/17451, W098/02536及びW098/02565に開示される

。P.メタノリカの形質転換に使用するためのDNA分子は通常、形質転換の前、好ましくは線状化される、二本鎖の環状プラスミドとして調製されるであろう。P.メタノリカにおけるポリペプチド生成のためには、プラスミドにおけるプロモーター及びターミネーターは、P.メタノリカ遺伝子、例えばP.メタノリカアルコール利用遺伝子(AUG1又はAUG2)のものであることが好ましい。他の有用なプロモーターは、ジヒドロキシアセトンシンターゼ(DHAS)、ギ酸デヒドロゲナーゼ(FMD)、及びカタラーゼ(CAT)遺伝子のもを包含する。

【0143】

宿主染色体中へのDNAの組み込みを促進するためには、宿主DNA配列を両端に有するプラスミドの完全な発現セグメントを有することが好ましい。ピチアメタノリカへの使用のための好ましい選択マーカーは、アデニンの不在下でade2宿主細胞の増殖を可能にする、ホスホリボシル-5-アミノイミダゾールカルボキシルラーゼ(AIRC; EC. 4.1.1.21)をコードするP.メタノリカADE2遺伝子である。メタノールの使用を最少にすることが所望される大規模産業方法のためには、両メタノール利用遺伝子(AUG1及びAUG2)が欠失されている宿主細胞を使用することが好ましい。分泌されたタンパク質の生成のためには、液胞プロテアーゼ遺伝子(PEP4及びPRB1)を欠いている宿主細胞が好ましい。

【0144】

エレクトロポレーションが、P.メタノリカ細胞中への、興味あるポリペプチドをコードするDNAを含むプラスミドの導入を促進するために使用される。2.5~4.5kV/cm,好ましくは約3.75kV/cmの電場の強さ、及び1~40m秒、最も好ましくは約20m秒の時定数(t)を有する、指数的に減衰する、パルスされた電場を用いて、エレクトロポレーションによりP.メタノリカ細胞を形質転換することが好ましい。

【0145】

原核宿主細胞、例えば細菌E.コリ、バシラス及び他の属の菌株はまた、本発明において有用な宿主細胞である。それらの宿主を形質転換し、そしてそこにクローン化される外来性DNA配列を発現するための技法は、当業界において良く知られている(例えば、Sambrookなど., 前記を参照のこと)。細菌、例えばE.コリ

においてマウスzytor10ポリペプチドを発現する場合、そのポリペプチドは、典型的には不溶性顆粒として細胞質に保持され得、又は細菌の分泌配列により細胞周辺腔に向けられ得る。前者の場合、細胞は溶解され、そして顆粒が回収され、そして例えばグアニジンイソチオシアネート又はウレアを用いて変性される。

【0146】

次に、変性されたポリペプチドが再生され、そして例えばウレア、及び還元された及び酸化されたグルタチオンの組み合わせの溶液に対する透析、続く緩衝溶液に対する透析により、前記変成体を希釈することによって二量体化され得る。後者の場合、ポリペプチドは、細胞周辺腔の内容物を開放するために細胞を破壊し（例えば、音波処理又は浸透ショックにより）、そしてタンパク質を回収することによって、細胞周辺腔から可溶性及び機能性形で回収され、それにより、変性及び再生のための必要性を回避することができる。

【0147】

形質転換され又はトランスフェクトされた宿主細胞は、選択された宿主細胞の増殖のために必要とされる栄養物及び他の成分を含む培養培地において、従来の方法に従って培養される。種々の適切な培地、例えば定義された培地及び複合培地は、当業界において知られており、そして一般的には、炭素源、窒素源、必須アミノ酸、ビタミン及び鉱物を含む。培地はまた、必要とされる場合、成長因子又は血清のような成分も含むことができる。増殖培地は一般的に、外因的に付加されたDNAを含む細胞を、例えば発現ベクター上に担持される選択マーカーにより補足され、又は宿主細胞中に同時トランスフェクトされる必須栄養物における薬物選択又は栄養欠乏により選択するであろう。

【0148】

P.メタノリカ細胞は適切な炭素源、窒素源及び微量栄養物を含んでなる培地において、約25 ~ 35 の温度で培養される。液体培養物は、従来手段、例えば小さなフラスコの振盪又は発酵器のスパージングにより十分なエアレーションを提供される。P.メタノリカのための好ましい培養培地は、YEPD（2% D-グルコース、2%のBacto™ペプトン（Difco Laboratories, Detroit, MI）, 1%のBacto™酵母抽出物（Difco Laboratories）, 0.004%のアデニン及び0.006%の

L-ロイシン)である。

【0149】

本発明の1つの観点においては、マウスzcytor10サイトカイン受容体(例えば、トランスメンブラン及び細胞内ドメイン)は、培養された細胞により生成され、そして細胞は、受容体のためのリガンド、例えば天然のリガンド、及び天然のリガンドのアゴニスト及びアンタゴニストについてスクリーンするために使用される。このアプローチを要約すると、受容体をコードするcDNA又は遺伝子が発現のために必要とされる他の遺伝子要素(例えば、転写プロモーター)と組合され、そしてその得られる発現ベクターが宿主細胞中に挿入される。DNAを発現し、そして機能的受容体を生成する細胞が選択され、そして種々のスクリーニングシステム内に使用される。

【0150】

本発明の新規受容体の発現及び受容体-介在性シグナルのトランスダクションへの使用のために適切な哺乳類細胞は、サブユニット、例えばgp130を発現する細胞、及びgp130及びLIF受容体を同時発現する細胞を包含する(Gearingなど., EMBO. J. 10: 2839-2848, 1991; Gearing など., アメリカ特許第5,284,755号)。これに関して、同じサブファミリーにおける受容体、例えばIL-6又はLIFに結合する他のサイトカインに対して応答性である細胞を使用することが一般的に好ましい。なぜならば、そのような細胞は必要なシグナルトランスダクション経路を含むであろうからである。

【0151】

このタイプの好ましい細胞は、ヒトTF-1細胞系(ATCC番号CRL-2003)及びDA-1細胞系を包含する(Branchなど., Blood 69: 1782, 1987; Broudy など., Blood 75: 1622-1626, 1990)。他方では、適切な宿主細胞は、所望する細胞応答のために必要とされるサブユニット又は他の細胞成分を生成するために構築され得る。例えば、ネズミ細胞系BaF3(Palacios and Steinmetz, Cell 41: 27-734, 1985; Mathey-Prevotなど., Mol. Cell. Biol. 6: 4133-4135, 1986)、子供ハムスター腎臓(BHK)細胞系、又はCTLL-2細胞系(ATCC TIB-214)が、マウスgp130サブユニット、又はマウスgp130及びLIF受容体、並びにマウスzcy

tor10発現するためにトランスフェクトされ得る。

【0152】

同じ種からの宿主細胞及び受容体を使用することが一般的に好ましいが、しかしながら、このアプローチは、いずれかの種からの多数の受容体サブユニットを発現するための細胞系の構築を可能にし、それにより、種特異性から生じる可能性ある制限を克服する。他方では、マウス受容体cDNAの種相同体、例えばBaF3細胞系におけるマウスcDNAが、同じ種からの細胞系内でクローン化され、そしてその細胞内で使用され得る。従って、1つの造血成長因子、例えばIL-3に依存する細胞系が、マウスzytor10リガンドに依存性になるように構築され得る。

【0153】

機能的マウスzytor10を発現する細胞が、スクリーニングアッセイ内に使用される。種々の適切な通常のアッセイは、高い処理性であり、そして当業界において良く知られている。それらのアッセイは、標的細胞における生物学的反応の検出に依存する。1つのそのようなアッセイは、細胞増殖アッセイである。細胞は、試験化合物の存在又は不在下で培養され、そして細胞増殖は、例えばトリチウム化されたチミジンの組み込みを測定することにより、又はAlymar Blue™ (AccuMed, Chicago, IL) 又は3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド(MTT) (Mosman, J. Immunol. Meth. 65: 55-63, 1983) の代謝性分解に基づく比色分析により検出される。

【0154】

他のアッセイ型は、レポーター遺伝子を発現するよう、さらに構築される細胞を用いる。レポーター遺伝子は、レポーター-連結経路に応答するプロモーター要素に連結され、そしてアッセイは、レポーター遺伝子の転写の活性化を検出する。これに関するの好ましいプロモーター要素は、血清応答要素、又はSREである(例えば、Shawなど., Cell 563-572, 1989を参照のこと)。好ましいそのようなレポーター遺伝子は、ルシフェラーゼ遺伝子である(de Wetなど., Mol. Cell Biol. 7: 1987)。

【0155】

ルシフェラーゼ遺伝子の発現は、当業界において知られている方法を用いて発

光により検出される (Baumgartnerなど., J. Biol. Chem. 269: 19094-29101, 1994; Schenborn and Goiffin, Promega Notes 41; 11, 1993)。ルシフェラーゼアッセイキットは、例えばPromega Corp., Madison, WIから市販されている。この型の標的細胞系は、化学物質、細胞 - ならし培養培地、菌類ブイヨン、土壌サンプル、水サンプル及び同様のもののライブラリーをスクリーンするために使用され得る。

【0156】

例えば、細胞 - 又は組織 - ならし培地サンプルのバンクが、リガンドを生成する細胞を同定するために標的細胞に対してアッセイされ得る。次に、陽性細胞が、プールに分けられ、宿主細胞中にトランスフェクトされ、そして発現される、哺乳類細胞発現ベクターにおいてcDNAライブラリーを生成するために使用される。次にトランスフェクトされた細胞からの培地サンプルがアッセイされ、続くプールの分割、トランスフェクション、継代培養、及び陽性細胞の再アッセイが伴ない、リガンドを発現するクローン細胞系が単離され得る。腎臓、肝臓、脾臓、胸腺、他のリンパ組織により条件付けされた培地サンプルが、スクリーニング方法への使用のためのリガンドの好ましい源である。

【0157】

マウスzcytor10のための天然のリガンドはまた、マウスzcytor10を発現するサイトカイン - 依存性細胞系を突然変異誘発し、そしてそれを、オートクライン増殖について選択する条件下で培養することによって同定され得る。WIPO公開W095/21930号を参照のこと。典型的な方法においては、マウスzcytor10を発現する細胞が、例えばEMSにより突然変異誘発される。次に、細胞が、必要とされるサイトカインの存在下で回収され、次に、サイトカインを欠いている培養培地にトランスファーされる。

【0158】

生存細胞が、可溶性 (リガンド - 結合) 受容体ポリペプチドを培養培地に添加することにより、又は野生型細胞及びマウスzcytor10を発現するトランスフェクトされた細胞に対するならし培地をアッセイすることにより、マウスzcytor10のためのリガンドの生成についてスクリーンされる。この方法に使用するための好

ましい細胞系は、gp130又は、IF受容体と組合してgp130を発現するためにトランスフェクトされる細胞を包含する。好ましいそのような宿主細胞系は、トランスフェクトされたCTLL-2細胞 (Gilis and Smith, Nature 268: 154-156, 1977) 及びトランスフェクトされたBaF3細胞を包含する。

【0159】

さらに、マウスzcytor10可溶性受容体ポリペプチドを使用する分泌トラップ方法は、マウスzcytor10リガンドを単離するために使用され得る (Aldrich, など., Cell 87: 1161-1169, 1996)。既知の又は疑わしいリガンド源から調製されたcDNA発現ライブラリーが、COS-7細胞中にトランスフェクトされる。cDNAライブラリーベクターは一般的に、COS-7細胞における増殖のためのSV40起点、及び高い発現のためのCMVプロモーターを有する。トランスフェクトされたCOS-7細胞は、単層において増殖され、そして次に固定され、そして浸透せしめられる。次に、本明細書に記載される、標的化されているか、又はビオチン-ラベルされたマウスzcytor10可溶性受容体が、細胞像と接触して配置され、そして抗-相補的分子、すなわちマウスzcytor10リガンドを発現する、単層における細胞の結合を可能にされる。従って、リガンドを発現する細胞が、受容体分子により結合されるであろう。

【0160】

ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) により接合される抗-標的抗体 (Ig融合体のための抗-Ig、FLAG-標的化された融合体のためのM2又は抗-FLAG、ストレプトタビジン及び同様のもの) は、標的化されているか、又はビオチン-ラベルされたマウスzcytor10可溶性受容体が結合しているそれらの細胞を可視化するために使用される。HRPは、チラミド試薬、例えばチラミド-FITCの付着を触媒する。市販のキットが、この検出のために使用され得る (Renaissance TSA-Direct™ Kit; NEN Life Science Products, Boston, MA)。マウスzcytor10受容体リガンドを発現する細胞は、緑色の細胞として蛍光顕微鏡下で同定され、そしてAldrich, など., 前記に概略されるように、プラスミド救助のための方法を用いてのリガンドの続くクローニング、クローンが同定されるまでの続くラウンドの分泌トラップアッセイのために採取されるであろう。

【0161】

受容体として、マウスzcytor10ポリペプチドの活性は、受容体結合及び続く生理学的細胞応答に関連する細胞外酸性化速度又はプロトン排泄を測定する珪素基材のバイオセンサーマイクロフィジオメーターにより測定され得る。典型的な装置は、Molecular device, Sunnyvale, CAにより製造されるCytosensor™ MicropHysiometerである。種々の細胞応答、たとえば細胞増殖、イオン輸送、エネルギー生成、炎症応答、調節及び受容体活性化及び同様のものが、この方法により測定され得る。例えば、McConnell, H.M. など., Science 257: 1905-1912, 1992; Pitchford, S. など., Meth. Enzymol. 228: 84-108, 1997; Arimilli, S. など., J. Immunol. Meth. 212: 49-59, 1998; Van Liefde, I. など., Eur. J. Pharmacol. 346: 87-95, 1998を参照のこと。

【0162】

マイクロフィジオメーターは、付着性又は非付着性真核又は原核細胞をアッセイするために使用され得る。時間にわたって細胞培地における細胞外酸性化の変化を測定することによって、マイクロフィジオメーターは、種々の刺激、例えばマウスzcytor10ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストに対する細胞応答を直接的に測定する。好ましくは、マイクロフィジオメーターは、マウスzcytor10ポリペプチドを発現しない対照の真核細胞に比較して、マウスzcytor10 - 発現性真核細胞の応答を測定するために使用される。

【0163】

マウスzcytor10 - 発現性真核細胞は、マウスzcytor10 - 調整刺激に対して応答性である細胞を創造するか、又は天然において発現性のマウスzcytor10細胞、例えばリンパ球、脾臓、胸腺組織、PBL, 肺、肝臓、心臓又は精巢に由来するマウスzcytor10 - 発現性細胞である細胞を創造する、マウスzcytor10がトランスフェクトされている細胞を包含する。対照に比較して、マウスzcytor10を発現する細胞の応答における細胞外酸性化の上昇又は低下により測定される差異が、マウスzcytor10 - 調節された細胞応答の直接的に測定である。

【0164】

さらに、そのようなマウスzcytor10 - 調節された応答は、種々の刺激下でアッ

セイされ得る。また、マイクロフィジオメーターを用いれば、マウスzcytor10ポリペプチドを発現する細胞を供給し、前記細胞の第1部分を試験化合物の不在下で培養し、前記細胞の第2部分を試験化合物の存在下で培養し、そして前記細胞の第1部分に比較して、前記細胞の第2部分の細胞応答の上昇又は低下の変化を検出することを含んでなる、マウスzcytor10ポリペプチドのアゴニスト及びアンタゴニストを同定するための方法が提供される。zcytor10ポリペプチドのためのアンタゴニスト及びアゴニストは、この方法を用いて急速に同定され得る。

【0165】

本発明により提供される追加のアッセイは、ハイブリッド受容体ポリペプチドの使用を包含する。それらのハイブリッドポリペプチドは、2種の一般的なクラスに分けられる。第1のクラスにおいては、配列番号2の残基252(Arg)~357(Leu)又は配列番号35の残基254(Arg)~369(Leu)を含んで成るマウスzcytor10の細胞内ドメインは、第2受容体のリガンド-結合ドメインに連結される。好ましくは、第2受容体は造血サイトカイン受容体、例えばmpl受容体である(Souyriなど., Cell 63: 1137-1147, 1990)。ハイブリッド受容体はさらに、いずれかの受容体に由来するトランスメンブランドメインを含んで成るであろう。

【0166】

次に、ハイブリッド受容体をコードするDNA構造体が宿主細胞中に挿入される。ハイブリッド受容体が発現する細胞が、結合ドメインのためのリガンドの存在下で培養され、そして応答についてアッセイされる。このシステムは、容易に入手できるリガンドを用いて、マウスzcytor10により介在されるシグナルトランスダクションを分析するための手段を提供する。このシステムはまた、特定の細胞系がマウスzcytor10により形質導入されたシグナルに応答できるかどうかを決定するためにも使用され得る。第2クラスのハイブリッド受容体ポリペプチドは、第2受容体、好ましくはサイトカイン受容体の細胞質ドメイン及びトランスメンブランドメインと共に、マウスzcytor10の細胞外(リガンド結合)ドメイン(配列番号2の残基15(Cys)~230(Pro)、又は配列番号35の残基17(Ala)~232(Pro))を含んで成る。

【0167】

トランスメンブランドメインは、マウスzcytor10受容体又は第2受容体のいずれかに由来することができる。この第2クラスのハイブリッド受容体は、第2受容体により形質導入されるシグナルに応答することが知らされている細胞において発現される。それらの2種のハイブリッド受容体は、受容体に基づいたアクセシシステム内での広範囲の細胞型の使用を可能にする。

【0168】

次に、マウスzcytor10のためのリガンドを発現することが見出された細胞が、リガンド - コードのcDNAが上記に開示されるように単離され得るcDNAライブラリーを調製するために使用される。従って、本発明は、新規受容体ポリペプチドの他に、受容体のためのポリペプチドリガンドをクローニングするための方法を提供する。

【0169】

マウスzcytor10は、初期胸腺細胞発生及び/又は免疫応答調節において役割を演じることができる。それらの工程は、1又は複数のサイトカインのそれらの同種受容体への結合に応答しての細胞増殖及び分化の刺激を包含する。この受容体に関して観察される組織分布の観点から、アゴニスト（天然のリガンドを包含する）及びアンタゴニストは、インビトロ及びインビボ用途において莫大な可能性を有する。受容体アゴニストに同定される化合物は、インビトロ及びインビボで、標的細胞の増殖及び進化を刺激するために有用である。

【0170】

例えば、アゴニスト化合物は、定義された細胞培養培地の成分として有用であり、そして細胞培養において通常使用される血清を置換するために、単独で又は他のサイトカイン及びホルモンと組合して使用され得る。従って、アゴニストは、T - 細胞、B - 細胞、及びリンパ球及び骨髄性系の他の細胞、及び培養における造血細胞の増殖及び/又は進化を特別に促進することにおいて有用である。それらの細胞系の増殖及び進化を決定するためのアッセイは、当業界に良く知られている。

【0171】

マウスzcytor10のためのアゴニストリガンドは、細胞 - 介在性免疫性の刺激に

において、及びリンパ球増殖の刺激のために、例えば免疫抑制に關与する感染、例えば一定のウィルス感染の処理の研究への使用のためのマウスモデルにおいて有用である。追加の使用は、悪性形質転換が抗原性である腫瘍細胞をもたらす、腫瘍抑制のためのマウスモデルへの使用を包含する。

【0172】

アゴニストリガンドは、エフェクター細胞、例えばT-細胞、NK(天然のキラー)細胞又はLAK(リンパ性の活性化されたキラー)細胞の活性化を通して介在され得るか、又はアポプトシス経路を通して直接的に誘発され得、そしてヒト疫病のためのマウスモデルにおいて適用され得る、細胞毒性を誘発するために使用され得る。アゴニストリガンドは、影響された細胞型のレベルを高めることによって白血球減少についての可能性ある処理の研究のために、及び骨髓移植の後、T-細胞レパトリーの再生の増強に關与する研究のために、マウスモデルにおいて有用である。

【0173】

アンタゴニスト又はアゴニストリガンド又は化合物は、免疫型の抑制に利用でき、そして自己免疫疾患、例えばリュウマチ様関節炎、多発性硬化症、真性糖尿病、炎症性腫疾患、クローン病、等の処理の研究のための有用なモデルを提供する。免疫抑制がまた、組織又は器官移植の拒絶を低めるために、及び影響された細胞型の増殖を阻害することによってT-細胞特異的白血病又はリンパ腫を処理するためにも使用され得る。

【0174】

マウスzcytor10はまた、ヒト及びマウスリガンドの両者の循環レベルの検出のための診断システムにも使用され得る。関連する態様においては、マウスzcytor10に結合する抗体又は他の剤は、循環受容体ポリペプチドを検出するために使用され得る。高められたレベルか又は低められたレベルのリガンド又は受容体ポリペプチドは、病理学的状態、例えば癌の表示であり得る。

【0175】

そのような受容体ポリペプチドは、病理学的工程に寄与し、そして基礎をなす疫病の間接的マーカーであり得；マウスzcytor10可溶性受容体を発現するマウス

モデルは、ヒト病理学的工程を研究するためにモデルとして使用され得る。例えば、ヒト血清における高められたレベルの可溶性は、広範囲の炎症及び腫瘍性状態、例えば心筋梗塞、ぜん息、重症筋無力症、リウマチ様関節炎、急性T - 細胞白血病、B - 細胞リンパ腫、慢性リンパ性白血病、結腸癌、乳癌及び卵巣癌に関連している (Heaneyなど., Blood87 : 847 - 857 , 1996)。

【0176】

マウスzcytor10受容体又は“可溶性受容体”のリガンド - 結合ポリペプチドは、マウスzcytor10サイトカイン結合ドメイン (ネズミ受容体 (配列番号2) の残基15 (Cys) ~ 230 (Pro) ; 又は配列番号2の残基17 (Ala) ~ 232 (Pro))、又はマウスパラ体又は非マウス受容体のその対応する領域をコードする切断されたDNAを発現することによって調製され得る。好ましくは、細胞外ドメインは、トランスメンブラン及び細胞内ポリペプチドセグメントを実質的に有さない形で調製され得る。

【0177】

さらに、上記マウスzcytor10サイトカイン結合ドメイン内のリガンド - 結合ポリペプチドフラグメントはまた、本明細書に記載される使用のためのマウスzcytor10可溶性受容体として作用することができる。宿主細胞化らの受容体ポリペプチドの輸送を方向づけるためには、受容体DNAは、分泌ペプチド、例えばt - PA分泌ペプチド又はマウスzcytor10分泌ペプチドをコードする第2 DNAセグメントに結合される。分泌された受容体ポリペプチドの精製を促進するためには、C - 末端延長、例えばポリ - ヒスチジン標識、物質P, Flag™ ペプチド (Hoppなど., Bio/Technology6 : 1204-1210, 1988; Eastman Kodak Co., New Haven, CTから入手できる)、又は抗体又は他の特定の結合剤が利用できるもう1つのポリペプチド又はタンパク質が、受容体ポリペプチドに融合され得る。

【0178】

もう1つのアプローチにおいては、受容体細胞外ドメインは、2種の不変領域ドメインを含み、そして可変領域を欠いている、免疫グロブリン、H鎖不変領域、典型的には、Fcフラグメントとの融合体として発現され得る。そのような融合体は典型的には、マルチマー分子として分泌され、ここでFc部分はお互いジスル

フィド結合され、そして2種の受容体ポリペプチドがお互い密接に接近して整列されている。このタイプの融合体は、溶液から同種リガンドを親和性精製するために、インビトロアッセイ手段として、リガンドを特異的に滴定することによってインビボでシグナルを阻止するために、及び循環リガンドを結合し、そしてそれを循環から洗浄するために、それらを非経口投与することによってインビボでのアンタゴニストとして使用され得る。

【0179】

リガンドを精製するためには、マウスzcytor10 - Igキメラが、リガンドを含むサンプル（例えば、細胞 - ならし培地又は組織抽出物）に、受容体 - リガンド結合を促進する条件（典型的には、生理学的に近い温度、pH及びイオン強度）下で添加される。次に、キメラ - リガンド複合体が、固体支持体（例えば、不溶性樹脂ビーズ）上に固定されているタンパク質Aを用いて、混合物により分離される。次に、リガンドは、従来の化学的技法、例えば塩又はpHグラジエントを用いて溶出される。他方では、キメラ自体は、固体支持体に結合され、そして結合及び溶出は上記のようにして行われる。集められた画分は、所望する純度に達するまで、再分別され得る。

【0180】

さらに、マウスzcytor10可溶性受容体は、リガンドの存在が所望されない治療又は他の用途のためのネズミモデルにおいて、インビボ又はインビトロでリガンドを結合するために、“リガンドシンク (ligand sink)”、すなわちアンタゴニストとして使用され得る。同様に、マウスzcytor10可溶性受容体は、治療又は他の用途のためにインビトロ又はインビボでヒトリガンドを結合するためのアンタゴニストとして使用され得る。

【0181】

例えば、多量の生物活性zcytor10リガンドを発現する癌においては、マウスzcytor10可溶性受容体は、インビボで、リガンドの直接的なアンタゴニストとして使用され得、そして疾病に関連する進行及び病状の低下を助けることができる。さらに、マウスzcytor10可溶性受容体は、zcytor10受容体を過剰発現する癌の進行を、それらの癌の増殖を増強するリガンドをインビボで結合することによって

遅延するために使用され得る。マウスzcytor10可溶性受容体のための類似するインビトロ用途が、例えば、マウスzcytor10リガンドの不在下で増殖する細胞系を選択するために負の選択として使用され得る。

【0182】

さらに、マウスzcytor10可溶性受容体は、インビボで、又は組織サンプル、例えばヒトオルト体リガンドを発現するヒト癌及び組織において、zcytor10リガンド - 発現性癌を検出するために、インビボで又は診断用途において使用され得る。例えば、マウスzcytor10可溶性受容体は、本明細書に記載されるような放射性ラベル又は蛍光ラベルに接合され得、そしてインビトロリガンド - 受容体型結合アッセイ又は蛍光イメージングアッセイを用いて、組織サンプルにおけるヒト又はマウスリガンドの存在を検出するために使用され得る。さらに、放射性ラベルされたマウスzcytor10可溶性受容体は、当業界において知られている放射性 - イメージングを通して、リガンド発現性固形腫瘍を検出するために、インビボで投与され得る。

【0183】

サイトカイン受容体として、免疫細胞の増殖、分化及び/又は活性化における、及び免疫応答の開発及び調節におけるマウスzcytor10受容体についての役割が示される。マウスzcytor10とそのリガンドとの相互作用は、骨髓性細胞の増殖及び進化を刺激することができ、そしてIL-2, IL-6, LIF, IL-11及びOSM (Baumannなど, J. Biol. Chem. 268: 8414-8417, 1993) のように、肝細胞において急性相タンパク質合成を誘発することができる。

【0184】

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

【0185】

発現された組換え体マウスzcytor10ポリペプチド（又はマウスzcytor10キメラ又は融合ポリペプチド）は、分別及び/又は従来 of 精製方法及び媒体を用いて精製され得る。硫酸アンモニウム沈殿及び酸又はカオトロピック剤抽出は、サンプルの分別のために使用される。典型的な精製段階は、ヒドロキシアパタイト、サイズ排除、FPLC及び逆相高性能液体クロマトグラフィーを包含する。適切なクロマトグラフィー用媒体は、誘導体化されたデキストラン、アガロース、セルロース、ポリアクリルアミド、特別なシリカ及び同様のものを包含する。PEI、DEAE、QAE及びQ誘導体が好ましい。

【0186】

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

【0187】

カップリング化学物質の例は、臭化シアン活性化、N - ヒドロキシスクシンイミド活性化、エポキシド活性化、スルフヒドリル活性化、ヒドラジド活性化及びカルボジイミド カップリング化学物質のためのカルボキシル及びアミノ誘導体を包含する。それらの及び他の固体媒体は当業界において良く知られており、そして広く使用されており、そして商業的供給者から入手できる。支持媒体にリガンド又は受容体ポリペプチドを結合するための方法は当業界において良く知られている。特定方法の選択は、通常のことであり、そして選択された支持体の性質により一部決定される。例えば、Affinity Chromatography: Principles & Methods, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden, 1988を参照のこと。

【0188】

本発明のポリペプチドは、アニオン及びカチオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除、及び親和性クロマトグラフィーを包含する方法の組み合わせより単離され得る。例えば、固定された金属イオン吸着 (IMAC) クロマトグラフィーが、ヒスチジンに富んでいるタンパク質、及びポリヒスチジン標識を含んでなるそれらのタンパク質を精製するために使用され得る。手短に言及すれば、ゲルがまず、二価金属イオンにより荷電され、キレートが形成される (Sulkowski, Trends in Biochem. 3: 1-7, 1985)。

【0189】

ヒスチジンに富んでいるタンパク質が、使用される金属イオンに依存して、異なった親和性を有するこのマトリックスに吸着され、そして競争溶出、pHの低下、又は強いキレート化剤の使用により溶出されるであろう。他の精製方法は、レクチン親和性クロマトグラフィー及びイオン交換クロマトグラフィーによるグリコシル化されたタンパク質の精製を包含する (Methods in Enzymol., Vol. 182, "Guide to Protein Purification", M. Deutscher, (ed.), Acad. Press, San Diego, 1990, pp. 529-39)。本発明のさらなる態様においては、興味あるポリペプチド、及び親和性標識 (例えばマルトース-結合タンパク質、FLAG標識、Glu-Gku標識、免疫グロブリンドメイン) の融合体が、精製を促進するために構成され得る。

【0190】

さらに、当業界において記載される方法を用いて、ポリペプチド融合体又はハイブリッドマウスzcytor10タンパク質が、他のマウス又はヒトサイトカイン受容体ファミリータンパク質、又は異種タンパク質と組合して、本発明のマウスzcytor10の領域又はドメインを用いて構成される (Sambrook など., 前記; Altschul など., 前記; Picard, Cur. Opin. Biology, 5: 511-5, 1994及びそれらにおける引例)。それらの方法は、興味あるポリペプチドにおける大きなドメイン又は領域の生物学的重要性の決定を可能にする。そのようなハイブリッドは、反応運動学、結合を変更し、基質特異性を抑制し、又は拡張し、又はポリペプチドの組織及び細胞局在性を変更し、そして未知の構造のポリペプチドに適用される。

【0191】

融合タンパク質は、その融合タンパク質の個々の成分を調製し、そしてそれらを化学的に接合することによって、当業者に知られている方法により調製され得る。他方では、正しく読み取り枠を整合して融合タンパク質の1又は複数の成分をコードするポリヌクレオチドは、既知の技法を用いて生成され、そして本明細書に記載される方法により発現され得る。例えば、生物学的機能を付与するドメインの一部又はすべてが、本発明のマウスzcytor10と、もう1つのサイトカインファミリーメンバーからのその機能的に同等のドメインとの間で交換され得る。

【0192】

そのようなドメインは次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：分泌シグナル配列、細胞外サイトカイン結合ドメイン、トランスメンブランドメイン、及び細胞内シグナル化ドメイン、Box I及びBox II、哺乳類シグナル化モチーフ、及びモチーフ1-6。そのような融合タンパク質は、構成される融合体に依存して、本発明のポリペプチド又は他の既知のファミリータンパク質と同じか又は類似する生物学的機能プロフィールを有することが予測される。さらに、そのような融合タンパク質は、本明細書に開示されるように、他の性質も示すことができる。

【0193】

標準の分子生物学及びクローニング技法が、マウスzcytor10ポリペプチドと、それらが融合されるそれらのポリペプチド（例えば、ヒトzcytor10又は他のサイトカイン受容体）との間の同等のドメインを交換するために使用され得る。一般的に、興味あるドメイン、例えば本明細書に記載されるマウスzcytor10ドメインをコードするDNAセグメントが、追加のポリペプチド（例えば、他のサイトカイン受容体、例えばIL-2R, IL-3R, IL-2R, EPO受容体又は同様のものからのドメイン又は領域）をコードする少なくとも1つの他のDNAセグメントに読み取り枠を接合して作用可能に結合され、そして本明細書に記載されるように、適切な発現ベクター中に挿入される。

【0194】

一般的に、DNA構造体は、ポリペプチドのその対応する領域をコードするいく

つかのDNAセグメントが、完全な融合タンパク質又はその機能的部分をコードする単一の構造体を製造するために読み取り枠を整合して、作用可能に連結されるように、製造される。例えばDNA構造体は、N-末端からC-末端側に、単一のポリペプチドを含んで成る融合タンパク質、続いて、サイトカイン結合ドメイン、続いてトランスメンブランドメイン、続いて細胞内シグナル化ドメインをコードする。そのような融合タンパク質は、本明細書に記載されるように、発現され、単離され、そして活性についてアッセイされ得る。

【0195】

マウスzcytor10ポリペプチド又はそのフラグメントはまた、化学的合成を通して調製され得る。マウスzcytor10ポリペプチドはモノマー又はマルチマーであり得；グリコシル化されても又はグリコシル化されなくても良く；ペルギレ-ト化されても又はペルギレ-トされなくても良く；そして開始メチオニンアミノ酸残基を含んでも又は含まなくても良い。

【0196】

本発明のポリペプチドはまた、排除固相合成、部分固相合成、フラグメント縮重又は従来の溶液合成により合成され得る。ポリペプチドを合成するための方法は、当業界において良く知られている。例えば、Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, 1963; Kaiserなど., Anal. Biochem. 34: 585, 1970を参照のこと。固体支持体上での所望するペプチドの完全な合成の後、ペプチド-樹脂は、その樹脂からポリペプチドを分解する試薬と共に存在し、そしてほとんどの側鎖保護基を除去する。そのような方法は、当業界において十分に確立されている。

本発明の分子の活性は、細胞の分化及び増殖を側定する種々のアッセイを用いて測定され得る。そのようなアッセイは、当業界において良く知られている。

【0197】

本発明のタンパク質は、例えば、リンパ性、免疫性、炎症性、脾臓性、血液又は骨疾患の処理において有用であり、そして培養された細胞を用いてインビトロで、又は適切な動物モデルに本発明の分子を投与することによってインビボで測定され得る。例えば、zcytor10可溶性受容体ポリペプチドを発現する宿主細胞は、アルギン酸塩環境下で包埋され、そして受容体動物中に注入（移植）され得る。

。アルギネート - ポリ - L - リシン微小封入、透過性膜封入及び拡散チャンバーは、トランスフェクトされた哺乳類細胞又は一次哺乳類細胞を捕獲するための手段として記載されている。

【0198】

それらのタイプの非免疫原性“封入”は、微小環境への栄養物ノトランスファーを可能にしそして又は、捕獲された細胞により分泌され又は開放されるタンパク質及び他の高分子の受容体動物への拡散を可能にする。最も重要なことには、カプセル又は微小環境は、受容体動物の免疫応答から外来性の包埋された細胞をマスクし、そして遮断する。そのような微小環境は、注入される細胞の寿命を、数時間又は数日（裸細胞）から数週間（包埋された細胞）まで拡張することができる。アルギン酸塩系は、包埋された細胞を生成するための単純且つ迅速な手段を提供する。

【0199】

アルギン酸塩系を生成するために必要とされる材料は、当業者に知られている。製造されると、そのアルギン酸塩系は、インビトロで、及びその系を用いて得られるデータに基づいて、インビボで、比較的強く且つ耐久性がある。そのアルギン酸塩系は容易に操作でき、そしてその方法論は多くの調製のために評価できる。典型的な方法においては、3%のアルギン酸塩が、無菌水において調製され、そして滅菌濾過される。アルギン酸塩系の調製の直前、アルギン酸塩溶液が再び濾過される。約50%の細胞懸濁液（1ml当たり約 5×10^5 個～約 5×10^7 個の細胞を含む）が3%アルギン酸塩溶液と共に混合される。

【0200】

1mlのアルギン酸塩/細胞懸濁液が、約15分間にわたって、100mMの滅菌濾過されたCaCl₂溶液中に押し出され、“糸（Thread）”が形成される。次に、押し出された糸は、50mMのCaCl₂の溶液に移され、そして次に25mMのCaCl₂の溶液に移される。次に、糸が、脱イオン水によりすすがれ、その後、ポリ-L-リシンの0.01%溶液においてインキュベートすることによって糸を被覆する。最後に、糸は乳酸塩化されたリンガー溶液によりすすがれ、そして注射器（針のない）中に溶液から抜き取られる。次に大きな孔の針がその注射器につけられ、そ

して糸が最少量の乳酸塩化されたリンガー溶液において受容体中の腹腔内注入される。

【0201】

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

【0202】

アデノウイルスシステムは次のいくつかの利点を付与する：(i) アデノウイルスは比較的大きなDNA挿入体を適応せしめることができ；(ii) 高い力価に増殖され得；(iii) 広範囲の哺乳類細胞型を感染せしめ；そして(iv) 多数の異なったプロモーター、例えば偏在する、組織特異的、及び調節可能なプロモーターと共に使用され得る。また、アデノウイルスは血流において安定しているため、それらは静脈内注射により投与され得る。

【0203】

アデノウイルスゲノムの一部が欠失されているアデノウイルスを用いて、直接的な結合により又は同時トランスフェクトされたプラスミドとの相同組換えにより、ウイルスDNA中に組み込まれ得る。典型的なシステムにおいては、必須E1遺伝子がウイルスベクターから欠失され、そしてウイルスは、E1 遺伝子が宿主細胞(ヒト293細胞系が典型である)により供給されなければ、複製しないであろう。損なわれていない動物に静脈内投与される場合、アデノウイルスは主に、肝臓を標的化する。

【0204】

アデノウイルス供給システムがE1 遺伝子欠失を有する場合、ウイルスは宿主細胞において複製することができない。しかしながら、宿主の組織(例えば、肝臓)は、異種タンパク質を発現し、そしてプロセッシングするのである(そし

て、分泌シグナル配列が存在する場合、分泌する)。分泌されたタンパク質は高く血管化された肝臓において循環に入り、そして感染された動物に対する効果が決定され得る。

【0205】

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

【0206】

アデノウィルスシステムはまた、インビトロでのタンパク質生成のためにも使用され得る。アデノウィルス感染された非-293細胞を、その細胞が急速に分裂しないような条件下で培養することによって、前記細胞は長時間、タンパク質を生成することができる。例えば、BHK細胞は、細胞工場において集密性まで増殖され、次に興味ある分泌されたタンパク質をコードするアデノウィルスベクターに暴露される。次に、細胞が、有意な細胞分裂を伴わないで、感染された細胞の数週間の生存を可能にする血清フリー条件下で増殖せしめられる。

【0207】

他方では、アデノウィルスベクター感染された293S細胞が、有意な量のタンパク質を生成するために、比較的高い細胞密度で、付着細胞として、又は懸濁培養において増殖せしめられ得る (Garnier など., Cytotechnol. 15: 145 - 55, 1994 を参照のこと)。いずれかのプロトコールにより、発現され、分泌された異種タンパク質が、細胞における発現されたタンパク質の素因に依存して、細胞培

養物上清液、溶解物又は、膜画分から反復して単離され得る。感染された293S細胞生成プロトコールにおいては、分泌されていないタンパク質が効果的に得られる。

【0208】

マウスzcytor10に関して観察されるクラスIサイトカイン構造の観点においては、アゴニスト（生来のリガンド/基質/補因子/等を包含する）及びアンタゴニストは、インビトロ及びインビボ用途において莫大な可能性を有する。マウスzcytor10アゴニストとして同定される化合物は、インビオロ及びインビボで、免疫及び造血細胞の増殖の刺激において有用である。例えば、マウスzcytor10及びアゴニスト化合物は、定義された細胞培養培地の化合物として有用であり、そして細胞培養において通常使用される血清を置換するために、単独で又は他のサイトカイン及びホルモンと組合して使用され得る。

【0209】

従って、アンタゴニストは、培養物におけるT-細胞、B-細胞、及びリンパ性及び骨髄系の増殖及び/又は進化を特異的に促進することにおいて有用である。さらに、マウスzcytor10可溶性受容体、アゴニスト又はアンタゴニストは、単離された一次骨髄培養物からのコロニー形成の刺激を測定するためにも有用である。そのようなアッセイは、当業界において良く知られている。

【0210】

アンタゴニストはまた、リガンド-受容体の部位を特徴づけるための研究試薬としても有用である。マウスzcytor10活性（マウスzcytor10アンタゴニスト）の阻害は、抗-マウスzcytor10抗体及び可溶性マウスzcytor10受容体、並びに他のペプチド及び非-ペプチド剤（例えば、リボザイム）を包含する。

【0211】

マウスzcytor10はまた、その活性のインヒビター（アンタゴニスト）を同定するためにも使用され得る。試験化合物は、マウスzcytor10の活性を阻害する化合物を同定するために、本明細書に開示されるアッセイに添加される。本明細書に開示されるそれらのアッセイの他に、サンプルは、マウスzcytor10結合、オリゴマー化、又はマウスzcytor10-依存性細胞応答の刺激/阻害を測定するよう企画

された種々のアッセイにより、マウスzcycor10活性の阻害について試験され得る。

【0212】

例えばマウスzcycor10 - 発現性細胞系は、マウスzcycor10 - 刺激された細胞経路に応答するレポーター遺伝子構造体によりトランスフェクトされ得る。このタイプのレポーター遺伝子構造体は、当業界において知られており、そして一般的に、アッセイ検出可能タンパク質、例えばルシフェラーゼをコードする遺伝子に作用可能に連結されるマウスzcycor10 - DNA応答要素を含むであろう。DNA応答要素は、サイクリックAMP応答要素 (CRE)、ホルモン応答要素 (HRE)、インスリン応答要素 (IRE) (Nasrin など., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5273 - 7, 1990) 及び血清応答要素 (SRE) (Shaw など., Cell 56: 563 - 72, 1989) を包含するが、但しそれらだけには限定されない。

【0213】

サイクリックAMP応答要素は、Roestler など., J. Biol. Chem. 263 (19): 9063 - 6, 1988及びHabener, Molec. Endocrinol. 4 (8): 1087 - 94, 1990に再考される。ホルモン応答要素は、Beato, Cell 56: 335 - 441, 1989に再考される。候補体化合物、溶液、混合物又は抽出物、又は種々の細胞型からのならし培地は、レポーター遺伝子発現のマウスzcycor10刺激の上昇により明らかなように、マウスzcycor10受容体の活性を増強する能力について試験される。このタイプのアッセイは、受容体の結合を通して、又はシグナルカスケードの一部の刺激により、マウスzcycor10シグナルトランスダクション活性を直接的に刺激する化合物を検出するであろう。

【0214】

それ自体、マウスzcycor10ポリペプチドに応答する細胞を供給し、試験化合物の不在下で細胞の第1部分を培養し、試験化合物の存在下で前記細胞の第2部分を培養し、そして前記細胞の第1部分に比較して、前記細胞の第2部分の細胞応答における上昇性を検出することを含んで成る、マウスzcycor10ポリペプチドのアゴニストを同定するための方法が提供される。さらに、上記のレポーター遺伝子構造体を含むが、しかしzcycor10受容体を発現しない第3細胞は、前記レポー

ターの非 - 特異的な、又は非 - マウスcytor10 - 介在性刺激を評価するための対照細胞として使用され得る。従って、アゴニスト、例えば天然のリガンドは、マウスcytor10ポリペプチド機能を刺激し、又は増強するために有用である。

【0215】

マウスcytor10リガンド - 結合ポリペプチド、又は本明細書に記載されるサイトカインドメインはまた、リガンドの精製のためにも使用される。前記ポリペプチドは、固体支持体、例えばアガロース、架橋されたアガロース、ガラス、セルロース樹脂、シリカ基材の樹脂、ポリスチレン、架橋されたポリアクリルアミド又は使用の条件下で安定している同様の材料のビーズ上に固定される。

【0216】

固体支持体にポリペプチドを結合するための方法は、当業界において知られており、そしてアミン化学、臭化シアノゲン活性化、N - ヒドロキシスクシンイミド活性化、エポキシド活性化、スルフヒドリル活性化及びヒドラジド活性化を包含する。得られる媒体は一般的に、カラムの形で形状化され、そしてリガンドを含む流体が、受容体ポリペプチドへのリガンドの結合を可能にするために、カラムに1又は複数回、通される。次に、リガンドが、塩濃度の変化、カオトロピック剤（グアニジンHCl）、又はリガンド - 受容体結合を破壊するpHを用いて溶出される。

【0217】

リガンド - 結合受容体(又は抗体、補体 / 抗補体対の1つのメンバー)、又はその結合フラグメント、及び市販のバイオセンサー装置を用いるアッセイシステムが、好都合には、使用され得る（例えば、BIAcore, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ ; 又はSELDI™ technology, Ciphergen, Inc. Palo Alto, CA）。そのような受容体、抗体、補体 / 抗補体対のメンバー、又はフラグメントは、受容体チップの表面上に固定される。この装置の使用は、Karlsson, J. Immunol. Methods 145: 229 - 40, 1991 及びCunningham and Wells, J. Mol. Biol. 234: 554 - 63, 1993により開示される。

【0218】

受容体、抗体、メンバー又はフラグメントは、アミン又はスルフヒドリル化学

を用いて、流動細胞内の金フィルムに結合されるデキストラン繊維に共有結合される。試験サンプルが細胞に通される。リガンド、エピトープ又は補体/抗補体対の反対のメンバーがサンプルに存在する場合、それは、それぞれ固定された受容体、抗体又はメンバーに結合し、金フィルムの表面のプラズモン共鳴の変化として検出される、媒体の屈折率の変化を引き起こす。このシステムは、オン-及びオフ-速度の決定を可能にし、これから、結合親和性が計算され、そして結合の化学量の評価が可能にされる。

【0219】

リガンド-結合受容体ポリペプチドはまた当業界において知られている他のアッセイシステム内でも使用され得る。そのようなシステムは、結合親和性の決定のためのスカチャード分析(Scatchard, Ann. NY. Acad. Sci. 51:660-72, 1949)及び熱量測定アッセイ(Cunningham など., Science 253: 545-48, 1991; Cunningham など., Science 245: 821-25, 1991)を包含する。

【0220】

マウスzcytor10ポリペプチドはまた、マウスzcytor10エピトープ、ペプチド又はポリペプチドに特異的に結合する抗体を調製するためにも使用され得る。マウスzcytor10ポリペプチド又はそのフラグメントは、動物を接種し、そして免疫応答を誘発するための剤(免疫原)として作用する。当業者は、抗原性エピトープ担持のポリペプチドがzcytor10ポリペプチド(例えば、配列番号2)の少なくとも6、好ましくは少なくとも9及びより好ましくは少なくとも15~約30個の連続したアミノ酸残基を含むことを認識するであろう。zcytor10ポリペプチドの大きな部分、すなわちアミノ酸配列の10~30個の残基~その全体の長さの残基を含んでなるポリペプチドが含まれる。

【0221】

抗原又は免疫原エピトープはまた、本明細書に記載されるように、結合された標識、アジュバンド及びキャリアを含むことができる。適切な抗原は、配列番号2のアミノ酸番号15(Cys)~アミノ酸番号357(Leu)によりコードされるマウスzcytor10ポリペプチド、又は連続した9~343個のそのアミノ酸フラグメントを含む。同様に、適切な抗原は、2のアミノ酸番号17(Ala)~アミノ酸番号3

59 (Leu)、又は連続したその9～343個のアミノ酸フラグメントを包含する。

【0222】

抗原として使用するための好ましいペプチドは、本明細書に開示されるサイトカイン結合ドメイン、細胞内シグナル化ドメイン、Box I及びBox II、ブロック1、哺乳類シグナル化モチーフ、及びモチーフ1-6、及びマウスzcytor10親水性ペプチド、例えば埋もれたG、S及びT、及び暴露されたH、Y及びW残基が無視される、スライド性6-残基鏡に基づいて、Hopp/Woods親水性プロフィールから決定される、疎水性プロットから当業者により推定されるそれらのペプチドである。

【0223】

マウスzcytor10親水性ペプチドは、

- (1) 配列番号2のアミノ酸番号150 (Arg)～アミノ酸番号155 (Asp)；
- (2) 配列番号2のアミノ酸番号254 (Arg)～アミノ酸番号259 (Ala)；
- (3) 配列番号2のアミノ酸配列番号296 (Ala)～アミノ酸番号301 (Glu)；
- (4) 配列番号2のアミノ酸番号297 (Arg)～アミノ酸番号302 (Asp)；及び
- (5) 配列番号2のアミノ酸番号310 (Lys)～アミノ酸配列番号315 (Glu)から成る群から選択されたアミノ酸配列；

を成る群から選択されたアミノ酸配列；

を含んで成るペプチドを包含する。

【0224】

配列番号35のその対応するzcytor10親水性ペプチドはまた、配列番号35に対応する上記親水性ペプチド配列番号2の比較にも包含される。さらに、保存されたモチーフ、及びマウスzcytor10の保存されたモチーフ間の可変領域が適切な抗原である。この免疫応答から生成される抗体は、本明細書に記載のようにして単離され、そして精製され得る。ポリクローナル及びモノクローナル抗体を調製し、そして単離するための方法は、当業界において良く知られている。

【0225】

例えば、Current Protocols in Immunology, Cooligan, など., (eds.), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995; Sambrook など., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring

Harbor, NY, 1989; 及びHurrell, J.G.R., Ed., Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1982を参照のこと。

【0226】

当業者に明らかなように、ポリクローナル抗体は、種々の温血動物、例えば馬、ウシ、ヤギ、羊、犬、鶏、ウサギ、マウス、及びラットを、マウスzcytor10ポリペプチド又はそのフラグメントにより接種することにより生成され得る。マウスzcytor10ポリペプチドの免疫性は、アジュバント、例えばミヨウバン（水酸化アルミニウム）又はフロイント完全又は不完全アジュバントの使用により高められ得る。

【0227】

免疫化のために有用なポリペプチドはまた、免疫グロブリン ポリペプチド又はマルトース結合タンパク質との融合体ポリペプチド、例えばマウスzcytor10又はその一部の融合体を包含する。ポリペプチド免疫原は、十分な長さの分子又はその一部であり得る。ポリペプチド部分が“ハプテン - 様”である場合、そのような部分は、免疫化のために、高分子キャリアー（例えば、カサガイヘモシアニン（KLH）、ウシ血清アルブミン（BSA）又は破傷風トキソイド）に都合良く連結又は結合され得る。

【0228】

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

【0229】

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

【0230】

抗体は、1) それらが限界レベルの結合活性を示す場合、及び2) それらが関連するポリペプチド分子と有意に交差反応しない場合、特異的に結合すると考えられる。限界レベルの結合は、本明細書における抗 - マウスzcytor10抗体が対照 (非 - マウスzcytor10) ポリペプチドへの結合親和性よりも少なくとも10倍高い親和性を伴って、マウスzcytor10ポリペプチド、ペプチド又はエピトープに結合するかどうか決定される。好ましくは、抗体は、 $10^6 M^{-1}$ 又はそれ以上、好ましくは $10^7 M^{-1}$ 又はそれ以上、より好ましくは $10^8 M^{-1}$ 又はそれ以上、及び最も好ましくは $10^9 M^{-1}$ 又はそれ以上の結合親和性 (Ka) を示す。抗体の結合親和性は、例えば Scatchard 分析 (Scatchard, G., Ann. NY Acad. Sci. 51: 660-672, 1949) を用いて、当業者によって容易に決定され得る。

【0231】

抗 - マウスzcytor10抗体は関連するポリペプチド分子と有意に交差反応しないかどうかは、例えば、標準のウェスタンブロット分析を用いて、マウスzcytor10ポリペプチドであるが、しかし知られていない関連するポリペプチドを検出する抗体により示される (Ausubel など., 前記)。既知の関連するポリペプチドの例は、従来技術に開示されているそれらのもの、例えば既知のオルト体及びパラ体、及びタンパク質ファミリーの類似する既知メンバーである。スクリーニングはまた、非ヒトマウスzcytor10及びマウスzcytor10変異体ポチペプチドを用いて行われ得る。さらに、抗体は、マウスzcytor10ポリペプチドに対して特異的に

結合する集団を単離するために、既知の関連するポリペプチドに“対してスクリーンされ得る”。

【0232】

例えば、マウスzcytor10に対して生ぜしめられた抗体は不溶性マトリックスに付着される関連するポリペプチドに吸着され；マウスzcytor10に対して特異的な抗体は適切な緩衝液条件下で前記マトリックスを通して流れるであろう。スクリーニングは、既知の溶接に関連するポリペプチドに対して交差反応しないポリクローナル及びモノクローナル抗体の単離を可能にする（Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; Current Protocols in Immunology, Cooligan, など. (eds.), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995）。

【0233】

特異的抗体のスクリーニング及び単離は当業界において当業界において良く知られている。Fundamental Immunology, Paul (eds.), Raven Press, 1993; Getzoffなど., Adv.in Immunol. 43: 1-98, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Goding, J.W. (eds.), Academic Press Ltd., 1996; Benjamin など., Ann. Rev. Immunol. 2: 67-101, 1984を参照のこと。特異的に結合する抗 - マウスzcytor10抗体は、当業界において知られており、そして下記に開示される多くの方法により検出され得る。

【0234】

当業者に知られている種々のアッセイがマウスzcytor10タンパク質又はペプチドに特異的に結合する抗体を検出するために使用され得る。典型的なアッセイは、Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (Eds.), Cold Speing Harbor Laboratory Press, 1988 に詳細に記載されている。そのようなアッセイの代表的な例は次のものを包含する:同時免疫電気泳動、ラジオイムノアッセイ、ラジオイムノ沈殿、酵素結合の免疫吸着アッセイ(ELISA)、ドットプロット又はウェスタンプロットアッセイ、阻害又は競争アッセイ。及びサンドイッチアッセイ。さらに、野生型対変異体のマウスzcytor10タンパク質又はペプチドに結合する抗体がスクリーンされ得る。

【0235】

本明細書において有用な抗体を生成するか又は選択するための他の技法は、インビトロで、マウスzcytor10タンパク質又はペプチドにリンパ球を暴露し、そしてファージ又は類似するベクターにおける抗体表示ライブラリーを選択すること（例えば、固定された又はラベルされたマウスzcytor10タンパク質又はペプチドの作用を通して）を包含する。可能性あるマウスzcytor10ポリペプチド結合ドメインを有するポリペプチドをコードする遺伝子は、ファージ（ファージ表示）又は細菌、例えばE. コリ上に表示されるランダムペプチドライブラリーをスクリーニングすることによって得られる。

【0236】

前記ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、多くの手段、例えばランダム突然変異誘発及びランダムポリヌクレオチド合成を通して得られる。それらのランダムペプチド表示ライブラリーは、タンパク質又はポリペプチドであり得る既知の標的物、例えばリガンド又は受容体、生物学的又は合成高分子、又は有機又は無機物質と相互作用するペプチドについてスクリーンするために使用され得る。

【0237】

そのようなランダム ペプチド表示ライブラリーを創造し、そしてスクリーニングするための技法は、当業界において知られており（Ladner など., アメリカ特許第5,223,409号；Ladner など., アメリカ特許第4,946,778号；Ladner など., アメリカ特許第5,403,484号及びLadner など., アメリカ特許第5,571,698号、及びKayなど., Phage Display of Peptides and Proteins (Academic Press, Inc. 1996)）、そしてランダムペプチド表示ライブラリー及びそのようなライブラリーをスクリーニングするためのキットは、例えばClontech (Palo Alto, CA), Invitrogen Inc. (San Diego, CA), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) 及びPharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ) から市販されている。

【0238】

ランダムペプチド表示ライブラリーは、マウスzcytor10に結合するタンパク質

を同定するために、本明細書に開示されるマウスzcytor10配列を用いてスクリーニングされ得る。マウスzcytor10ポリペプチドと相互作用するそれらの“結合ポリペプチド”は、細胞を標識するために；親和性精製によりパラ体及び相同体ポリペプチドを単離するために使用され得る；それらは薬物、トキシン、放射性核種及び同様のものに直接的にまたは間接的に接合され得る。それらの結合ポリペプチドはまた、分析方法に、例えば発現ライブラリーをスクリーニングし、そして活性を中和するために、例えばリガンドと受容体又は受容体に結合するウィルスとの間の相互作用を阻止しするためにも使用され得る。

【0239】

結合ポリペプチドはまた、ひとサンプルにおけるポリペプチドの循環レベルを決定するために；マウスモデルにおける又はzcytor10を発現するヒトサンプルにおける根本的な病理学又は疾病のマーカーとして可溶性マウスzcytor10ポリペプチドを検出し又は定量化するために、診断アッセイにも使用され得る。それらの結合ポリペプチドはまた、zcytor10結合及びシグナルトランスダクションをインビトロ及びインビボで阻止するために、zcytor10“アンタゴニス”として使用することができる。それらの抗-マウスzcytor10結合ポリペプチドは、zcytor10活性又はタンパク質を阻害するために有用である。

【0240】

マウスzcytor10に対する抗体は、マウスzcytor10を発現する細胞を標識するために；アフィニティー精製によりマウスzcytor10を単離するために；例えば、ひとサンプルにおけるマウスzcytor10ポリペプチド又はマウスzcytor10オルト体の循環レベルを決定するための診断アッセイのために；マウスモデルにおいて、又はzcytor10オルト体を発現するヒトサンプルにおいて、根本的な病理学又は疾病のマーカーとして可溶性マウスzcytor10を検出し又は定量化するために；FACSを使用する分析方法において、発現ライブラリーをスクリーニングするために；抗-インディオタイプ抗体を生成するために；及びインビトロでマウスzcytor10介在性活性を阻止するための中和抗体又はアンタゴニスとして使用され得る。

【0241】

適切な直接的標識又はラベルは、放射性核種、酵素、基質、補因子、インヒビ

ター、蛍光マーカー、化学発光マーカー、磁気粒子及び同様のものを包含し；間接的な標識又はラベルは、中間体としてのビオチン - アビジン又は他の補体 / 抗 - 補体対の使用を特徴とする。本発明書における抗体及び結合タンパク質はまた、薬物、トキシン、放射性核種、及び同様のものに直接的に又は間接的に接合され得、そしてそれらの接合体はインビボ診断又は治療用途のために使用され得る。さらに、マウスzcytor10又はそのフラグメントに対する抗体は、アッセイ、例えば当業界において知られているウェスタンブロット又は他のアッセイにおいて、変性されたマウスzcytor10又はそのフラグメントを検出するためにインビトロで使用され得る。

【0242】

マウスzcytor10に対する抗体は、受容体を発現する細胞を標識し、そしてマウスzcytor10発現レベルをアッセイするために、可溶性受容体ポリペプチドの循環レベルを決定するために診断アッセイ内での親和性精製のために、蛍光 - 活性化された細胞分類を用いる分析方法のために有用である。二価抗体は、マウスzcytor10リガンドの効果を模倣するアゴニストとして使用され得る。

【0243】

本明細書における抗体はまた、薬剤、トキシン、放射性核種及び同様のものに直接的に又は間接的に接合され得、そしてそれらの接合体は、治療用途を研究するためのネズミモデルにおいて、又は治療の用途において、インビボ診断のために使用される。例えば、本発明のマウスzcytor10を認識する抗体又は結合ポリペプチドは、対応する抗 - 相補的分子（すなわち、マウスzcytor10受容体）を発現する組織又は器官を同定し、又は処理するために使用され得る。より特定には、抗 - マウスzcytor10抗体又はその生物活性フラグメント又は一部が、検出可能な又は細胞毒性の分子に連結され、そしてzcytor10分子を発現する細胞、組織又は器官を有する哺乳類に供給され得る。

【0244】

適切な検出可能分子は、マウスzcytor10（上記に開示される結合ペプチドを包含する“結合ポリペプチド”、抗体、又はその生物活性フラグメント又は一部に直接的に又は間接的に結合され得る。適切な検出可能分子は、放射性核種、酵素

、基質、補因子、インヒビター、蛍光マーカー、化学発光マーカー、磁気粒子、及び同様のものを包含する。適切な細胞毒性分子は、ポリペプチド又は抗体に直接的に又は間接的に結合され得、そして細菌又は植物毒性（例えば、ジフテリア毒素、ブソイドモナシス内毒素、リシン、アブリン及び同様のもの）、及び治療用放射性核種、例えばI - 131、レニウム - 188又はイットニウム - 90（ポリペプチド又は抗体に直接的に結合されるか、又はキレ - ト成分により間接的に結合される）を包含する。

【0245】

結合ポリペプチド又は抗体はまた、細胞毒性薬物、例えばアドリアマイシンに結合され得る。検出可能又は細胞毒性分子の間接的な結合に関しては、検出可能又は細胞毒性分子は相補的/抗相補的対のメンバーにより結合され得、ここで他のメンバーは結合ポリペプチド又は抗体部分に結合される。それらの目的のためには、ビオチン/ストレプトタビジンが典型的な相補的/抗相補的対である。

【0246】

もう一つの態様においては、結合ポリペプチド - 毒素融合タンパク質又は抗体 - 毒素融合タンパク質は、標的化された細胞又は組織阻害又は除去（例えば、癌細胞又は組織を処理するために）のために使用され得る。他方では、結合ポリペプチドが複数の機能ドメイン（すなわち、活性化ドメイン又はリガンド結合ドメイン、及び標的化ドメイン）を有する場合、標的化ドメインのみを包含する融合タンパク質は、検出可能分子、細胞毒性分子又は相補的分子を、興味ある細胞又は組織型に向けるために適切である。例えば、単一のドメインのみを包含する融合タンパク質が相補的分子を含む場合、抗 - 相補的分子は検出可能又は細胞毒性分子に接合され得る。従って、そのようなドメイン - 相補的分子融合タンパク質は、一般的抗 - 相補的 - 検出可能/細胞毒性分子接合体のための一般的標的化ビークルを表す。

【0247】

もう一つの態様においては、マウスzcytor10 - サイトカイン融合タンパク質又は抗体 - サイトカイン融合タンパク質は、結合ポリペプチドサイトカイン又は抗 - マウスzcytor10抗体が過剰増殖性細胞を標的化する場合、標的組織（例えば、

血液、リンパ球、結腸及び骨髄癌)のインビボ殺害を増強するために使用され得る(一般的には、Hornickなど., Blood 89: 4437-4447, 1997を参照のこと)。

【0248】

記載される融合タンパク質は、作用の所望する部位へのサイトカインの標的化を可能にし、それにより、サイトカインの高められた局部濃度を提供する。適切な抗-マウスzcytor10抗体は、所望しない細胞又は組織(例えば、腫瘍又は白血病)を標的化し、そして融合されたサイトカインはエフェクター細胞による改良された標的細胞溶解を仲介する。例えば、この目的のための適切なサイトカインは、インターロイキン-2及び顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSM)を包含する。

【0249】

他方では、本明細書に記載されるマウスzcytor10結合ポリペプチド又は抗体融合タンパク質は、zcytor10-介在性アポプトシス経路を直接的に刺激することにより、標的組織のインビボ殺害の増強のために使用され、抗体又は結合ポリペプチド、例えばヒトzcytor10と交差反応するzcytor10又はオルト体配列を発現する高増殖性細胞の細胞死がもたらされる。

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

【0250】

マウスzcytor10ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、マウスzcytor10活性を高め、又は阻害することが所望される遺伝子治療用途内で有用である。哺乳類が突然変異誘発されたzcytor10遺伝子を有するか、又はそれを欠いている場合、zcytor10遺伝子が哺乳類の細胞中に導入され得る。1つの態様においては、マウスzcytor10ポリペプチドをコードする遺伝子がウィルスベクターにおいてインビボで導入される。そのようなベクターは、弱毒化された又は欠陥DNAウィルス、例えばヘルペス単純ウィルス(HSV)、乳頭種ウィルス、エプスタイン-バールウィルス(EBV)、アデノウィルス、アデノ関連ウィルス(AAV)及び同様のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない。

【0251】

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

【0252】

もう1つの態様においては、マウスzytor10遺伝子は、次の文献に記載のようにして、レトロウィルスベクターに導入され得る：Anderson など., アメリカ特許第5,399,346号；Mann など., *Cell* 33: 153, 1983；Temin など., アメリカ特許第4,650,764号；Temin など., アメリカ特許第4,980,289号；Markowitz など., *J. Virol.* 62: 1120, 1988；Temin など., アメリカ特許第5,124,263号；Dougherty など., WIPO Publication W095/07358号；及びkuo など., *Blood* 82: 845-52, 1993。

【0253】

他方では、ベクターは、リポソームを用いてのインビボリポフェクションにより導入され得る。合成カチオン脂質が、マーカをコードする遺伝子のインビボトランスフェクションのためのリポソームを調製するために使用され得る (Felgner など., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413-17, 1987；及びMackey など., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8027-31, 1988)。インビボで特定の器官中に外因遺伝子を導入するためへのリポフェクションの使用は、一定の実際的な利点を有する。

【0254】

特定細胞へのリポソームの分子標的化は、1つの領域の利点を表す。例えば、

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

【0255】

身体から細胞を除去し、そして裸DNAプラスミドとしてベクターを導入し、そして次に、身体中に形質転換された細胞を再移植することは可能である。遺伝子治療のための裸DNAベクターは、所望する宿主細胞中に、当業界において知られている方法、例えばトランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、トランスダクション、細胞融合、DEAEデキストラン、リン酸カルシウム沈殿、遺伝子ガンの使用、又はDNAベクタートランスポーターの使用により導入され得る（例えば、Wu など., J. Biol. Chem. 267: 963-7, 1992; Wu など., J. Biol. Chem. 263: 14621-24, 1988）。zcytor10を用いるマウスモデルは、その用途、安全性、効能を研究するために使用され得、そして上記に記載されるそのような遺伝子療法技法及び用途を完結することができる。

【0256】

アンチセンス方法は、マウスzcytor10遺伝子転写を阻害するために、例えばインピボでの細胞増殖を阻害するために使用され得る。マウスzcytor10 - コードのポリヌクレオチドのセグメントに対して相補的であるポリヌクレオチド（例えば、配列番号1に示されるようなポリヌクレオチド）は、マウスzcytor10 - コードのmRNAに結合し、そしてそのようなmRNAの翻訳を阻害するよう企画される。そのようなアンチセンスポリヌクレオチドは、細胞培養物、又はヒト疾病の研究、及びその用途、安全性、効能及びアンチセンス治療方法の完結の研究への使用のためのマウスモデルにおいて、マウスzcytor10ポリペプチド - コードの遺伝子の発現を阻害するために使用される。

【0257】

さらに、細胞表面分子として、マウスzcytor10ポリペプチドは、細胞中に遺伝子療法を導入するための標的物として使用され得る。この用途は、マウスzcytor

10が通常発現される細胞、例えばリンパ組織及びPBL、又はマウスzcytor10ポリペプチドを発現できる癌細胞中に治療遺伝子を導入するために、特に適切である。例えば、上記のようなウイルス遺伝子療法は、ウイルス受容体よりもむしろ細胞受容体、例えばマウスzcytor10ポリペプチドを発現する特定の細胞型に標的化され得る。

【0258】

抗体、又は標的細胞表面上のマウスzcytor10分子を認識する他の分子が、ウイルスの感染を方向づけ、そして標的細胞に遺伝子治療材料を投与するために使用され得る。Woo, S.L.C. *Nature Biotech.* 14: 1538, 1996; Wickham, T.J. など., *Nature Biotech.* 14: 1570-1573, 1996; Douglas, J.T. など., *Nature Biotech.* 14: 1574-1578, 1996; Rihova, B., *Crit. Rev. Biotechnol.* 17: 149-169, 1997; 及びVile, R.G. など., *Mol. Med. Today* 4: 84-92, 1998を参照のこと。

【0259】

例えば、マウスzcytor10 - 特異的抗体に結合されるウイルス - 中和性Fabフラグメントを含む二特異的抗体が、マウスzcytor10受容体を発現する細胞にウイルスを方向づけ、そして遺伝子要素を含むウイルスの細胞中への効果的侵入を可能にするために使用され得る。例えば、Wickham, T.J. など., *J. Virol.* 71: 7663-7669, 1997; 及びWickham, T.J., など., *J. Virol.* 70:6831-6838, 1996 を参照のこと。zcytor10を用いるマウスモデルは、その用途、安全性、効能を研究し、そして上記に論じられるそのような遺伝子療法技法及び用途を完結するために使用され得る。

【0260】

本発明はまた、診断用途に使用できる試薬を提供する。例えば、マウスzcytor10遺伝子、マウスzcytor10 DNA又はRNAを含んで成るプローブ、又はそれらの副配列が、マウスzcytor10オルト体遺伝子がヒト染色体上に存在するかどうか、又は遺伝子突然変異が生じたかどうか決定するために、マウス染色体上のネズミzcytor10遺伝子の位置を決定するために使用され得る。マウスzcytor10遺伝子座での検出できる染色体異常型は、異数体、遺伝子コピー数の変化、挿入、欠失、制

限部位の変化及び転位を包含するが、但しそれらだけには限定されない。

【0261】

そのような異常型は、分子遺伝子技法、例えば制限フラグメント長さ多型現象 (RFLP) 分析、PCRを用いての短いタンDEM反復体 (STR) 分析、及び当業界において知られている他の遺伝子連鎖分析技法を用いることによって、本発明のポリヌクレオチドを用いて検出され得る (Sambrookなど., 前記; Ausubelなど., 前記; Marian, Chest 108: 255-65, 1995)。

【0262】

放射線ハイブリッドマッピングは、哺乳類染色体の高い解像度の連続地図を構成するために開発された体細胞遺伝子技法である (Coxなど., Science 250; 245-50, 1990)。遺伝子配列の部分的又は完全な知識は、染色体放射線ハイブリッドマッピングパネルによる使用のために適切なPCRプライマーの企画を可能にする。完全なヒトゲノムをカバーする放射線ハイブリッドマッピングパネル、例えばStanford G3 RHパネル及びGeneBridge 4 RHパネルは市販されている (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL) は市販されている。

【0263】

それらのパネルは、遺伝子、配列 - 標識された部位 (STS)、及び興味ある領域内の他の非多型現象及び多型現象マーカーの急速な、PCRに基づく染色体位置決定及び整列を可能にする。これは、興味ある新しく発見された遺伝子と前にマッピングされたマーカーとの間を直接的に比例する物理的距離の確立を包含する。遺伝子位置の正確な知識は、次のような多くの目的のために有用である: 1) 配列が存在するコンティグの一部であるかどうかの決定及び種々の形、例えばYAC, BAC又はcDNAクローンにおける追加の周囲遺伝子配列の獲得; 2) 同じ染色体領域への結合を示す遺伝的な疾病についての可能な候補体遺伝子の提供; 及び3) 特定のヒトcytor10オルト体遺伝子が有する機能の決定を助けるモデル生物、例えばマウスの相互参照。

【0264】

配列標識された部位 (STS) はまた、染色体位置決定のために独立的に使用される。STSは、ヒトゲノムにおいてユニークであるDNA配列であり、そして特定の

染色体又は染色体の領域のための参照点として使用され得る。STSは、すべての他のゲノム配列の存在下でこの部位を特異的に検出するためにポリメラーゼ鎖反応に使用される一対のオリゴヌクレオチドプライマーにより定義される。STSは、DNA配列に単独で基づかれているので、それらは電子データベース、例えばDatabase of Sequence Tagged Sites (dbSTS)、GenBank (National Center for Biological Information, National Institutes of Health, Bethesda, MD, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)内に完全に記載され得、そしてそれらの短いゲノムランドマークSTS配列内に含まれるマッピングデータにより、興味ある遺伝子配列を調べられ得る。

【0265】

さらに、マウスzcytor10変異体及びトランスジェニックマウスは、ヒト遺伝子疾患のためのマウスモデルとして使用され得る。生来のzcytor10遺伝子座の過剰発現又は過少発現が、ヒト遺伝性疾患状態に対応するネズミ表現型をもたらす。同様に、マウスzcytor10遺伝子座自体における欠失又は突然変異は、ヒト遺伝子疾患状態に対応するネズミ表現型をもたらすことができる。本発明の分子、例えば本発明のポリペプチド、アンタゴニスト、アゴニスト、ポリヌクレオチド及び抗体は、ヒトオルト体における欠失に対応するマウスzcytor10遺伝子欠陥に関連する検出、診断予防及び処理を助け、そしてヒト疾病の理解を助ける。

【0266】

“トランスジェニックマウス”として言及される、マウスzcytor10遺伝子を発現するように構築されたマウス、及び“ノックアウトマウス”として言及される、マウスzcytor10遺伝子機能の完全な不在を示すマウスがまた、生成され得る (Snouwaertなど., Science 257: 1083, 1992; Lowellなど., Nature 366: 740-742, 1993; Capecchi, Science 244: 1288-1292, 1989; Palmiterなど., Annu. Rev. Genet. 20: 465-499, 1986)。例えば、偏在的に、又は組織 - 特異的又は組織 - 制限されたプロモーター下でマウスzcytor10を過剰発現するトランスジェニックマウスは、過剰発現が表現型を引き起こすかどうかを決定するために使用され得る。

【0267】

例えば、野生型マウスzcytor10ポリペプチド、そのポリペプチドフラグメント又は変異体の過剰発現は、正常な細胞工程を変更することができ、マウスzcytor10発現が機能的に適切であり、そしてマウスzcytor10、そのアゴニスト又はアンタゴニストのための治療標的物を示すことができる組織を同定する表現型をもたらす。例えば、構築する好ましいトランスジェニックマウスは、“優性 - 陰性”表現型を発現するもの、例えば結合されるトランスメンブランダメイン（マウスzcytor10トランスメンブランダメインが使用される場合、配列番号2のアミノ酸15（Cys）～アミノ酸251（Leu）、又は配列番号35のアミノ酸17（Ala）～アミノ酸254（Leu））と共に、マウスzcytor10細胞外サイトカイン結合ドメイン（配列番号2のアミノ酸15（Cys）～アミノ酸230（Pro）、又は配列番号35のアミノ酸17（Ala）～アミノ酸232（Pro））過剰 - 発現するものである。

【0268】

さらに、そのような過剰発現は、ヒト疾病との類似性を示す表現型をもたらすことができる。同様に、ノックアウトマウスzcytor10マウスは、マウスzcytor10がインビボで絶対的に必要とされる場所を決定するために使用され得る。ノックアウトマウスの表現型は、マウスzcytor10アンタゴニスト、例えば本明細書に記載されるそれらのもののインビボ効果を予測することができる。

【0269】

それらのマウスは、マウスzcytor10遺伝子及びそれによりコードされるタンパク質をインビボシステムにおいて研究するために使用され得、そして対応するヒト疾病のためのインビボモデルとして使用され得る。さらに、本明細書に記載される、マウスzcytor10に対して向けられた、マウスzcytor10アンチセンスポリヌクレオチド又はリボザイムのトランスジェニックマウス発現がまた、上記トランスジェニックマウスと同じようにして使用され得る。研究が、精製されたマウスzcytor10タンパク質の投与により行われ得る。

【0270】

本発明は、次の非制限的な例によりさらに例示される。

実施例

例1：十分な長さのマウスzcytor10を得るために、EST配列を用い、そしてネ

ズミcDNAライブラリーをスクリーニングしてのマウスzcytor10の同定

A. 要約：

翻訳されたDNAデータベースの走査は、クラスIサイトカイン受容体ファミリーのメンバーについての部分配列であることが見出されるマウス発現された配列標識 (EST) 配列の同定をもたらした。ネズミcDNAライブラリーのハイブリダイゼーションスクリーニングの後、十分な長さのクローンを同定し、そして配列決定した。このクラスIサイトカイン受容体は、マウスzcytor10として命名された。

【0271】

B. ネズミcDNAライブラリーをスクリーンするためへのEST配列プローブの使用：

433個の塩基対プローブを、PCR反応において、鋳型として、プライマーZC14603 (配列番号5) 及びZC14606 (配列番号6)、元のEST (EST631772) をコードするcDNA 0.5ngを用いて生成した。PCR反応条件は次の通りであった：95 で30秒、60 で15秒、72 で1分 (30サイクル)；続いて72 で1分；続いて10 でのソーキング。

【0272】

PCR反応生成物のサンプルを、1.5%アガロースゲル上で試験した。約400bpの発現されたサイズのバンドが見られた。PCR生成物を、Chromaspin400カラム (Clontech) を用いて精製した。精製された生成物を、Rediprimell™ (Amersham), すなわちプライムラベリングシステムを用いて、製造業者の説明書に従って、³²P-dCTPにより放射性ラベルした。次に、プローブを、Nuc-Trap™ カラム (Stratagene, La Jolla, CA) を用いて、製造業者の説明書に従って精製した。

【0273】

LambdaTripIE™ (Clontech) において構成された17日目のマウス胚cDNAライブラリー (Clontech) からの百万個のクローンをスクリーンした。ライブラリープレートイング及びスクリーニングを製造業者の説明書に従って行った。上記に記載される³²P-dctp - ラベルされたプローブ20ngを用いて、百万個のファージクローンを表す20個のフィルターをプローブした。フィルターを、0.25 × SSC, 0.1%のDSDにより60 で洗浄した。2つの陽性ファージを、スクリーニングから得た。ファージからのファージミド (phagmid) を、ライブラリー売主の使用法に従

って、インビトロ切除により単離した。pSLMR10-1, -2, -3, -4と称する4種のファージミドを、配列決定した。

【0274】

十分な長さの配列の確認を、次のプライマーを用いて配列決定された、1つのクローン、すなわちpSLMR10-2からの配列分析により行った：ZC14603（配列番号5）、ZC14606（配列番号6）、ZC694（配列番号7）、ZC8938（配列番号8）、ZC16548（配列番号9）及びZC16550（配列番号10）。挿入体は1455bpであり、そして十分な長さであった。

【0275】

例2：マウスzcytor10受容体組織分布

ノザンプロット分析を、Mouse Multiple Tissue Northern™ Blots (Mouse MTN and Mouse Embryo MTN) (Clontech) を用いて行った。十分な長さのマウスプローブを、鋳型としてのマウスcDNAプラスミド及びプライマーとしてオリゴZC17,213（配列番号11）及びZC17,314（配列番号12）からのPCRにより生成した。PCR条件は次の通りであった：95 で1分、55 で1分、72 で2分（35分サイクル）；72 で10分；4 で一晩。PCR反応生成物のサンプルを、1%低融点アガロースゲル（BoehringerMannheim, Indianapolis, IN）上で試験した。1.9kbの予測されるサイズのバンドが見られた。

【0276】

1.9kbのPCRフラグメントを、市販のキット（Qiaquick Gel Extraction Kit™, Qiagen, Valencia, CA）を用いてゲル精製し、そしてPrime It II™ (Stratagene), すなわちランダムプライムラベリングシステムにより放射性ラベリングした。プローブを、Nuc - Trap™ カラム（Stratagene）を用いて、製造業者の説明書に従って精製した。ExpressHyb™ (Clontech) 溶液を、プレハイブリダイゼーションのために、及びノザンプロットのためのハイブリダイジング溶液として使用した。

【0277】

ハイブリダイゼーションは、 $1 \sim 2 \times 10^6$ cpm/ラベルされたプローブ1mlを用いて、65 で2時間、生じた。次に、プロットを、 $2 \times$ SSC/1%SDSにより25 で15

分間、4度、続いて、 $0.1 \times \text{SSC}/0.1\% \text{SDS}$ により50 で30分間、3度、洗浄した。約1.35kbの転写体を、心臓、脾臓、肺、肝臓及び精巣において検出した。弱いバンドが、7日目のマウス胚において観察された。

【0278】

例3：ラットzcytor10配列

ラットESTを、ネズミzcytor10受容体のオルト体として同定した。ESTは、zcytor10トランスメンブランドメイン、及び停止コドンを通しての完全な細胞内領域を包含している。オリゴを、ZC24,055 (配列番号13) 及びZC23,711 (配列番号14) と命名した。ラット腎臓cDNAライブラリー (Clontech) を、次の条件下でPCR反応において上記オリゴを用いてスクリーンした：95 で1分、55 で1分及び72 で1分 (35サイクル) ; 72 で10分 ; 4 で一晩。PCR反応生成物のサンプルを、1%低融点アガロースゲル (Boehringer Mannheim) 上で試験した。

【0279】

約300bpの予測されるサイズのバンドが見られた。300bpのPCRフラグメントを、市販のキット (Qiaquick Gel Extraction KitTM ; Qiagen) を用いてゲル精製した。配列決定は、PCRフラグメントがラットzcytor10の細胞内及びトランスメンブラン部分であることを確認した。ラットcDNA配列は配列番号15で示され、そして対応するアミノ酸配列が配列番号16で示される。トランスメンブラン、細胞内ドメイン、クラスIサイトカインモチーフ及び同様のものは、マウスzcytor10配列 (配列番号2) に示されるようなそれらのものと相互関係する。

【0280】

例4：ラットzcytor10組織分布

Rat Multiple Tissue Northern Blots (Origene, Rockville, MD) をプローブし、ラットzcytor10発現の組織分布を決定した。約250bpのPCR由来のプローブを、鋳型としてラットcDNA (配列3) 及びプライマーとしてオリゴヌクレオチドZC23711 (配列番号14) 及びZC21712 (配列番号17) を用いて増幅した。PCR反応条件は次の通りであった：90 で1分、55 で1分、72 で1.5分 (30サイクル) ; 72 で10分 ; 4 で一晩。

【0281】

PCR反応生成物のサンプルを、1%低融点アガロースゲル(Boehringer Mannheim)上で試験した。250bpの予測される細胞のバンドが見られた。250bpのPCRフラグメントを、市販のキット(Qiaquick Gel Extraction Kit™; Qiagen)を用いてゲル精製した。プローブを、MULTIPRIME™ ラベリングキット(Amersham)を用いて、製造業者の説明書に従って放射性ラベルした。プローブを、NUCTRAP™ プッシュカラム(Stratagene)を用いて精製した。EXPRESSHYB™ (Clontech)溶液を、プレハイブリダイゼーションのために、及びノザンプロットのためのハイブリダイジング溶液として使用した。

【0282】

ハイブリダイゼーションは、約 10^6 cpm/ラベルされたプローブ1mlを用いて、60度で一晩、生じた。プロットを、室温で、 $6\times$ SSC及び0.1%SDSにより1度、続いて60度で、 $6\times$ SSC及び0.1%SDSにより5度、洗浄した。約1.3kbの転写体が、胃、小腸、肺、精巣、皮膚、脳、腎臓、脾臓、胸腺及び肝臓において見られた。約3.0kbの大きな方の転写体が骨格筋、及び脾臓を除くすべての上記組織に見られた。精巣に関しては、1.0kbの追加の転写体が存在し、そして胸腺及び精巣に関して、大きな6.0kbの転写体が見られた。

【0283】

例5：マウスMPL-zcytor10ポリペプチドキメラ、すなわちzcytor10細胞内シグナル化ドメインに融合されるMPL細胞外及びTMドメインの構成

MPL受容体の細胞外及びトランスメンブランドメインを、MPL受容体を含むプラスミド(Souyri など., Cell 63: 1137-1147, 1990) (PHZ1/MPLプラスミド)から、プライマーZC17,212(配列番号18)及びZC17,313(配列番号19)によるPCRを用いて単離した。PCR反応条件は次の通りであった：95度で1分；95度で1分、45度で1分、72度で2分(35サイクル)；続いて、72度で10分；次に10度でのソーキング。PCR生成物を、1%低融点アガロース(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)上に負荷し、そして約1.5kbのMPL受容体フラグメントを、Qiaquick™ ゲル抽出キット(Qiagen)を用いて、製造業者の説明書に従って単離した。

。

【0284】

Zcytor10の細胞内ドメインを、zcytor10受容体cDNAを含むプラスミドから、プライマーZC17,315（配列番号20）及びZC17,314（配列番号21）によるPCRを用いて単離した。Zcytor10受容体細胞内ドメインコード配列（配列番号2のアミノ酸252（Arg）～357（Leu））に対応するポリヌクレオチド配列は、配列番号1に示さる。反応条件は上記の通りであった。PCR生成物を、1%低融点アガロース（Boehringer Mannheim）上に負荷し、そして約350bpのzcytor10フラグメントを、Qiaquickゲル抽出キットを用いて、製造業者の説明に従って単離した。

【0285】

上記の単離されたフラグメントの個々を、1：1の体積比で混合し、そしてZC17,212（配列番号18）及びZC17,314（配列番号21）を用いてのPCR反応に使用し、MPL - zcytor10キメラを創造した。反応条件は次の通りであった；95 で1分；95 で1分、55 で1分、72 で2分（35サイクル）；続いて、72 で10分；次に10 でのソーキング。全PCR生成物を、1%低融点アガロース（Boehringer Mannheim）上に負荷し、そして約1.9kbのMPL - zcytor10キメラフラグメントを、Qiaquickゲル抽出キット（Qiagen）を用いて、製造業者の説明書に従って単離した。

【0286】

MPL - zcytor10キメラフラグメントを、EcoRI（BRL）及びXbaI（Boehringer Mannheim）により、製造業者の説明書に従って消化した。全消化物を、1%低融点アガロース（Boehringer Mannheim）上に負荷し、そして分離されたMPL - zcytor10キメラを、Qiaquick™ ゲル抽出キット（Qiagen）を用いて、製造業者の説明書に従って単離した。その得られる分解されたMPL - zcytor10キメラを、下記のようにして発現ベクター中に挿入した。

【0287】

受容体発現ベクターpZP - 5Zを、EcoRI（BRL）及びHindIII（BRL）により、製造業者の説明書に従って消化し、そして上記のようにしてゲル精製した。このベクターフラグメントを、上記で単離された、EcoRI及びXbaI切断されたMPL - zcytor10キメラ及び、XbaI/HindIIIリンカーフラグメントと共に連結反応において組合した。この連結は、T4リガーゼ（BRL）を用いて、15 で一晩、行われた。連

結のサンプルを、DH10B ElectroMAX™ エレクトロコンピテントE.コリ細胞においてエレクトロポレートした(25 μ F、200 μ s、2.3V)。

【0288】

形質転換体を、LB + Ampicillinプレート上にプレートし、そして単一のコロニーを、上記のようなPCRコロニーを用いて、ZC17,212(配列番号18)及びZC17,314(配列番号21)を用いてのPCRによりスクリーンし、MPL - zcytor10キメラを調べた。MPL - zcytor10キメラ配列の確認を、配列分析により行った。この挿入体は、約1.9bpであり、そして十分な長さであった。プラスミドDNAは、pZP - 5N/MPL - zcytor10と命名された。

【0289】

例6: Alamar Blueを用いてのBAF3アッセイにおける、MPL - zcytor10キメラに基づく増殖

A. BaF3細胞発現のMPL - zcytor10キメラの構成:

BaF3、すなわちネズミ骨髄に由来するインターロイキン - 3 (IL-3) 依存性プレ - リンパ球細胞系 (Palacios and Steinmetz, Cell 41: 727-734, 1985; Mathy-Prevot など., Mol. Cell. Biol. 6:4133-4135, 1986) を、10%熱 - 不活性化されたウシ胎児血清、2ng/mlのネズミIL-3 (mIL-3) (R&D. Minneapolis, MN)、2mMのL-glutaMax-1™ (Gibco BRL)、1mMのピルビン酸ナトリウム (Gibco BRL) 及びPSN抗生物質 (Gibco BRL) により補充された完全倍地 (RPMI培地 (JRH Bioscience Inc., Lenexa, KS)) において維持した。

【0290】

エレクトロポレーションの前、pZP-5N/MPL - zcytor10プラスミドDNA (例4) を調製し、そしてQiagen Maxi Prepキット (Qiagen) を用いて、製造業者の説明書に従って精製した。エレクトロポレーションのためのBaF3細胞を、RPMI培地により1度洗浄し、そして次に、RPMI培地に 10^7 個の細胞/mlの細胞密度で再懸濁した。1mlの再懸濁されたBaF3細胞を、30 μ gのpZP-5N/MPL - zcytor10プラスミドDNA (例5) と共に混合し、そして別々の使い捨てエレクトロポレーションチャンバー (GIBCO BRL) に移した。室温での15分間のインキュベーションの後、細胞に、エレクトロポレーション装置 (CELL - PORATOR™ ; GIBCO BRL) により供給さ

れる2回の連続したショック(800 1Fad/300V ; 1180 1Fad/300V)を与えた。

【0291】

5分間の回復時間の後、エレクトロポレートされた細胞を、50mlの完全培地に移し、そしてインキュベーターに、15 - 24時間(37℃、5%CO₂)配置した。次に、細胞を回転沈降せしめ、そしてT-162フラスコにおける、Geneticin™ (Gibco) 選択(500 µg/mlのG418)を含む完全培地50mlに再懸濁し、G418 - 耐性プールを単離した。この後、BaF3/MPL - zcytor10細胞と呼ばれる、トランスフェクトされたBaF3細胞のプールを、下記のようにして、シグナル化能力についてアッセイした。

【0292】

B. Alamar Blue増殖アッセイを用いてのBaF3/MPL - zcytor10細胞のシグナル化能力の試験：

BaF3/MPL - zcytor10細胞を、回転沈降し、そして上記のようであるが、しかしIL-3を含まない完全培地(この後“mIL-3フリー培地”と称する)により洗浄した。細胞を回転せしめ、そして3度洗浄し、mIL-3の除去を確かにした。次に、細胞を、血球計により計数した。細胞を、mIL-3フリー培地を用いて、ウェル当たり100 µlの体積に5000個の細胞を含むような96 - ウェル形式でプレートした。

【0293】

BaF3/MPL - zcytor10細胞の増殖を、mIL-3フリー培地により、1000ng/ml, 500ng/ml, 250ng/ml, 125ng/ml, 62ng/ml, 30ng/ml, 15ng/ml, 7.5ng/mlの濃度に希釈されたネズミトロンボポエチン(TPO)を用いて評価した。100 µlの希釈されたTPOを、BaF3/MPL - zcytor10細胞に添加した。全アッセイ体積は200 µlである。負の対照を、TPOの添加を伴わないで、mIL-3フリー培地のみを用いて同時に実験した。

【0294】

アッセイプレートを、37℃で、5%CO₂において3日間、インキュベートし、この時点で、Alamar Blue (Accumed, Chicago, IL) を、20 µl/ウェルで添加した。Alamar Blueは、細胞の代謝活性に基づいて蛍光計読み取りを与え、そして従って、負の対照に比較しての細胞増殖の直接的な測定である。プレートを再び、

37 で、5%CO₂において、24時間インキュベートした。プレートを、SoftMax™ Proプログラムを用いて、544 (励起) 及び590 (放射)の波長で、Fmax™ プレーリーダー (Molecular Devices Sunnyvale, CA) 上で読み取った。

結果は、TP0の応答としてのBaF3/MPL - zcytor10キメラ細胞系の増殖が示されず、このことは、zcytor10分子の細胞内部分がホモダイマーとしてシグナル化できることを示唆する。

【0295】

例7：マウスzcytor10 - m p l ポリペプチドキメラ、すなわちMpl細胞内シグナル化ドメイン及びTMドメインに融合されるzcytor10細胞外ドメインの構成

zcytor10受容体の細胞外ドメインを、zcytor10受容体を含むプラスミドから、プライマーZC17,213 (配列番号11) 及びZC17,202 (配列番号22) によるPCRを用いて単離した。反応条件は次の通りであった：95 で1分；95 で1分、45 で1分、72 で2分 (35サイクル)；続いて、72 で10分；次に10 でのソーキング。PCR生成物を、1%低融点アガロース (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) 上に負荷し、そして約800bpのzcytor10受容体フラグメントを、Qiaquick™ ゲル抽出キット (Qiagen) を用いて、製造業者の説明書に従って単離した。

【0296】

MPLの細胞内及びトランスメンブランドメインを、MPL受容体cDNAを含むプラスミド (PHZ1/ MPLプラスミド) (例5) から、プライマーZC17,205 (配列番号23) 及びZC17,206 (配列番号24) によるPCRを用いて単離した。反応条件は上記の通りであった。PCR生成物を、1%低融点アガロース (Boehringer Mannheim) 上に負荷し、そして約450bpのMPLフラグメントを、Qiaquickゲル抽出キットを用いて、製造業者の説明に従って単離した。

【0297】

上記の単離されたフラグメントの個々を、1：1の体積比で混合し、そしてZC17,213 (配列番号11) 及びZC17,206 (配列番号24) を用いてのPCR反応に使用し、zcytor10 - m p l キメラを創造した。反応条件は次の通りであった；95 で1分；95 で1分、55 で1分、72 で2分 (35サイクル)；続いて、72 で10分；次に10 でのソーキング。全PCR生成物を、1%低融点アガロース (Boehringer

Mannheim) 上に負荷し、そして約1.2kbのzcytor10 - m p l キメラフラグメントを、Qiaquickゲル抽出キット (Qiagen) を用いて、製造業者の説明書に従って単離した。

【0298】

zcytor10 - m p l キメラフラグメントを、EcoRI (BRL) 及びXbaI (Boehringer Mannheim) により、製造業者の説明書に従って消化した。全消化物を、1%低融点アガロース (Boehringer Mannheim) 上に負荷し、そして分離されたzcytor10 - m p l キメラを、Qiaquick™ ゲル抽出キット (Qiagen) を用いて、製造業者の説明書に従って単離した。その得られる分解されたzcytor10 - m p l キメラを、下記のようにして発現ベクター中に挿入した。

【0299】

受容体発現ベクターpZP - 5Zを、EcoRI (BRL) 及びHindIII (BRL) により、製造業者の説明書に従って消化し、そして上記のようにしてゲル精製した。このベクターフラグメントを、上記で単離された、EcoRI及びXbaI切断されたzcytor10 - m p l キメラ及び、XbaI/HindIIIリンカーフラグメントと共に連結反応において組合した。この連結は、T4リガーゼ (BRL) を用いて、15 で一晩、行われた。

【0300】

連結のサンプルを、DH10B ElectroMAX™ エレクトロコンピテントE.コリ細胞においてエレクトロポレートした (25 µF、200 、2.3V)。形質転換体を、LB + Ampicillinプレート上にプレートし、そして単一のコロニーを、上記のようなPCRコロニーを用いて、ZC17,213 (配列番号11) 及びZC17,206 (配列番号24) を用いてのPCRによりスクリーンし、zcytor10 - m p l キメラを調べた。

zcytor10 - m p l キメラ配列の確認を、配列分析により行った。この挿入体は、約1.2kbであり、そして十分な長さであった。

【0301】

例8：完全な長さのzcytor10を発現する発現ベクターの構成

完全zcytor10受容体を、プライマーZC17,213 (配列番号11) 及びZC17,314 (配列番号21) を用いてのPCRにより、zcytor10受容体cDNAを含むプラスミドから単

離した。反応条件は次の通りであった：95 で1分；95 で1分、55 で1分、72 で2分（35サイクル）；続い72 で10分；次に10 でのソーキング。PCR生成物を、1%の低融点アガロース（Boehringer Mannheim）ゲル上に負荷し、そしてQiaquick™ 抽出キット（Qiagen）を用いて、製造業者の説明に従って、約1.1kbのzcytor10 cDNAを単離した。

【0302】

精製されたzcytor10 cDNAを、EcoRI（BRL）及びXbaI（Boehringer Mannheim）により、製造業者の説明書に従って、消化した。全消化物を、1%低融点アガロース（Boehringer Mannheim）ゲル上に負荷し、そして切断されたzcytor10フラグメントを、Qiaquick™ 抽出キットを用いて、製造業者の説明書に従って精製した。その得られる切断されたzcytor10フラグメントを、下記のようにして、発現ベクター中に挿入した。

【0303】

受容体発現ベクターpZP-5Nを、EcoRI（BRL）及びXbaI（Boehringer Mannheim）により、製造業者の説明書に従って消化し、そしてゲルを上記のようにして精製した。このベクターフラグメントを、連結反応において、上記のようにして単離された、EcoRI 及びXbaI切断されたzcytor10フラグメントと共に組合した。この連結を、15 で一晩、T4リガーゼ（BRL）を用いて行った。連結物のサンプルを、DH10B electroMac™ エレクトロコンピテントE.コリ細胞中にエレクトロポレートした（25 µF、200 、2.3V）。形質転換体を、LB+アンピシリンプレート上にプレートし、そして単一のコロニーを、上記のようなPCR条件を用いて、ZC17,213（配列番号11）及びZC17,314（配列番号21）を用いてのPCRによりスクリーンし、zcytor10配列について調べた。十分な長さのzcytor10配列の確認を、配列分析により行った。挿入体は約1.1kbであり、そして完全な長さであった。

【0304】

例9：Alamar Blue を用いてのBaF3アッセイにおけるzcytor10に基づく増殖を評価するための細胞の構成

A. zcytor10 - MPL受容体を発現するBaF3細胞の構成：

zcytor10 - MPL受容体を発現するBaF3細胞を、上記例7に記載されるzcytor10

発現ベクター30 μ lを用いて、上記例6Aに従って構成した。pZP-5Z/zcytor10受容体プラスミドを発現するBaF3細胞を、BaF3/zcytor10 - mplとして命名した。それらの細胞を、例10及び18に記載のようにして、zcytor10活性についてスクリーニングするために使用した。

【0305】

B. zcytor10受容体を発現するBaF3細胞の構成：

十分な長さのzcytor10受容体を発現するBaF3細胞を、上記例8に記載されるzcytor10発現ベクター30 μ lを用いて、上記例6Aに従って構成した。pZP-5Z/zcytor10受容体プラスミドを発現するBaF3細胞を、BaF3/zcytor10として命名した。それらの細胞を、例10及び18に記載のようにして、zcytor10活性についてスクリーニングするために使用した。

【0306】

例10：Alamar Blue 増殖アッセイによる、BaF3/zcytor10 - MPL細胞及びBaF3/zcytor10細胞を用いてのzcytor10活性についてのスクリーニング

BaF3/zcytor10 - mplキメラ細胞及びBaF3/zcytor10細胞（例9）を回転沈降し、そしてそれぞれ、mIL-3フリー培地（例6）により洗浄した。細胞を回転せしめ、そして3度洗浄し、mIL-3の除去を確保した。次に、細胞を血球計により計数した。細胞を、mIL-3フリー培地を用いて、ウェル当たり100 μ lの体積に5000個の細胞を含むような96 - ウェル形式でプレートした。

【0307】

zcytor10リガンドについての源を同定するために、種々の細胞系からの約124個のならし培地サンプルをスクリーンした。100 μ lの個々のならし培地サンプルを、BaF3/MPL - zcytor10キメラ細胞及びBaF3/zcytor10細胞に添加して。すべての既知のサイトカインをまた、両細胞系に対して250ng/mlの濃度でスクリーンした。負の対照を、mIL-3を有さない培地を用いて、同時に試験した。250pg/mlの濃度でのマウスIL-3を、正の対照として使用した。

【0308】

アッセイプレートを、37 $^{\circ}$ C、5%のCO₂で3日間、インキュベートし、この時点で、Alamar Blue (Accumed, Chicago, IL) を、20 μ l/ウェルで添加した。Alama

r Blueは、生存細胞の数に基づいて、蛍光情報を付与し、そして従って、負の対照と比較しての細胞増殖の直接的な測定である。プレートを再び、37℃、5%CO₂下で、24時間インキュベートした。プレートを、544 (励起) 及び590 (発光) の波長で、SoftMax™ Pro プログラムを用いて、Fmax™ プレートリーダー (Molecular Devices Sunnyvale, CA) 上で読み取った。

【0309】

結果は、ならし培地サンプル又は既知のリガンドに応答して、BaF3/zcytor10 - mplキメラ細胞系又はBaF3/zcytor10細胞系のいずれも増殖を示さなかった。この結果は、zcytor10受容体がホモダイマーとしてシグナル化できないことを示唆する。実際の受容体 - シグナル化複合体は、BaF3細胞に存在しないもう1つの受容体サブユニットを必要とする。下記例18及び19を参照のこと。

【0310】

例11: 次のzcytor10可溶性受容体を発現する哺乳類発現ベクターの構成: zcytor10 CEE, zcytor10 CFLG, zcytor10 CHIS及びzcytor10 - Fc4

A. zcytor10 CEE, zcytor10 CFLG及びzcytor10 CHISを含むzcytor10哺乳類発現ベクターの構成:

発現ベクター、すなわちpC4zalpha11 CEEを、zcytor10ポリペプチドの可溶性、細胞外ドメインの発現のために調製し、ここで前記構造体は、予測される開始メチオニンから成り、そして予測されるトランスメンブランダメインに隣接して切断され、そしてC - 末端Glu - Glu標識 (配列番号25) を有するzcytor10ポリペプチドを発現するよう企画されている。

【0311】

zcytor10細胞外サイトカイン結合ドメインを含んで成るzcytor10 DNAフラグメント (配列番号2のアミノ酸15 (Cys) ~ 230 (Pro)) を、PCRを用いて創造し、そして例7に記載のようにして精製した。切断されたDNAを、シグナルペプチド、例えば生来のzcytor10シグナルペプチドを有し、そしてGlu - Glu標識 (配列番号25) を、zcytor10ポリペプチド - コードのポリヌクレオチド配列のC - 末端に結合するプラスミド発現ベクター中にサブクローン化する。そのような発現ベクターである哺乳類ベクターは、哺乳類プロモーター、コード配列の挿入のための

複数の制限部位、停止コドン及び哺乳類ターミネーターを有する発現カセットを含む。プラスミドはまた、複製のE.コリ起点、SV40プロモーター、エンハンサー及び複製の起点を有する哺乳類選択マーカー発現単位、DHFR遺伝子及びSV40ターミネーターを有することができる。

【0312】

制限消化されたzcytor10挿入体及び前もって消化されたベクターを、標準の分子生物学技法を用いて、連結し、そして、コンピテント細胞、たとえばDH10Bコンピテント細胞 (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) 中に、製造業者の説明書に従ってエレクトロポレートし、そして50mg/mlのアンピシリンを含むLBプレート上にプレートし、そして一晩インキュベートした。コロニーを、個々のコロニーから調製されたDNAの制限分析によりスクリーンした。陽性クローンの挿入体配列を、配列分析により確かめた。大規模プラスミド調製を、QIAGEN (商標) Maxi prepキット (Qiagen) を用いて、製造業者の説明書に従って行った。

【0313】

同じ方法を用いて、一列に並んでの6個のHis残基から成るC-末端his標識及びC-末端フラッグ (配列番号26) 標識、すなわちzcytor10 CF1.AGを有するzcytor10可溶性受容体を調製した。それらの構造体を調製するためには、前記ベクターは、glu-glu標識 (配列番号25) の代わりにHIS又はFLAG (商標) 標識のいずれかを有する。

【0314】

B.可溶性zcytor10受容体zcytor10 - Fc4の哺乳類発現構造体：

zcytor10をコードするポリヌクレオチドのすべて又は一部を含む発現プラスミドを、相同組換えを通して構成した。zcytor10 cDNAのフラグメントを、zcytor10受容体の細胞外ドメインからのポリヌクレオチド配列を包含するPCRを用いて単離した。zcytor10フラグメントの生成のためのPCRに使用されるプライマーは、5'側から3'側の方に向かって、次のものを有した：(1)ベクターを端に有する配列 (挿入体の5'末端) の40bp及びzcytor10細胞ドメインの3'末端に対応する17bpを包含し；そして(2)Fc4ポリヌクレオチド配列の5'末端の40bp (配列番号27) 及びzcytor10細胞外ドメインの3'末端に対応する17bpを包含する。

【0315】

Zcytor10との融合のためのFc4のフラグメントを、類似する態様でPCRにより生成した。Fc4フラグメントの生成に使用される2種のプライマーは、次のものであった：(1) zcytor10細胞外ドメインの3'末端からの40bpの配列及びFc4の5'末端からの17bpの配列(配列番号27)から成る5'プライマー；及び(2)ベクター配列(挿入体の3'側)の40bpの配列及びFc4の3'末端の17bpの配列(配列番号27)から成る3'プライマー。次に、上記反応の個々のPCR増幅を、当業界における標準の条件を用いて行った。

【0316】

典型的な発現ベクターを、SmaI (BRL)により切断される、プラスミドpCZR199 (American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209に寄託された；寄託番号98668号)から誘導する。発現ベクターを、プラスミドpCZR199から誘導し、そしてそれは、CMV即時初期プロモーター、マウス免疫グロブリンH鎖遺伝子座の可変領域からのコンセンサスイントロン、コード配列の挿入のための複数の制限部位、停止コドン及びヒト成長ホルモントーミネーターを有する発現カセットを含む哺乳類発現ベクターである。発現ベクターはまた、複製のE.コリ起点、SV40プロモーター、エンハンサー及び複製の起点を有する哺乳類選択マーカー発現単位、DHFR遺伝子及びSV40ターミネーターを有する。使用される発現ベクターを、CMV即時初期プロモーターによるメタロチオネインプロモーターの置換によりpCZR199から構成した。

【0317】

コンピテント酵母細胞(S.セレビシアエ)を、それぞれ約1 µgのzcytor10及びFc4挿入体及びSmaI (BRL)消化された発現ベクター100ngと共に組合し、そしてエレクトロポレートする。酵母/DNA混合物を、0.75kV(5kV/cm)、“無限”、25 µFで、電気パルスした。個々のキュベットに、1.2Mのソルビトール600 µlを添加し、そして酵母を、2種のURA-Dプレート上の2つの300 µlアリコートにプレートし、そして30 でインキュベートした。

【0318】

約48時間後、単一のプレートからのUra+酵母形質転換体を、採取し、DNAを単

離し、そしてエレクトロコンピテントE.コリ細胞 (DH10B、GibcoBRL) を形質転換し、そして標準の方法を用いてプレートする。0.5 - 2 mlの酵母DNA調製物及び40 µlのDH10B細胞により行った。zcytor10 - Fc4のための正しい発現構造体を有する個々のクローンを、制限消化により同定し、zcytor10 - Fc4挿入体の存在を確かめ、そして種々のDNA配列がお互いに正しく連結されていることを確かめた。陽性クローンの挿入体を配列分析した。大規模プラスミドDNAを、Qiagen Maxiキット (Qiagen) を用いて、製造業者の説明書に従って単離する。

【0319】

例12: zcytor10可溶性受容体ポリペプチドのトランスフェクション及び発現

BHK 570細胞 (ATCC No. CRL-10314), DG44 CHO, 又は他の哺乳類細胞を、800 µlの適切な血清フリー (SF) 培地 (例えば、DMEM、Gibco/BRL High Glucose) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) において、約 1.2×10^6 個の細胞/ウェル (6 - ウェルプレート) でプレートする。細胞を、血清フリー (SF) 培地において、Lipofectin™ (Gibco BRL) を用いて、製造業者の説明書に従って、zcytor10 CEE, zcytor10 CFLG, zcytor10 CHIS又はFc4 (例11) を含む発現プラスミドによりトランスフェクトする。可溶性受容体を発現する単一のクローンを単離し、スクリーンし、そして細胞培養培地において増殖せしめ、そして標準の方法を用いて精製する。

【0320】

例13: E. コリにおけるzcytor10可溶性受容体の発現

A. huzcytor10/MBP-6H融合ポリペプチドを発現する発現ベクター-pCZR225の構成:

マルトース結合タンパク質 (MBP) にC - 末端で融合されるzcytor10可溶性受容体をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを、相同組換えにより構成する。融合ポリペプチドは、zcytor10可溶性受容体 (配列番号2のアミノ酸15 (Cys) ~ アミノ酸230 (Pro)) に融合される約388個のN - 末端アミノ酸MBP部分を含むzcytor10 cDNAのフラグメント (配列番号1) を、本明細書に記載のようなPCRを用いて単離する。

【0321】

次の2種のプライマーを、標準のPCR反応におけるzcytor10フラグメントの生

成に使用する：(1) 1つは、約40bpのベクターフランキンゲ配列及び約25bpのアミノ末端に対する配列を含み、及び(2) もう1つは、前記フランキンゲベクター配列に対応する3'末端約40bp及びzcytor10のカルボキシル末端に反応する配列約25bpを含む。100 μ lのPCR反応物2 μ lを、分析するために、1 \times TBE緩衝液中、1.0%アガロースゲル上で試験し、そして予測されるおおよそのフラグメントが見られる。残るPCR反応物を、第2のPCR管において組合し、そして無水エタノール400 μ lにより沈殿せしめる。沈殿されたDNAを、下記のようにして、Sma I切断された受容体ベクターpTAP98中への組換えのために使用し、MBP - zcytor10融合体をコードする構造体を生成する。

【0322】

プラスミドpTAP98は、プラスミドpRS316及びpMAL-c2に由来する。プラスミドpRS316は、サッカロミセス・セレビスシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*) シャトルベクターである (Hieter P. and Sikorski, R., *Genetics* 122: 19-27, 1989)。pMAL-C2 (NEB)は、E. コリ発現プラスミドである。それは、tacプロモーター駆動MalE (MBPコードの遺伝子)、続いて、His標識、トロンピン切断部位、クロニング部位及びrrnBターミネーターを担持する。ベクターpTAP98を、酵母相同組換えを用いて構成する。100ngのEcoRI切断された、pMAL-c2を、1 μ gのPvuI切断されたpRS316, 1 μ gのリンカーと共に組合し、そして1 μ gのScaI/EcoRI切断されたpRS316を、PCR反応において組合す。PCR生成物を、100%エタノール沈殿により濃縮する。

【0323】

コンピテント酵母細胞 (*S. セレビスシアエ*) を、約1 μ gの上記zcytor10受容体PCR生成物及び100ngのSmaI消化されたpTAP98ベクターを含む混合物数10 μ Lと共に組合し、そして標準方法を用いてエレクトロポレートし、そしてURA - Dプレート上にプレートし、そして30 でインキュベートする。

約48時間後、単一プレートからUra⁺酵母形質転換体を採取し、DNAを単離し、そしてエレクトロコンピテントE. コリ細胞 (例えば、MC1061, Casadabanなど., *J. Mol. Biol.* 138, 179-207) を形質転換し、そして標準方法を用いて、MM/CA + AMP 100mg/lプレート (Pryor and Leitig, *Protein Expression and Purification*

ation. 10:309-319, 1997) 上にプレートする。細胞を、100 μ g/mlのアンピシリンと共に、MM/CAにおいて、2時間、37 $^{\circ}$ Cで、振盪しながら増殖する。

【0324】

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

【0325】

1 μ lの配列決定DNAを用いて、BL21株を形質転換する。細胞を、2.0kV, 25 μ F及び400オームで電気パルスする。エレクトロポレーションに続いて、100mg/lのアンピシリンを含むMM/CA溶液0.6ml上にプレートする。細胞を、MM/CAにおいて増殖し、そして上記のようにして、IPTGにより誘発する。陽性クローンをを用いて、Huzcytor 10/MBP-6H融合タンパク質のタンパク質精製のために、標準技法により増殖する。

【0326】

例14: zcytor10可溶性受容体ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体を、精製されたhuzcytor10/MBP-6Hポリペプチド(例13)、又は精製された組換えzcytor10可溶性受容体(例11)により、雌New Zealand Whiteウサギを免疫化することによって、調製する。ウサギは、完全フロイントアジュバント(Pierce, Rockford, IL)中、精製されたタンパク質200mgの初期腹腔内(IP)注射、続いて、不完全フロイントアジュバント中、精製されたタンパク質100mgの追加免疫IP注射を、3週ごとに与えられる。第3の追加免疫注射の投与後7～10日で、動物は放血され、そして血清が集められる。次に、ウサギを、追加免疫し、そして3週ごとに放血する。

【0327】

zcytor10 - 特異的ポリクローナル抗体を、CNBr-SEPHAROSE 1g当たり約10mgの

精製されたhuzcytor10/MBP-6Hポリペプチドを用いて調製されるCNBr - SEPHAROSE 4Bタンパク質カラム (Pharmacia LKB) を用いて、ウサギ血清から親和性精製し、続いて、PBSにおける20倍の透析を一晚、行う。zcytor10 - 特異的抗体を、抗体標的物として適切な1mg/mlのタンパク質抗原を用いてのELISA力価調査により特徴づけるウサギ抗 - zcytor10親和性精製された抗体の検出の下限 (LLD) を、標準方法を用いて決定する。

【0328】

例15 : zcytor10受容体モノクローナル体

zcytor10可溶性受容体モノクローナル抗体を、本明細書に記載される精製された組換え可溶性zcytor10タンパク質により、雄BalbCマウス (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN) を免疫化することによって、調製する。マウスは、完全フロイントアジュバント (Pierce, Rockford, IL) 中、精製されたタンパク質20mgの初期腹腔内 (IP) 注射、続いて、不完全フロイントアジュバント中、精製されたタンパク質10mgの追加免疫IP注射を、2週ごとに与えられる。第3の追加免疫注射の投与後7~10日で、動物は放血され、そして血清が集められ、そして抗体力化を評価する。

【0329】

脾臓細胞を、高い力価のマウスから収穫し、そして4 : 1の融合比の脾臓細胞 : 骨髓腫細胞を用いての2つの別々の融合方法において、PEG 1500 (Boehringer Mannheim, UK) を用いて、ネズミSP2/0骨髓腫細胞に融合する (Antibodies: A Laboratory Manual, E. Harlow and D. Lane, Cold Spring Harbor Press)。融合の後、10日間の増殖に続いて、特定の抗体 - 生成ハイブリドマーを、抗体標的物として、精製された組換えzcytor10可溶性受容体タンパク質 (例6C) を用いて、ELISAにより、そして抗体標的物として、zcytor10配列を発現するBa F3細胞 (例8) を用いて、FACSにより同定する。両方法によるその得られる陽性ハイブリドマーを、限界希釈法により3度クローン化する。

【0330】

例16 : ORIGENアッセイを用いてのzcytor10受容体ヘテロダイマー化の評価

可溶性zcytor10受容体zcytor10 CFLAG (例11)、又はgp130 (Hibi, M. など.,

Cell63: 1149-1157, 1990) を、5倍モル過剰のスルホ - NHS - LC - ビオチン (Pie ce, Inc., Rockford, IL) との反応により、製造業者のプロトコールに従って、ビオチニル化する。可溶性zcytor10受容体及び他の可溶性受容体サブユニット、例えば可溶性IL - 7R (sIL-7R) 又はIL-2受容体 - (sIL-2R) (R&D Systems, Minneapolis, MN)、又は可溶性zcytor10受容体 (IL-21R; 通常アメリカ特許出願94/404,641号所有) を、5倍モル過剰のRu - BPY - NHS (Igen, Inc., Gaithersburg, MD) により、製造業者のプロトコールに従って、ラベルする。

【0331】

可溶性zcytor10受容体のビオチニル化され、そしてRu - BPY - NHP - ラベルされた形は、それぞれBio - zcytor10受容体及びRu - zcytor10と命名され; 他の可溶性受容体サブユニットのビオチニル化され、そしてRu - BPY - NHS - ラベルされた形も同様に命名され得る。アッセイを、zcytor10ヘテロダイマー受容体を結合するリガンドを発現する細胞からのならし培地を用いて、又は精製されたりガンドを用いて行うことができる。好ましいリガンドは、クラスIヘテロダイマーサイトカイン受容体、例えばIL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, α 11 リガンド (IL-21) (通常、アメリカ特許出願09/522,217号所有)、TSLP (Levine, SDなど., 前記; Isaksen, DEなど., 前記; Ray, RJなど., 前記; Friend, SLなど., 前記) を結合することができるそれらのリガンドである。

【0332】

初期受容体結合特徴化のために、一連サイトカイン又はならし培地を、それらがzcytor10受容体ホモダイマー化を介在することができるかどうか、及びそれらが上記の可溶性サブユニットzcytor10受容体へのヘテロダイマー化を介在できるかどうかを決定するために試験する。これを行うために、50 μ lのならし培地又はTBS - B含有の精製されたサイトカインを、例えば400ng/mlのRu - zcytor10受容体及びBio - zcytor10、又は400ng/mlのRu - zcytor10受容体及びBio - gp130、又は400ng/mlのRu - IL2R 及びBio - zcytor10を含むTBS - B (20mMのトリス、150mMのNaCl、1mg/mlのBSA、pH7.2) 50 μ lと組合す。

【0333】

室温での1時間のインキュベーションに続いて、30 μ gのストレプトビジン被

覆された、2.8mmの磁気ビーズ (DynaI, Inc., Oslo, Norway) を添加し、そしてその反応を、室温でさらに1時間インキュベートする。次に、200 μ lのORIGENアッセイ緩衝液 (Igen, Inc., Gaithersburg, MD) を添加し、そして受容体会合の程度を、M8 ORIGIN分析機 (Igen, Inc.) を用いて測定する。

【0334】

例17: zcytor10受容体ヘテロダイマーを生成するための構造体

分泌されたヒトzcytor10ヘテロダイマーを発現するベクターを構成する。この構造体においては、zcytor10の細胞外サイトカイン - 結合ドメインを、IgGガンマ1 (配列番号28及び29) のH鎖に融合し、そしてヘテロマ - サイトカイン受容体サブユニット (例えば、IL - 2 受容体成分 (IL-2R₁、IL-2R₂、IL-2R₃)、IL-4/IL-13受容体ファミリー受容体成分 (IL-4R₁、IL-4R₂、IL-13R₁)、インターロイキン受容体サブユニット (例えば、IL-15R₁、IL-7R₁、IL-9R₁)、又は α 11受容体 (IL-21R₁)) の細胞外部分を、ヒトカッパL鎖 (ヒト L鎖) (配列番号30及び31) に融合する。

【0335】

A. IgG₁ 及びヒト L鎖融合ベクターの構成:

IgG₁ のH鎖を、Zem229R哺乳発現ベクター (ATCC寄託番号69447号) 中にクローン化し、その結果、5' EcoRI及び3' NheI部位を有するいずれかの所望するサイトカイン受容体細胞外ドメインをクローン化でき、N - 末端細胞外ドメイン - C - 末端IgG₁ 融合体をもたらすことができる。この構造体を使用されるIgG₁ フラグメントを、鋳型としてClontech hFetal Liver cDNAライブラリーからIgG₁ 配列を単離するために、PCRを用いることにより製造する。

【0336】

PCR生成物を、本明細書に記載される方法を用いて、精製し、そしてMluI及びEcoRI (Boehringer-Mannheim) により消化し、エタノール沈殿し、そして本明細書に開示される標準の分子生物学技法を用いて、MluI及びEcoRIにより前もって消化されたZem229中にMluI/EcoRIリンカーを含んで成る、オリゴZC11,440 (配列番号32) 及びZC11,441 (配列番号33) と共に連結する。

【0337】

ヒト L鎖（配列番号30及び31）を、Zem228R哺乳類発現ベクター（ATCC寄託番号69446号）においてクローン化し、その結果、5' EcoRI部位及び3' KpnI部位を有する、いずれかのサイトカイン受容体細胞外ドメインがクローン化し、N-末端サイトカイン細胞外ドメイン-C-末端ヒト L鎖融合体をもたらすことができる。KpnI部位はヒト L鎖配列（配列番号30におけるヌクレオチド62の後を、KpnI酸素により分解される）内に位置するので、特定のプライマーが、サイトカイン受容体の所望する細胞外ドメインの3'末端を、このKpnI部位中にクローン化するように企画される。前記プライマーは、その得られるPCR生成物が、KpnI部位までのヒト L鎖（配列36）のセグメントと共に、所望するサイトカイン受容体細胞外ドメインを含むよう企画される。

【0338】

このプライマーは好ましくは、配列番号36に5'側で融合される所望するサイトカイン受容体細胞外ドメインの3'末端の少なくとも10個のヌクレオチドの部分を含んで成る。この構造体に使用されるヒト L鎖フラグメントを、上記で使用されるのと同じClontechヒト胎児肝臓cDNAライブラリーからヒト L鎖配列を単離するために、PCRを用いることによって製造する。PCR生成物を、本明細書に記載される方法を用いて精製し、そしてMluI及びEcoRI（Boehringer-Mannheim）により消化し、エタノール沈殿せしめ、そして本明細書に開示される標準の分子生物学技法を用いて、MluI及びEcoRIにより前もって消化されたZem228R中に、上記MluI/EcoRIリンカーにより連結する。

【0339】

B.融合ベクター構造体中へのzcytor10受容体又はヘテロダイマーサブユニット細胞ドメインの挿入：

上記構造ベクターを用いて、IgG 1に融合されるzcytor10を有する構造体を製造する。この構成は、標準方法（例えば、例7）及びEcoRI及びNheI制限部位を供給するオリゴを用いて、腎臓cDNAライブラリー（Clontech）からのzcytor10受容体の細胞外サイトカイン-結合ドメイン（配列番号2のアミノ酸15（Cys）～230（Pro））を、PCR処理することによって行われる。その得られるPCR生成物を、本明細書に記載のようにして、EcoRI及びNheIにより消化し、ゲル精製し、

そして上記の前もってEcoRI及びNheI消化され、そしてバンド - 精製されたZem229R/IgG I中に連結する。得られるベクターを、配列決定し、zcytor10/IgGガンマ1融合体 (zcytor10/Ch1 IgG) が正しいことを確認する。

【0340】

L鎖に融合されるヘテロダイマーサイトカイン受容体サブユニット細胞外ドメインを有する別々の構造体をまた、上記のようにして構成する。IL-2R /ヒト L鎖の構成を、標準方法を用いて、例えばリンパ球cDNAライブラリー (Clontech)、及びEcoRI及びKpnI制限部位を供給するオリゴから、PCRにより上記のようにして行う。得られるPCR生成物を、EcoRI及びKpnIにより消化し、そして次に、この生成物を、上記のようにして、前もってEcoRI及びKpnI消化され、そしてバンド - 精製されたZem228R/ヒト L鎖ベクター中に連結する。得られるベクターを配列決定し、サイトカイン受容体サブユニット/ヒト L鎖融合体が正しいことを確認する。

【0341】

D.zcytor10及びヘテロダイマーサイトカイン受容体サブユニット細胞外ドメインの同時 - 発現 :

約15 µgの個々の上記ベクターを、LipofectaminePlus™ 試薬 (Gibco/BRL) を用いて、製造業者の説明書に従って、哺乳類細胞、例えばBHK - 570細胞 (ATCC No. CRL-10314) 中に同時トランスフェクトする。トランスフェクトされた細胞を、1 µMのメトトレキサート (MTX) (Sigma, St. Louis, MO) 及び0.5mg/mlのG418 (Gibco/BRL) を含むDMEM + 5%FBS (Gibco/BRL) において、10日間、選択する。得られるトランスフェクタントのプールを、10 µmのMTX及び0.5mg/mlのG418において再び選択する。

【0342】

得られる二重選択された細胞のプールを用いて、タンパク質を生成する。このプールの3種の画分 (Nunc, Denmark) を用いて、血清フリーのならし培地10Lを生成する。こののならし培地を、1mlのタンパク質 - Aカラム上に通し、そして約10, 750 µlの画分に溶出する。最高のタンパク質濃度を有する画分をプールし、そしてPBSに対して透析する (10kDのMWのカットオフ)。最終的に、透析された材

料を、通常の方法を用いてのアミノ酸分析（AAA）のために提供する。

【0343】

例18：zcytor10受容体とヘテロダイマー化又は多重化する受容体サブユニットの決定

本明細書に記載される標準の方法を用いて、追加のヘテロダイマーサイトカイン受容体サブユニットによりトランスフェクトされたBaF3/MPL - zcytor10キメラ細胞（例6）は、TP0（例6）の存在下でルシフェラーゼレポーターへのヘテロダイマーzcytor10受容体複合体のシグナルトランスダクション応答を測定するために、バイオアッセイ細胞系として作用する。

【0344】

TP0の存在下で、BaF3/MPL - zcytor10細胞はシグナル化せず、このことは、zcytor10受容体がシグナルにヘテロダイマー化すべきであることを示唆する。TP0リガンドの存在下でシグナル化する追加のMPL - クラスIサイトカイン受容体融合体によるBaF3/MPL - zcytor10細胞トランスフェクションは、ヘテロダイマーサイトカイン受容体サブユニットがzcytor10受容体シグナル化のために必要とされることを決定する。この目的のためへのMPL - 受容体融合体の使用は、zcytor10受容体のための天然のリガンドの存在についての必要性を緩和する。

【0345】

MPL - クラスIサイトカイン受容体融合体を、MPL受容体の細胞外ドメイン及びトランスメンブランドメイン、及び所望するクラスIサイトカイン受容体の細胞内シグナルドメインを用いて、例5に従って製造する。BaF3/MPL - zcytor10バイオアッセイ細胞系を、例6におけるようにして、個々のMPL - クラスIサイトカイン受容体融合体により同時トランスフェクトし、BaF3/MPL - zcytor10/MPL-クラスIサイトカイン受容体細胞系を形成する。

【0346】

受容体複合体は、1又は複数のIL-2受容体成分（IL-2R α 、IL-2R β 、IL-2R γ ）、1又は複数のIL-4/IL-13受容体ファミリー受容体成分（IL-4R α 、IL-13R α 、IL-13R β ）、及び他のインターロイキン受容体（例えば、IL-15R α 、IL-7R α 、IL-9R α 、IL-21R（Z α 11受容体））を含んで成るMPL - サイトカイン受

容体融合体と組合してのzcytor10受容体を包含するが、但しそれらだけには限定されない。次に、個々の独立した受容体複合体細胞系を、TPO（例6）の存在下でアッセイし、そして増殖性を、通常の方法（例えば、例6に記載されるようなAlamar Blueアッセイ）を用いて測定する。

【0347】

BaF3/MPL - zcytor10バイオアッセイ細胞系は、バックグラウンドルシフェラーゼ活性についての対照として作用し、そして従って、種々の受容体複合体組み合わせによりシグナル化を比較するための基線として使用される。さらに、BaF3/MPL - クラスIサイトカイン受容体細胞系を構成し、ホモダイマー化に基づいてシグナル化することが知られているそれらのクラスIサイトカイン受容体についてのMPL - クラスIサイトカイン受容体ホモダイマー化効果を制御することができる。正しい受容体複合体の存在下でのTPOは、TPOの存在下で、バックグラウンドより約5倍又はそれ以上、BaF3/MPL - zcytor10/MPL - クラスIサイトカイン受容体細胞系の増殖を高めることが予測される。

【0348】

例19：インビトロでのzcytor10受容体の再構成

zcytor10 - シグナル化複合体に包含される成分を同定するために、受容体再構成の研究を、次の通りに行う。ルシフェラーゼレポーター哺乳類発現ベクタープラスミドにより、本明細書に記載される標準方法を用いて、トランスフェクトされたBHK570細胞（ATCC No. CRL-10314）は、zcytor10リガンドの存在下でルシフェラーゼレポーターに対する、トランスフェクトされたzcytor10受容体複合体からのシグナルトランスダクション応答を測定するために、バイオアッセイ細胞系として作用する。BHK細胞は、zcytor10受容体を内因的に発現しない。

【0349】

典型的なルシフェラーゼレポーター哺乳類発現ベクターは、次の4種の遺伝子からのSTAT転写因子結合要素を含む相補的オリゴヌクレオチドZC12,749配列番号37）及びZC12,748（配列番号38）により構成されたKZ134プラスミドである：修飾されたc-fos/Sis誘発性要素（m67SIE又はhSIE）（Sadowski, H. など., Science 261: 1739-1744, 1993）、p21 WAF1遺伝子からのp21 SIE1（Chin, Y. など.,

Science 272: 719-722, 1996)、 - カゼイン遺伝子の乳腺応答要素 (Schmitt-Ney, M. など., Mol. Cell. Biol. 11: 3745-3755, 1991)、及びFcγ RI遺伝子のSTAT誘発性要素 (Seidel, H. など., Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 3041-3045, 1995)。

【0350】

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

【0351】

バイオアッセイ細胞を、zcytor10受容体のみによりトランスフェクトし、zcytor10受容体及び種々の他の既知受容体サブユニットの1つにより同時にトランスフェクトする。受容体複合体は、zcytor10受容体のみ、1又は複数のIL-2受容体成分 (IL-2R_α、IL-2R_β、IL-2R_γ) を有するzcytor10受容体、1又は複数のIL-4/IL-13受容体ファミリー受容体成分 (IL-4R_α、IL-13R_α、IL-13R_β) を有するzcytor10受容体、及び他のインターロイキン受容体 (例えば、IL-15R_α、IL-7R_α、IL-9R_α、IL-21R (Zα11受容体)) と、zcytor10受容体との種々の組み合わせを包含するが、但しそれらだけには限定されない。

【0352】

次に、個々の独立した受容体複合体細胞系を、サイトカイン - ならし培地又は精製されたサイトカインの存在下でアッセイし、そしてルシフェラーゼ活性を通常の方法を用いて測定する。トランスフェクトされていないバイオアッセイ細胞系は、バックグラウンドルシフェラーゼ活性のための対照として作用し、そして従って、種々の受容体複合体組み合わせによるシグナルを比較するための基線として使用される。正しい受容体複合体の存在下でzcytor10受容体を結合するならし培地又はサイトカインは、バックグラウンドよりも約5倍又はそれ以上のルシフ

gtc acg tgg ggc tcg ggc ecc gac cac cac ggc gcc aac ttg agc ctg Val Thr Trp Gly Ser Gly Pro Asp His His Gly Ala Asn Leu Ser Leu 40 45 50	377
gag ttc cgt tat ggt act ggc gcc ctg caa ccc tgc ccg cga tat ttc Glu Phe Arg Tyr Gly Thr Gly Ala Leu Gln Pro Cys Pro Arg Tyr Phe 55 60 65 70	425
ctg tcc ggc gct ggt gtc act tcc ggg tgc atc etc ccc gcg gcg agg Leu Ser Gly Ala Gly Val Thr Ser Gly Cys Ile Leu Pro Ala Ala Arg 75 80 85	473
gcg ggg ctg ctg gag ctg gca ctg cgc gac gga ggc ggg gcc atg gtg Ala Gly Leu Leu Glu Leu Ala Leu Arg Asp Gly Gly Ala Met Val 90 95 100	521
ttt aag gct agg cag cgc gcg tcc gcc tgg ctg aag ccc cgc cca cct Phe Lys Ala Arg Gln Arg Ala Ser Ala Trp Leu Lys Pro Arg Pro Pro 105 110 115	569
tgg aat gtg acg ctg etc tgg aca cca gac ggg gac gtg act gtc tcc Trp Asn Val Thr Leu Leu Trp Thr Pro Asp Gly Asp Val Thr Val Ser 120 125 130	617
tgg cct gcc cac tcc tac ctg ggc ctg gac tac gag gtg cag cac cgg Trp Pro Ala His Ser Tyr Leu Gly Leu Asp Tyr Glu Val Gln His Arg 135 140 145 150	665
gag agc aat gac gat gag gac gcc tgg cag acg acc tca ggg ccc tgc Glu Ser Asn Asp Asp Glu Asp Ala Trp Gln Thr Thr Ser Gly Pro Cys 155 160 165	713
tgt gac ttg aca gtg ggc ggg etc gac ccc gcg cgc tgc tat gac ttc Cys Asp Leu Thr Val Gly Gly Leu Asp Pro Ala Arg Cys Tyr Asp Phe 170 175 180	761
cgg gtt cgg gcg tcg ccc cgg gcc gcg cac tat ggc ctg gag gcg cag Arg Val Arg Ala Ser Pro Arg Ala Ala His Tyr Gly Leu Glu Ala Gln 185 190 195	809
cct agc gag tgg aca gcg gtg aca agg ctt tcc ggg gca gca tcc gcg Pro Ser Glu Trp Thr Ala Val Thr Arg Leu Ser Gly Ala Ala Ser Ala 200 205 210	857

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 2

```

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

```

Ile His Pro Lys Ala Lys Arg Val Glu Pro Glu Asp Gly Thr Ser Leu
 305 310 315 320
 Cys Thr Val Pro Arg Pro Pro Ser Phe Glu Pro Arg Gly Pro Gly Gly
 325 330 335
 Gly Ala Met Val Ser Val Gly Gly Ala Thr Phe Met Val Gly Asp Ser
 340 345 350
 Gly Tyr Met Thr Leu
 355

<210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Consensus Amino Acid Motif

<221> VARIANT
 <222> (1)...(5)
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 3
 Trp Ser Xaa Trp Ser
 1 5

<210> 4
 <211> 1071
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Degenerate polynucleotide sequence for mouse
 zcytor10 of SEQ ID NO:2

<221> misc_feature
 <222> (1)...(1071)
 <223> n = A,T,C or G

<400> 4
 atggcngcna tggcnytrnt ngarmngcn gaygtnacng gntgywsncc ngayccnngn 60
 ccngcncng cngngaygt nacngtngtr tgycaygay tngaracngt ngargtnacn 120
 tgggnwsng gncngayca ycaygngcn aaytrwsny tngarttymg ntayggnacn 180
 gngcnytrc arccntgycc nmgntaytty ytrwsngng cngngtnac nwsngntgy 240

athytcccng cngcnmgnc nggnytnytn garytngcny tnmngaygg nggngngcn	300
atggtnttya argcnmgnc rmgngcnwsn gcntggytna arccnmgnc nccntggaay	360
gtnacnytny tntggacncc ngayggngay gtnacngtnw sntggccngc ncaywsntay	420
ytnggnytny aytaygargt ncarcaymgn garwsnaayg aygaygarga ygcntggcar	480
acnacnwsng gncntgytg ygayytnacn gtnngngny tngayccngc nmngtgytay	540
gaytymng tnmngcnws nccnmgngcn gncaytay gnytnargc ncarccnwsn	600
gartggacng cngtnacnmg nytnwsnggn gcngcnwsng cngcnwsntg yacngcnwsn	660
ccngcnccnw snccngcny ngcnccnccn ytnytccny tnggntgygg nytnngcn	720
ytnytachy tnwsnytny nytnngcn ytnmnytnm gnmngtnaa ngaygcnytn	780
ytncntgyg tncngaycc nwsnggnwsn tycngngny tnttyganaa rcaycaygn	840
aayttycarg cntggathgc ngaygcncar gcnacngcnc cncngcnmg nacngargar	900
gargaygay trathcaycc naargcnaar mgngtnargc cngargaygg nacnwsnytn	960
tgyacngtc cnmgnccnc nwsnttygar ccmngngnc cngngngng ngcnatggt	1020
wsngtngng gngcnactt yatggtngn gaywsngnt ayatgacny n	1071

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC14606

<400> 5

ggtgccgtcc teggctcca ccctctt

27

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC14603

<400> 6

ctcgaccocg tacgctgcta tgacttc

27

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC694
 <400> 7
 taatagcact cactataggg 20
 <210> 8
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC8938
 <400> 8
 caggaaacag ctatgacc 18
 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC16549
 <400> 9
 tctcggaag cgcgccattg 20
 <210> 10
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC16550
 <400> 10
 aggccaggag acagtcacg 19
 <210> 11
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC17213

 <400> 11
 ggggaattca ggggaatggc tgcgatggct ctt 33

 <210> 12
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC17314

 <400> 12
 gcgtctagaa ggtcacaggg tcatgtagcc 30

 <210> 13
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC24055

 <400> 13
 ctccggtggc cctgctca 18

 <210> 14
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC23711

 <400> 14
 tcacagggtg gtgtagccgc tgtctcc 27

 <210> 15
 <211> 343
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<220>
 <221> CDS
 <222> (2)...(343)

<400> 15

g gcc ctg ctc acc ctg gtg ctg ctc ctg gcc ctg ctg cgg atg cgc agg	49
Ala Leu Leu Thr Leu Val Leu Leu Leu Ala Leu Leu Arg Met Arg Arg	
1 5 10 15	
gtg aag gaa gcc ctg ctg cct ggt gtc ccc gac ccc cgc ggc tcc ttc	97
Val Lys Glu Ala Leu Leu Pro Gly Val Pro Asp Pro Arg Gly Ser Phe	
20 25 30	
cct gcc ctc ttc gag aaa cat cat ggg aac ttc cag gct tgg atc gca	145
Pro Gly Leu Phe Glu Lys His His Gly Asn Phe Gln Ala Trp Ile Ala	
35 40 45	
gat tct cag gct gct gtc cct acg gtc cca gag cag gac aaa gat gat	193
Asp Ser Gln Ala Ala Val Pro Thr Val Pro Glu Gln Asp Lys Asp Asp	
50 55 60	
gat gtc atc cgg cct cag acc aag ggg gtg gaa act cag gag gat gat	241
Asp Val Ile Arg Pro Gln Thr Lys Gly Val Glu Thr Gln Glu Asp Asp	
65 70 75 80	
gat gtc att gcc ccg ggg tcc cca tgc ctt ggg gga ggg gcc ctg atg	289
Asp Val Ile Ala Pro Gly Ser Pro Cys Leu Gly Gly Gly Ala Leu Met	
85 90 95	
tcg gtg ggc ggg gcc tcg ttc ctg atg gga gac agc ggc tac acc acc	337
Ser Val Gly Gly Ala Ser Phe Leu Met Gly Asp Ser Gly Tyr Thr Thr	
100 105 110	
ctg tga	343
Leu *	

<210> 16
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 16
 Ala Leu Leu Thr Leu Val Leu Leu Leu Ala Leu Leu Arg Met Arg Arg
 1 5 10 15
 Val Lys Glu Ala Leu Leu Pro Gly Val Pro Asp Pro Arg Gly Ser Phe
 20 25 30
 Pro Gly Leu Phe Glu Lys His His Gly Asn Phe Gln Ala Trp Ile Ala
 35 40 45
 Asp Ser Gln Ala Ala Val Pro Thr Val Pro Glu Gln Asp Lys Asp Asp
 50 55 60
 Asp Val Ile Arg Pro Gln Thr Lys Gly Val Glu Thr Gln Glu Asp Asp
 65 70 75 80
 Asp Val Ile Ala Pro Gly Ser Pro Cys Leu Gly Gly Gly Ala Leu Met
 85 90 95
 Ser Val Gly Gly Ala Ser Phe Leu Met Gly Asp Ser Gly Tyr Thr Thr
 100 105 110
 Leu

<210> 17
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC23712

<400> 17
 tccttcctcg gctcttcga gaa 23

<210> 18
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC17212

<400> 18
 ggggaattcg aagccatgcc ctcttgggcc etc 33

<210> 19
 <211> 30

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC17313

 <400> 19
 cacctgcga agccttagca gcagtaggcc 30

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

 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC17315

 <400> 20
 ggccctactgc tgctaaggct tgcaggggtg 30

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

 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC17314

 <400> 21
 gcgtctagaa ggtcacaggg tcatgtagcc 30

 <210> 22
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC17204

 <400> 22
 caccaagggtg atccacgggg atggggcggg 30

 <210> 23

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

 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC17205

 <400> 23
 cccgccccat ccccgtagat caccttggtg 30

 <210> 24
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC17206

 <400> 24
 gggctctagac cttcagggtc gctgccaata 30

 <210> 25
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Glu-Glu peptide tag

 <400> 25
 Glu Tyr Met Pro Met Glu
 1 5

 <210> 26
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> C-terminal FLAG tag

 <400> 26
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser 50 55 60	192
ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr 65 70 75 80	240
tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys 85 90 95	288
aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys 100 105 110	336
cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro 115 120 125	384
aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc ccg acc cct gag gtc aca tgc Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys 130 135 140	432
gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp 145 150 155 160	480
tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu 165 170 175	528
gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu 180 185 190	576
cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn 195 200 205	624
aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly 210 215 220	672

cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag 720
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat 768
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac 816
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc 864
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac 912
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg 960
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa 990
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 29

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

<210> 30
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>

<221> CDS
 <222> (1)...(321)

<400> 30
 act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag 48
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 1 5 10 15
 ttg aaa tct ggt acc gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat 96
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 20 25 30
 ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg 144
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 35 40 45
 ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc 192
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60
 tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa 240
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 65 70 75 80
 cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc 288
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 85 90 95
 gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag 321
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys *
 100 105

<210> 31
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 1 5 10 15
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 20 25 30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 35 40 45
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 65 70 75 80
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 85 90 95
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 32
 <211> 8
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC11440

<400> 32
 aattgaga

8

<210> 33
 <211> 8
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC11441

<400> 33
 cgcgcttc

8

<210> 34
 <211> 1306
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (74)...(1151)

<400> 34

gcgcctcga ctcggaccgg ctcggaccga accagctgtc aatcaactga gcgtccgagg	60
ccccgccggc gac atg gca tgg gca etc gcg gtc atc etc ctg cct cgg	109
Met Ala Trp Ala Leu Ala Val Ile Leu Leu Pro Arg	
1 5 10	
etc ctt acg gcg gca gcg gcg gcg gcg gcg gtc acg tca cgg ggt gat	157
Leu Leu Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Val Thr Ser Arg Gly Asp	
15 20 25	
gtc aca gtc gtc tgc cat gac ctg gag acg gtc gag gtc acg tgg ggc	205
Val Thr Val Val Cys His Asp Leu Glu Thr Val Glu Val Thr Trp Gly	
30 35 40	
tcg ggc ccc gac cac cac ggc gcc aac ttg agc ctg gag ttc cgt tat	253
Ser Gly Pro Asp His His Gly Ala Asn Leu Ser Leu Glu Phe Arg Tyr	
45 50 55 60	
ggt act ggc gcc ctg caa ccc tgc ccg cga tat ttc ctg tcc ggc gct	301
Gly Thr Gly Ala Leu Gln Pro Cys Pro Arg Tyr Phe Leu Ser Gly Ala	
65 70 75	
ggt gtc act tcc ggg tgc atc etc ccc gcg gcg agg gcg ggg ctg ctg	349
Gly Val Thr Ser Gly Cys Ile Leu Pro Ala Ala Arg Ala Gly Leu Leu	
80 85 90	
gag ctg gca ctg cgc gac gga ggc ggg gcc atg gtc ttt aag gct agg	397
Glu Leu Ala Leu Arg Asp Gly Gly Gly Ala Met Val Phe Lys Ala Arg	
95 100 105	
cag cgc gcg tcc gcc tgg ctg aag ccc cgc cca cct tgg aat gtc acg	445
Gln Arg Ala Ser Ala Trp Leu Lys Pro Arg Pro Pro Trp Asn Val Thr	
110 115 120	
ctg etc tgg aca cca gac ggg gac gtc act gtc tcc tgg cct gcc cac	493
Leu Leu Trp Thr Pro Asp Gly Asp Val Thr Val Ser Trp Pro Ala His	
125 130 135 140	
tcc tac ctg ggc ctg gac tac gag gtc cag cac cgg gag agc aat gac	541
Ser Tyr Leu Gly Leu Asp Tyr Glu Val Gln His Arg Glu Ser Asn Asp	
145 150 155	

gat gag gac gcc tgg cag acg acc tca ggg ccc tgc tgt gac ttg aca Asp Glu Asp Ala Trp Gln Thr Thr Ser Gly Pro Cys Cys Asp Leu Thr 160 165 170	589
gtg ggc ggg ctc gac ccc gcg cgc tgc tat gac ttc cgg gtt cgg gcg Val Gly Gly Leu Asp Pro Ala Arg Cys Tyr Asp Phe Arg Val Arg Ala 175 180 185	637
tcg ccc cgg gcc gcg cac tat ggc ctg gag gcg cag cct agc gag tgg Ser Pro Arg Ala Ala His Tyr Gly Leu Glu Ala Gln Pro Ser Glu Trp 190 195 200	685
aca gcg gtg aca agg ctt tcc ggg gca gca tcc gcg gcc tcc tgt acc Thr Ala Val Thr Arg Leu Ser Gly Ala Ala Ser Ala Ala Ser Cys Thr 205 210 215 220	733
gca agc ccc gcc cca tcc ccg gcc ctg gcc ccg ccc ctc ctg ccc ctg Ala Ser Pro Ala Pro Ser Pro Ala Leu Ala Pro Pro Leu Leu Pro Leu 225 230 235	781
ggc tgc ggc cta gca gcg ctg ctg aca ctg tcc ctg ctc ctg gcc gcc Gly Cys Gly Leu Ala Ala Leu Leu Thr Leu Ser Leu Leu Leu Ala Ala 240 245 250	829
ctg agg ctt cgc agg gtg aaa gat gcg ctg ctg ccc tgc gtc cct gac Leu Arg Leu Arg Arg Val Lys Asp Ala Leu Leu Pro Cys Val Pro Asp 255 260 265	877
ccc agc ggc tcc ttc cct gga ctc ttt gag aag cat cac ggg aac ttc Pro Ser Gly Ser Phe Pro Gly Leu Phe Glu Lys His His Gly Asn Phe 270 275 280	925
cag gcc tgg att gcg gac gcc cag gcc aca gcc ccg cca gcc agg acc Gln Ala Trp Ile Ala Asp Ala Gln Ala Thr Ala Pro Pro Ala Arg Thr 285 290 295 300	973
gag gag gaa gat gac ctc atc cac ccc aag gct aag agg gtg gag ccc Glu Glu Glu Asp Asp Leu Ile His Pro Lys Ala Lys Arg Val Glu Pro 305 310 315	1021
gag gac ggc acc tcc ctc tgc acc gtg cca agg cca ccc agc ttc gag Glu Asp Gly Thr Ser Leu Cys Thr Val Pro Arg Pro Pro Ser Phe Glu 320 325 330	1069

cca agg ggg ccg gga ggc ggg gcc atg gtg tca gtg ggc ggg gcc acg 1117
 Pro Arg Gly Pro Gly Gly Gly Ala Met Val Ser Val Gly Gly Ala Thr
 335 340 345

ttc atg gtg ggc gac agc ggc tac atg acc ctg t gacctgaag 1161
 Phe Met Val Gly Asp Ser Gly Tyr Met Thr Leu
 350 355

tcactgccag tctatacttc aggcgaggt cacttcctgt ctttaaataa ttcaaaactca 1221
 caaatcctgt gcctgtctgt atgcaaatgt ggtcacgaat attcaataa aatgcaaatg 1281
 ctatgctaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1306

<210> 35
 <211> 359
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

Ala His Tyr Gly Leu Glu Ala Gln Pro Ser Glu Trp Thr Ala Val Thr
 195 200 205
 Arg Leu Ser Gly Ala Ala Ser Ala Ala Ser Cys Thr Ala Ser Pro Ala
 210 215 220
 Pro Ser Pro Ala Leu Ala Pro Pro Leu Leu Pro Leu Gly Cys Gly Leu
 225 230 235 240
 Ala Ala Leu Leu Thr Leu Ser Leu Leu Leu Ala Ala Leu Arg Leu Arg
 245 250 255
 Arg Val Lys Asp Ala Leu Leu Pro Cys Val Pro Asp Pro Ser Gly Ser
 260 265 270
 Phe Pro Gly Leu Phe Glu Lys His His Gly Asn Phe Gln Ala Trp Ile
 275 280 285
 Ala Asp Ala Gln Ala Thr Ala Pro Pro Ala Arg Thr Glu Glu Glu Asp
 290 295 300
 Asp Leu Ile His Pro Lys Ala Lys Arg Val Glu Pro Glu Asp Gly Thr
 305 310 315 320
 Ser Leu Cys Thr Val Pro Arg Pro Pro Ser Phe Glu Pro Arg Gly Pro
 325 330 335
 Gly Gly Gly Ala Met Val Ser Val Gly Gly Ala Thr Phe Met Val Gly
 340 345 350
 Asp Ser Gly Tyr Met Thr Leu
 355

<210> 36
 <211> 61
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Section of human kappa light chain including KpnI
 site to be used in oligonucleotide primer
 construction

<400> 36
 actgtggctg caccatcgt cttcatcttc ccgcatctg atgagcagtt gaaatctggt 60
 a 61

<210> 37
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC12749

<400> 37

gtacctccc gtaaatccct ccccttccc gaattacacc cgcgtatttc ccagaaaagg 60
aactgtagat ttctaggaat tcaatccttg gccacgcgtc 100

<210> 38

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC12748

<400> 38

tcgagacgcg tggccaagga ttgaattcct agaaatctac agttcctttt ctgggaaata 60
cgcgggtgta attccgggaa ggggagggat ttacgggaag 100

<210> 39

<211> 1077

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Degenerate polynucleotide sequence of zcytor10
polypeptide of SEQ ID NO:35

<221> misc_feature

<222> (1)...(1077)

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

<400> 39

atggcntggg cnytnngcgt nathytnytn ccmngnytny tncngcngc ngcngcngc 60
gcngcngtna cnwsnmnggg ngaygtnacn gtngtntgyc aygayytnga racngtngar 120
gtnacntggg gnwsnggnc ngaycaycay gngcnaayy tnwsnytnga rttymntay 180
ggnacnggg cnytnarcc ntgyccmgn tayttytnw sngngcngg ngtnacnwsn 240
ggntgyathy tcccngcngc nmngcnggn ytnyngary tngcnytnng ngayggngn 300
ggngcnatgg tnttyaargc nmngcarmgn gcnwsngcct ggytnaarcc nmngcncn 360
tggaaygtna cnytnytnng gacnccngay gngaygtna cngtnwsntg gccngcncay 420
wsntayytn gnytnngayt ygargtnar caymngarw snaaygayga ygargaycn 480
tggcaracna cnwsnggnc ntgytgygay ytnacngtn gngnytnga yccngcngn 540
tgytaygayt tymngtnng ncnwsnccn mngcngcnc aytayggnyt ngargncar 600
ccnwsngart ggacngcngt ncnmngnytn wsngngcng cnsngcngc nwsntgyacn 660

```

gcnwsnccng cncnwsncc ngcnytnccn ccnccnytny tncnnytnng ntgyggnytn 720
gcngcnytny tnacnytnws nytnytnyn gcngcnytnm gnytnmgnmg ngtnaargay 780
gcnytnytnc cntgygtnc ngayccnwsn ggnwsnttyc cnggnytnntt ygaraarcay 840
cayggnaayt tycargcntg gathgcngay gcncargcna cngcncncnc ngcnmgnacn 900
gargargarg aygayytnat hcayccnaar gcnaarmgng tngarccnga rgayggnacn 960
wsnytnygya cngtnccnmg nccnccnwsn ttygarccnm gnggncncng nggngngcncn 1020
atggtnwsng tngngngngc nacnttyatg gtngngayw snggntayat gacnytn 1077

```

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Pro Ser Trp Glu Thr

1 5

<210> 41

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Signaling domain polypeptide motif

<221> VARIANT

<222> (1)...(32)

<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 41

```

Arg Val Lys Xaa Xaa Leu Xaa Pro Xaa Val Pro Asp Pro Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15
Phe Pro Gly Leu Phe Glu Xaa His Xaa Gly Asn Phe Gln Xaa Trp Ile
20 25 30

```

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = Leu or Ile

<221> VARIANT

<222> (4)...(4)

<223> Xaa = Cys, Gly, or Ser

<223> Consensus Box I polypeptide motif

<400> 42

Leu Xaa Pro Xaa Val Pro Asp Pro
1 5

<210> 43

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(8)

<223> Xaa = Any Amino Acid

<223> Polypeptide motif, Motif 1

<400> 43

Leu Glu Thr Val Xaa Val Thr Trp
1 5

<210> 44

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide motif, Motif 2

<400> 44

Thr Ser Gly Cys
1

<210> 45

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polypeptide motif, Motif 5

<400> 45

Tyr Glu Val Gln
1

【**手続補正書**】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【**提出日**】平成13年7月28日(2001.7.28)

【**手続補正1**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】特許請求の範囲

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【**特許請求の範囲**】

【**請求項1**】 (a) 配列番号2に示されるアミノ酸番号15(Cys)～アミノ酸番号230(Pro)のアミノ酸配列；

(b) 配列番号35に示されるアミノ酸番号17(Ala)～アミノ酸番号232(Pro)のアミノ酸配列；

(c) 配列番号2に示されるアミノ酸番号25(Gly)～アミノ酸番号230(Pro)のアミノ酸配列；

(d) 配列番号2に示されるアミノ酸番号15(Cys)～アミノ酸番号251(Leu)のアミノ酸配列；

(e) 配列番号35に示されるアミノ酸番号17(Ala)～アミノ酸番号253(Leu)のアミノ酸配列；

(f) 配列番号2に示されるアミノ酸番号252(Arg)～アミノ酸番号357(Leu)のアミノ酸配列；

(g) 配列番号2に示されるアミノ酸番号15(Cys)～アミノ酸番号357(Leu)のアミノ酸配列；

(h) 配列番号35に示されるアミノ酸番号17(Ala)～アミノ酸番号359(Leu)のアミノ酸配列；

(i) 配列番号2に示されるアミノ酸番号1(Met)～アミノ酸番号357(Leu)のアミノ酸配列；

(j) 配列番号35に示されるアミノ酸番号1(Met)～アミノ酸番号359(Leu)のアミノ酸配列；

から成る群から選択されたアミノ酸配列に対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列；

ノ酸残基の配列を含んで成るサイトカイン受容体ポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項2】 前記ポリペプチドが、

(a) 配列番号2に示されるアミノ酸番号15(Cys)～アミノ酸番号230(Pro)のアミノ酸配列；

(b) 配列番号35に示されるアミノ酸番号17(Ala)～アミノ酸番号232(Pro)のアミノ酸配列；

(c) 配列番号2に示されるアミノ酸番号25(Gly)～アミノ酸番号230(Pro)のアミノ酸配列；

(d) 配列番号2に示されるアミノ酸番号15(Cys)～アミノ酸番号251(Leu)のアミノ酸配列；

(e) 配列番号35に示されるアミノ酸番号17(Ala)～アミノ酸番号253(Leu)のアミノ酸配列；

(f) 配列番号2に示されるアミノ酸番号252(Arg)～アミノ酸番号357(Leu)のアミノ酸配列；

(g) 配列番号2に示されるアミノ酸番号15(Cys)～アミノ酸番号357(Leu)のアミノ酸配列；

(h) 配列番号35に示されるアミノ酸番号17(Ala)～アミノ酸番号359(Leu)のアミノ酸配列；

(i) 配列番号2に示されるアミノ酸番号1(Met)～アミノ酸番号357(Leu)のアミノ酸配列；

(j) 配列番号35に示されるアミノ酸番号1(Met)～アミノ酸番号359(Leu)のアミノ酸配列；

から成る群から選択されたアミノ酸残基の配列を含んで成る請求項1記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項3】 前記ポリペプチドがさらに、配列番号2の残基231(Leu)～251(Leu)から成るトランスメンブランドメインを含んで成る請求項1又は2記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項4】 前記ポリペプチドがさらに、配列番号2の残基252(Arg)～

357 (Leu) から成る細胞内ドメインを含んで成る請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 5】 次の作用可能に連結された要素：

転写プロモーター；

配列番号 2 に示されるアミノ酸番号 15 (Cys) 又は 25 (Gly) ~ アミノ酸番号 357 (Leu) のアミノ酸配列に対して少なくとも 90% 同一であるか；あるいは配列番号 35 に示されるアミノ酸番号 17 (Ala) ~ アミノ酸番号 232 (Pro) のアミノ酸配列に対して少なくとも 90% 同一であるサイトカイン受容体ポリペプチドをコードする DNA セグメント；及び

転写ターミネーター；

を含んで成り、ここで前記プロモーターが前記 DNA セグメントに作用可能に連結されており、そして前記 DNA セグメントが前記転写ターミネーターに作用可能に連結されていることを特徴とする発現ベクター。

【請求項 6】 前記 DNA セグメントに作用可能に連結された分泌シグナル配列をさらに含んで成る請求項 5 記載の発現ベクター。

【請求項 7】 請求項 5 又は 6 記載の発現ベクターを含んで成る培養された細胞であって、前記 DNA セグメントによりコードされたポリペプチドを発現する細胞。

【請求項 8】 前記 DNA セグメントが、配列番号 2 に示されるアミノ酸番号 15 (Cys) 又は 25 (Gly) ~ アミノ酸番号 230 (Pro) のアミノ酸配列；又は配列番号 35 に示されるアミノ酸番号 17 (Ala) ~ アミノ酸番号 232 (Pro) のアミノ酸配列、を含んで成るポリペプチド；及び

転写ターミネーターをコードし、

ここで前記プロモーター、DNA セグメント及びターミネーターが作用可能に連結されている請求項 5 記載の発現ベクター。

【請求項 9】 前記 DNA セグメントに作用可能に連結された分泌シグナル配列をさらに含んで成る請求項 8 記載の発現ベクター。

【請求項 10】 前記ポリペプチドがさらに、配列番号 2 の残基 231 (Leu) ~ 251 (Leu) から成るトランスメンブランドメインを含んで成る、請求項 8 又は

9記載の発現ベクター。

【請求項11】 前記ポリペプチドがさらに、配列番号2の残基252(Arg)～357(Leu)から成る細胞内ドメインを含んで成る請求項8～10のいずれか1項記載の発現ベクター。

【請求項12】 請求項8～11のいずれか1項記載の発現ベクターを導入されている培養された細胞であって、前記DNAセグメントによりコードされた可溶性受容体ポリペプチドを発現する細胞。

【請求項13】 融合タンパク質をコードするDNA構造体であって、

(a) 配列番号2のアミノ酸番号1(Met)～アミノ酸番号14(Gly)のアミノ酸配列；

(b) 配列番号35のアミノ酸番号1(Met)～アミノ酸番号16(Ala)のアミノ酸配列；

(c) 配列番号2のアミノ酸番号15(Cys)～アミノ酸番号230(Pro)のアミノ酸配列；

(d) 配列番号35のアミノ酸番号17(Ala)～アミノ酸番号232(Pro)のアミノ酸配列；

(e) 配列番号2のアミノ酸番号25(Gly)～アミノ酸番号230(Pro)のアミノ酸配列；

(f) 配列番号2のアミノ酸番号15(Cys)～アミノ酸番号251(Leu)のアミノ酸配列；

(g) 配列番号2のアミノ酸番号17(Ala)～アミノ酸番号253(Leu)のアミノ酸配列；

(h) 配列番号2のアミノ酸番号231(Leu)～アミノ酸番号251(Leu)のアミノ酸配列；

(i) 配列番号2のアミノ酸番号231(Leu)～アミノ酸番号357(Leu)のアミノ酸配列；

(j) 配列番号2のアミノ酸番号252(Arg)～アミノ酸番号357(Leu)のアミノ酸配列；

(k) 配列番号2のアミノ酸番号15(Cys)～アミノ酸番号357(Leu)のアミノ酸配列；

ノ酸配列；

(1) 配列番号2のアミノ酸番号17(Ala)～アミノ酸番号359(Leu)のアミノ酸配列；

から成る群から選択されたアミノ酸残基の配列に対して少なくとも90%同一であるポリペプチドをコードする第1セグメント；及び

追加のポリペプチドをコードする少なくとも1つの他のDNAセグメント；
を含んで成り、ここで前記第1及び他のDNAセグメントが読み取り柄を整合して連結され；そして前記第1及び他のDNAセグメントが前記融合タンパク質をコードすることを特徴とするDNA構造体。

【請求項14】 次の作用可能に連結された要素：

転写プロモーター；

請求項13記載の融合タンパク質をコードするDNA構造体；及び

転写ターミネーター；

を含んで成り、ここで前記プロモーターが前記DNA構造体に作用可能に連結され、そして前記DNA構造体が前記転写ターミネーターに作用可能に連結されることを特徴とする発現ベクター。

【請求項15】 請求項14記載の発現ベクターを含んで成る培養された細胞であって、前記DNA構造体によりコードされるポリペプチドを発現する細胞。

【請求項16】 融合タンパク質の製造方法であって、

請求項15記載の細胞を培養し；そして

前記細胞により生成されるポリペプチドを単離する；

ことを含んで成る方法。

【請求項17】 (a) 配列番号2に示されるアミノ酸番号15(Cys)～アミノ酸番号230(Pro)のアミノ酸配列；

(b) 配列番号35に示されるアミノ酸番号17(Ala)～アミノ酸番号232(Pro)のアミノ酸配列；

(c) 配列番号2に示されるアミノ酸番号25(Gly)～アミノ酸番号230(Pro)のアミノ酸配列；

(d) 配列番号2に示されるアミノ酸番号15(Cys)～アミノ酸番号251(Leu

)のアミノ酸配列；

(e) 配列番号35に示されるアミノ酸番号17 (Ala) ~ アミノ酸番号253 (Leu

)のアミノ酸配列；

(f) 配列番号2に示されるアミノ酸番号252 (Arg) ~ アミノ酸番号357 (Leu

)のアミノ酸配列；

(g) 配列番号2に示されるアミノ酸番号15 (Cys) ~ アミノ酸番号357 (Leu

)のアミノ酸配列；

(h) 配列番号35に示されるアミノ酸番号17 (Ala) ~ アミノ酸番号359 (Leu

)のアミノ酸配列；

(i) 配列番号2に示されるアミノ酸番号1 (Met) ~ アミノ酸番号357 (Leu

)のアミノ酸配列；

(j) 配列番号35に示されるアミノ酸番号1 (Met) ~ アミノ酸番号359 (Leu

)のアミノ酸配列；

から成る群から選択されたアミノ酸配列に対して少なくとも90%同一であるアミノ酸残基の配列を含んで成る単離されたポリペプチド。

【請求項18】 前記アミノ酸残基の配列が、

(a) 配列番号2に示されるアミノ酸番号15 (Cys) ~ アミノ酸番号230 (Pro

)のアミノ酸配列；

(b) 配列番号35に示されるアミノ酸番号17 (Ala) ~ アミノ酸番号232 (Pro

)のアミノ酸配列；

(c) 配列番号2に示されるアミノ酸番号25 (Gly) ~ アミノ酸番号230 (Pro

)のアミノ酸配列；

(d) 配列番号2に示されるアミノ酸番号15 (Cys) ~ アミノ酸番号251 (Leu

)のアミノ酸配列；

(e) 配列番号35に示されるアミノ酸番号17 (Ala) ~ アミノ酸番号253 (Leu

)のアミノ酸配列；

(f) 配列番号2に示されるアミノ酸番号252 (Arg) ~ アミノ酸番号357 (Leu

)のアミノ酸配列；

(g) 配列番号2に示されるアミノ酸番号15 (Cys) ~ アミノ酸番号357 (Leu

)のアミノ酸配列；

(h) 配列番号35に示されるアミノ酸番号17 (Ala) ~ アミノ酸番号359 (Leu)

)のアミノ酸配列；

(i) 配列番号2に示されるアミノ酸番号1 (Met) ~ アミノ酸番号357 (Leu)

)のアミノ酸配列；

(j) 配列番号35に示されるアミノ酸番号1 (Met) ~ アミノ酸番号359 (Leu)

)のアミノ酸配列；

から成る群から選択される請求項17記載の単離されたポリペプチド。

【請求項19】 前記ポリペプチド分子が、

配置M1 - {32 - 35} - M2 - {31 - 32} - M3 - {14 - 15} - M4 - {11} - M5 - {22 - 24} -

M6：

[ここで、M1は、“モチーフ1”、すなわち配列番号43に示されるようなアミノ酸の配列であり、

M2は、“モチーフ2”、すなわち配列番号44に示されるアミノ酸配列であり、

M3は、“モチーフ3”、すなわちLKPから成るアミノ酸の配列であり、

M4は、“モチーフ4”、すなわちVTVから成るアミノ酸の配列であり、

M5は、“モチーフ5”、すなわち配列番号45に示されるようなアミノ酸の配列であり、

M6は、“モチーフ6、すなわちGLDから成るアミノ酸配列であり、そして

{数}は、モチーフ間のアミノ酸の数を示す]

において、N - 末端からC - 末端の方に一定の間隔離れて存在するモチーフ1, 2, 3, 4, 5及び6をコードする請求項17記載の単離されたポリペプチド。

【請求項20】 前記ポリペプチドがさらに、配列番号2の残基231 (Leu) ~ 251 (Leu) から成るトランスメンブランドメインを含んで成る請求項17~19のいずれか1項記載の単離されたポリペプチド。

【請求項21】 前記ポリペプチドがさらに、配列番号2の残基252 (Arg) ~ 357 (Leu) から成る細胞内ドメインを含んで成る請求項17~20のいずれか1項記載の単離されたポリペプチド。

【請求項22】 ポリペプチドの製造方法であって、

請求項7記載の細胞を培養し；そして
前記細胞により生成されるポリペプチドを単離する；
ことを含んで成る方法。

【請求項23】 (a) 配列番号2に示されるアミノ酸番号15(Cys)又は25(Gly)～アミノ酸番号230(Pro)のアミノ酸配列；

(b) 配列番号35に示されるアミノ酸番号17(Ala)～アミノ酸番号232(Pro)のアミノ酸配列；及び

(c) 上記(a)又は(b)に対して少なくとも90%同一である配列；
から成る群から選択されたアミノ酸セグメントを含んで成り、ここで前記ポリペプチドが、造血受容体により通常会合されるトランスメンブラン及び細胞内ドメインを実質的に有さない請求項17～20のいずれか1項記載の単離されたポリペプチド。

【請求項24】 ポリペプチドの製造方法であって、
請求項12記載の細胞を培養し；そして
前記細胞により生成されるポリペプチドを単離する；
ことを含んで成る方法。

【請求項25】 サイトカイン受容体ポリペプチドに対する抗体の生成方法であって、

(a) 配列番号2におけるアミノ酸番号15(Cys)～アミノ酸番号357(Leu)のアミノ酸の連続配列に対して少なくとも90%同一である、9～343個のアミノ酸から成るポリペプチド；

(b) 配列番号35におけるアミノ酸番号17(Ala)～アミノ酸番号359(Leu)のアミノ酸の連続配列に対して少なくとも90%同一である、9～343個のアミノ酸から成るポリペプチド；

(c) 配列番号2のアミノ酸番号25(Gly)～アミノ酸番号230(Pro)のアミノ酸配列から成るポリペプチド；

(d) 配列番号2のアミノ酸番号114(Lys)～アミノ酸番号121(Val)のアミノ酸配列から成るポリペプチド；

(e) 配列番号2のアミノ酸番号177(Arg)～アミノ酸番号186(Ala)のアミノ酸配列から成るポリペプチド；

ノ酸配列から成るポリペプチド；

(e) 配列番号2のアミノ酸番号252 (Arg) ~ アミノ酸番号357 (Leu) のアミノ酸配列から成る2ポリペプチド；

(f) 配列番号2のアミノ酸番号260 (Leu) ~ アミノ酸番号267 (Pro) のアミノ酸配列から成るポリペプチド；

(g) 配列番号2のアミノ酸番号298 (Thr) ~ アミノ酸番号302 (Asp) のアミノ酸配列から成るポリペプチド；

(h) 配列番号2のアミノ酸番号150 (Arg) ~ アミノ酸番号155 (Asp) のアミノ酸配列から成るポリペプチド；

(i) 配列番号2のアミノ酸番号254 (Arg) ~ アミノ酸番号259 (Ala) のアミノ酸配列から成るポリペプチド；

(j) 配列番号2のアミノ酸番号296 (Ala) ~ アミノ酸番号301 (Glu) のアミノ酸配列から成るポリペプチド；

(k) 配列番号2のアミノ酸番号297 (Arg) ~ アミノ酸番号302 (Asp) のアミノ酸配列から成るポリペプチド；及び

(l) 配列番号2のアミノ酸番号310 (Lys) ~ アミノ酸番号315 (Glu) のアミノ酸配列から成るポリペプチド；

から成る群から選択されたポリペプチドにより動物を接種し、ここで前記ポリペプチドが、抗体を生成するために動物において免疫応答を誘発し；そして

前記動物から抗体を単離することを含んで成る方法。

【請求項26】 配列番号2のポリペプチドに対して特異的に結合する請求項25記載の方法により生成される抗体。

【請求項27】 前記抗体が、モノクローナル抗体である請求項26記載の抗体。

【請求項28】 請求項17~20のいずれか1項記載のポリペプチドに対して特異的に結合する抗体。

【請求項29】 サイトカイン受容体タンパク質活性のモジュレータ - の存在を、試験サンプルにおいて検出する方法であって、

請求項8~10のいずれか1項記載の発現ベクターが導入されている細胞を培養

し、ここで前記細胞が試験サンプルの存在及び不在下でDNAセグメントによりコードされるマスクサイトカイン受容体タンパク質を発現し；

生物学的又は生化学的アッセイにより、試験サンプルの存在及び不在下でのマウスサイトカイン受容体タンパク質の活性のレベルを比較し；そして

試験サンプルにおけるサイトカイン受容体活性のモジュレーターが存在を、前記比較から決定する；

ことを含んで成る方法。

【請求項30】 試験サンプル内のサイトカイン受容体リガンドの検出方法であって、

配列番号2に示されるアミノ酸番号15(Cys)又は25(Gly)～アミノ酸番号230(Pro)のアミノ酸配列を含んで成る請求項17～20のいずれか1項記載のポリペプチドと試験サンプルとを接触せしめ；そして

前記サンプルにおけるリガンドへの前記ポリペプチドの結合を検出する；ことを含んで成る方法。

【請求項31】 前記ポリペプチドが培養された細胞内で膜結合性であり、そして前記検出段階が培養された細胞における生物学的応答を測定することを含んで成る請求項30記載の方法。

【請求項32】 前記生物学的応答が、細胞増殖又はレポーター遺伝子の転写の活性化である請求項31記載の方法。

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/US 00/12924
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C12N15/62 C07K14/715 C07K16/28 C12Q1/68 G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K C12N C12Q G01N		
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) STRAND, EPO-Internal, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! EBI; ACC. NO.: AA018020, 10 August 1996 (1996-08-10) MARRA ET AL.: "The WashU-HHMI Mouse EST project" XP002147793 the whole document	1-12, 17-24
X	DATABASE EMBL 'Online! EBI; ACC. NO.: AA008678, 28 July 1996 (1996-07-28) MARRA ET AL.: "The WashU-HHMI Mouse EST Project" XP002147794 the whole document	1-12, 17-24
-/--		
<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		Date of mailing of the international search report
25 September 2000		02/10/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer van Klompenburg, W

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/US 00/12924

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Referent to claim No.
A	BAZAN J F: "Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 87, September 1990 (1990-09), pages 6934-6938, XPO02111161 ISSN: 0021-9258 figure 1	1-24
A	MCKINNON M ET AL: "STRATEGIES FOR THE DISCOVERY OF CYTOKINE RECEPTOR ANTAGONISTS" DRUG NEWS AND PERSPECTIVES, XX, XX, vol. 9, 1996, pages 389-398, XPO00882849 ISSN: 0214-0934 page 392, column 3 -page 396, column 2	29-32
A	US 5 747 292 A (NELSON BRAD H ET AL) 5 May 1998 (1998-05-05) claims 1-31; figures 1,2	13-16
P, X	FUJIO ET AL.: "Molecular cloning of a novel type 1 cytokine receptor similar to the common gamma chain" BLOOD, vol. 95, no. 7, 1 April 2000 (2000-04-01), pages 2204-2211, XPO00946169 figures 1,2,4	1-24
E	WO 00 49148 A (FUJIO KEISHI ;KITAMURA TOSHIO (JP)) 24 August 2000 (2000-08-24) figures 1,5,6	1-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 00/12924

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5747292 A	05-05-1998	AU 695869 B	27-08-1998
		AU 6627194 A	24-10-1994
		CA 2160011 A	13-10-1994
		EP 0693084 A	24-01-1996
		JP 8511000 T	19-11-1996
		WO 9422914 A	13-10-1994
WO 0049148 A	24-08-2000	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
C 1 2 N	1/19	C 1 2 N	1/21	
	1/21	C 1 2 P	21/02	C
	5/10	C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 P	21/02	G 0 1 N	33/53	Z
C 1 2 Q	1/02		33/566	
G 0 1 N	33/53	C 1 2 P	21/08	
	33/566	C 1 2 N	15/00	Z N A A
// C 1 2 P	21/08		5/00	A

(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, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 フォスター, ドナルド シー.
 アメリカ合衆国, ワシントン 98155, レイク フォレスト パーク, ノースイースト ワンハンドレットエイティーファースト ストリート 3002

(72)発明者 ハモンド アンジェラ ケー.
 アメリカ合衆国, ワシントン 98027, イサクア, サウスウエスト クラーク ストリート 195 #イー - 2

(72)発明者 ロク, シ
 アメリカ合衆国, ワシントン 98107, シアトル, ノースウエスト フィフティセカンド ストリート 806

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA43 BA63 CA04
CA07 CA11 DA01 DA02 DA05
DA11 EA01 EA02 EA03 EA04
FA02 GA03 GA11 HA01 HA03
HA11
4B063 QA01 QA08 QA19 QQ01 QQ20
QR08 QR33 QR42 QR59 QR62
QR80 QS05 QS25 QS36 QX02
4B064 AG20 AG27 CA01 CA10 CA19
CA20 CC24 DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA87X AA91Y
AB01 AB02 BA01 BA08 CA24
CA25 CA44 CA46
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
BA41 CA40 DA51 DA76 EA20
EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	细胞因子受体小鼠ZCYTOR 10		
公开(公告)号	JP2002543786A	公开(公告)日	2002-12-24
申请号	JP2000616347	申请日	2000-05-11
[标]申请(专利权)人(译)	津莫吉尼蒂克斯公司		
申请(专利权)人(译)	ZymoGenetics公司, 股份有限公司雷开球德		
[标]发明人	プレズネルスコットアール フォスタードナルドシー ハモンドアンジェラケー ロクシ		
发明人	プレズネル,スコット アール. フォスター,ドナルド シー. ハモンド アンジェラ ケー. ロク,シ		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/715 C07K16/28 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/566		
CPC分类号	C07K14/715 C07K2319/00		
FI分类号	C07K14/715 C07K16/28 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 G01N33/53.Z G01N33/566 C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA11 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA01 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA03 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA08 4B063/QA19 4B063/QQ01 4B063/QQ20 4B063/QR08 4B063/QR33 4B063/QR42 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR80 4B063/QS05 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064/AG20 4B064/AG27 4B064/CA01 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA91Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA51 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	09/309861 1999-05-11 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了新颖的多肽, 编码所述多肽的多核苷酸, 以及新颖的小鼠细胞因子受体小鼠zcytor10的相关组成和方法。该多肽可以用于检测刺激造血, 淋巴和髓样细胞增殖和/或进化的配体的方法。配体结合受体多肽也可用于抑制配体活性。编码小鼠zcytor10的多核苷酸可用于鉴定人类同源抗体。本发明还包括产生蛋白质的方法, 其用途和其抗体。

ヌクレオチド	解	相補体	解
A	A	T	T
C	C	G	G
G	G	C	C
T	T	A	A
R	A G	Y	C T
Y	C T	R	A G
M	A C	K	G T
K	G T	M	A C
S	C G	S	C G
W	A T	W	A T
H	A C T	D	A G T
B	C G T	V	A C G
V	A C G	B	C G T
D	A G T	H	A C T
N	A C G T	N	A C G T