

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公表特許公報** ( A ) (11)特許出願公表番号

**特表2003 - 501027**

(P2003 - 501027A)

(43)公表日 平成15年1月14日(2003.1.14)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 39/395	D 4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00			N 4 B 0 6 3
39/395		A 6 1 P 3/10	4 B 0 6 4
		9/00	4 B 0 6 5
A 6 1 P 3/10		9/10	4 C 0 8 4

審査請求 有 予備審査請求 (全124数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 500756(P2001 - 500756)

(86)(22)出願日 平成12年5月18日(2000.5.18)

(85)翻訳文提出日 平成13年11月27日(2001.11.27)

(86)国際出願番号 PCT/US00/13608

(87)国際公開番号 W000/073444

(87)国際公開日 平成12年12月7日(2000.12.7)

(31)優先権主張番号 09/321,372

(32)優先日 平成11年5月27日(1999.5.27)

(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 ピディントン, クリストファー エス.  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 91362, サ  
ウザンド オークス, アイロンゲート プレ  
イス 2838

(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】 脂肪細胞補体関連タンパク質同族体 z a c r p 5

(57)【要約】

本発明は、zacrp5、すなわち、コラーゲン様ドメインおよびCIqドメインを支持するタンパク質の1ファミリーの新規なメンバー、についてのポリヌクレオチドおよびポリペプチド分子に関する。ポリペプチドおよびそれらをコードするポリヌクレオチドはホモおよびヘテロトリマー化またはオリゴマー化に関係づけられ、それらの研究において使用することができる。本発明は、また、zacrp5ポリペプチドに対する抗体を包含する。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 配列番号2の残基70～252に対して少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸残基の配列を含んでなり、前記配列が、

コラーゲン様ドメインを形成するGly - Xaa - XaaおよびGly - Xaa - Proコラーゲン反復（ここでXaaは任意のアミノ酸残基である）；および

カルボキシル末端のCIqドメイン；

を含んでなる、単離されたポリペプチド。

【請求項2】 前記ポリペプチドが配列番号2の残基18～252に対して少なくとも90%のアミノ酸同一性を有する、請求項1に記載の単離されたポリペプチド

。

【請求項3】 前記ポリペプチドと配列番号2との間の差が保存的アミノ酸置換のためである、請求項2に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項4】 前記コラーゲン様ドメインが14のGly - Xaa - Xaaコラーゲン反復および1つのGly - Xaa - Proコラーゲン反復から成る、請求項2に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項5】 前記ポリペプチドが、

アミノ末端の領域；

コラーゲン様ドメインを形成する14のGly - Xaa - Xaaコラーゲン反復および1つのGly - Xaa - Proコラーゲン反復（ここでXaaは任意のアミノ酸残基である）；および

配列番号2のアミノ酸残基119～123、141～143、149～152、156～158、162～173、178～184、189～196、200～211、216～221、および240～244に対応する10ペータ鎖を含んでなるカルボキシル末端のCIqドメイン；

を含んでなる、請求項2に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項6】 前記ポリペプチドが配列番号2のポリペプチドと特異的に結合する抗体と特異的に結合する、請求項2に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項7】 前記コラーゲン様ドメインが配列番号2のアミノ酸残基70～111を含んでなる、請求項2に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項8】 前記CIqドメインが配列番号2のアミノ酸残基112～252を含ん

でなる、請求項2に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項9】 前記ポリペプチドが配列番号2の残基70～252を含んでなる、請求項1に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項10】 前記ポリペプチドが配列番号2の残基18～252を含んでなる、請求項2に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項11】 前記ポリペプチドが配列番号2の残基1～252を含んでなる、請求項2に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項12】 前記ポリペプチドが分子間ジサルファイド結合により複合化されてホモトリマーを形成している、請求項1に記載の単離されたペプチド。

【請求項13】 前記ポリペプチドが分子間ジサルファイド結合によりコラーゲン様ドメインを有する1またはそれ以上のポリペプチドに対して複合化されて、ヘテロトリマーを形成している、請求項1に記載の単離されたペプチド。

【請求項14】 アミノまたはカルボキシル末端において、親和標識、トキシン、ラジオヌクレオチド、酵素および発蛍光団から成る群から選択される成分に共有結合されている、請求項1に記載の単離されたペプチド。

【請求項15】 下記のポリペプチドから成る群から選択される単離されたポリペプチド：

- a) 配列番号2の残基70～残基111のアミノ酸残基の配列から成るポリペプチド；および
- b) 配列番号2の残基112～残基252のアミノ酸残基の配列から成るポリペプチド。

【請求項16】 ペプチド結合により結合された第1部分および第2部分から本質的に成り、前記第1部分が、

- a) 請求項1に記載のポリペプチド；
- b) アミノ末端の領域；コラーゲン様ドメインを形成する14のGly - Xaa - Xaaコラーゲン反復および1つのGly - Xaa - Proコラーゲン反復（ここでXaaは任意のアミノ酸残基である）；および配列番号2のアミノ酸残基119～123、141～143、149～152、156～158、162～173、178～184、189～196、200～211、216～221、および240～244に対応する10ペータ鎖を含んでなるカルボキシル末端のCIqドメイ

ン；を含んでなるポリペプチド；

c) コラーゲン様ドメインまたはトリマー化またはオリゴマー化することができるコラーゲン様ドメインの部分を含んでなる、配列番号2に示すzacrp5ポリペプチドの部分；

d) ClqドメインまたはClqドメインの活性部分を含んでなる、配列番号2に示すzacrp5ポリペプチドの部分；または

e) コラーゲン様ドメインおよびClqドメインを含んでなる、配列番号2に示すzacrp2ポリペプチドの部分；

から成る群から選択され；そして

前記第2部分が他のポリペプチドを含んでなる；

融合タンパク質。

【請求項17】 前記第1部分が、

a) 配列番号2のアミノ酸残基70～アミノ酸残基111の配列から成るポリペプチド；

b) 配列番号2のアミノ酸残基112～アミノ酸残基252の配列から成るポリペプチド；

c) 配列番号2のアミノ酸残基70～アミノ酸残基252の配列から成るポリペプチド；

d) 配列番号2のアミノ酸残基18～252のアミノ酸残基の配列から成るポリペプチド；および

e) 配列番号2のアミノ酸残基1～252のアミノ酸残基の配列から成るポリペプチド；

から成る群から選択される、請求項16に記載の融合タンパク質。

【請求項18】 薬学上許容されるビヒクルと組み合わされた、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項19】 動物にポリペプチドを接種し、前記ポリペプチドは、

a) 請求項1に記載のポリペプチド；

b) アミノ末端の領域；コラーゲン様ドメインを形成する14のGly - Xaa - Xaaコラーゲン反復および1つのGly - Xaa - Proコラーゲン反復、ここでXaaは任意の

アミノ酸残基である；および配列番号2のアミノ酸残基119～123、141～143、149～152、156～158、162～173、178～184、189～196、200～211、216～221、および240～244に対応する10ベータ鎖を含んでなるカルボキシル末端のCIqドメイン；を含んでなるポリペプチド；

c) コラーゲン様ドメインまたはトリマー化またはオリゴマー化することができるコラーゲン様ドメインの部分を含んでなる、配列番号2に示すzacrp5ポリペプチドの部分；

d) CIqドメインまたはCIqドメインの活性部分を含んでなる、配列番号2に示すzacrp5ポリペプチドの部分；または

e) コラーゲン様ドメインおよびCIqドメインを含んでなる、配列番号2に示すzacrp5ポリペプチドの部分；

から成る群から選択され；そして

ここで前記ポリペプチドは動物において免疫応答を誘発して抗体を産生し；そして

動物から抗体を単離する、  
工程を含む、ポリペプチドに対する抗体を産生する方法。

【請求項20】 請求項1に記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体または抗体フラグメント。

【請求項21】 前記抗体が、

- a) ポリクローナル抗体；
- b) ネズミモノクローナル抗体；
- c) 上記b)に由来するヒト型化モノクローナル抗体；および
- d) ヒトモノクローナル抗体；

から成る群から選択される、請求項20に記載の抗体。

【請求項22】 前記抗体フラグメントが、F(ab')、F(ab)、Fab'、Fab、Fv、scFv、および最小認識単位から成る群から選択される、請求項20に記載の抗体フラグメント。

【請求項23】 請求項20に記載の前記抗体に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体。

【請求項24】 請求項1に記載のポリペプチドのエピトープに特異的に結合する結合性タンパク質。

【請求項25】 配列番号2の残基70～252に対して少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸残基の配列を含んでな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、前記配列は、

コラーゲン様ドメインを形成するGly - Xaa - XaaおよびGly - Xaa - Proコラーゲン反復（ここでXaaは任意のアミノ酸残基である）；および

カルボキシル末端のCIqドメイン；  
を含んでなる。

【請求項26】 前記ポリペプチドが配列番号2の残基18～252に対して少なくとも90%のアミノ酸同一性を有する、請求項25に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項27】 前記コラーゲン様ドメインが14のGly - Xaa - Xaaコラーゲン反復および1つのGly - Xaa - Proコラーゲン反復から成る、請求項25に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項28】 前記ポリペプチドが、  
アミノ末端の領域；  
コラーゲン様ドメインを形成する14のGly - Xaa - Xaaコラーゲン反復および1つのGly - Xaa - Proコラーゲン反復（ここでXaaは任意のアミノ酸残基である）；および

配列番号2のアミノ酸残基119～123、141～143、149～152、156～158、162～173、178～184、189～196、200～211、216～221、および240～244に対応する10ペータ鎖を含んでなるカルボキシル末端のCIqドメイン；  
を含んでなる、請求項25に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項29】 前記ポリペプチドと配列番号2との間の差が保存的アミノ酸置換のためである、請求項25に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項30】 前記ポリペプチドが配列番号2のポリペプチドと特異的に結合する抗体と特異的に結合する、請求項25に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項31】 前記コラーゲン様ドメインが配列番号2のアミノ酸残基70～111を含んでなる、請求項25に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項32】 w前記ポリペプチドが配列番号2の残基70～252を含んでなる、請求項25に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項33】 前記ポリペプチドが配列番号2の残基18～252を含んでなる、請求項25に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項34】 前記ポリペプチドが配列番号2の残基1～252を含んでなる、請求項25に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項35】 アミノまたはカルボキシル末端において、親和標識、トキシン、ラジオヌクレオチド、酵素および発蛍光団から成る群から選択される部分に共有結合されている、請求項25に記載の単離されたペプチド。

【請求項36】 a) 配列番号1のヌクレオチド1～ヌクレオチド759のヌクレオチド配列；

b) 配列番号1のヌクレオチド52～ヌクレオチド759のヌクレオチド配列；

c) 配列番号1のヌクレオチド208～ヌクレオチド333のヌクレオチド配列；

d) 配列番号1のヌクレオチド334～ヌクレオチド759のヌクレオチド配列；

e) 配列番号1のヌクレオチド208～ヌクレオチド759のヌクレオチド配列；

f) 配列番号1のヌクレオチド52～ヌクレオチド111のヌクレオチド配列；

g) 配列番号2の残基70～111のアミノ酸残基の配列から成るポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

h) 配列番号2の残基112～残基252のアミノ酸残基の配列から成るポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

i) ストリンジェント洗浄条件後に、配列番号の1ヌクレオチド配列、または配列番号1の相補体から成るポリヌクレオチドに対してハイブリダイズして停まるポリヌクレオチド；

j) 上記a)、b)、c)、d)、e)、f)、g)、h)またはi)に対して相補的であるヌクレオチド配列；および

k) 上記g)またはh)の縮重ヌクレオチド配列；  
から成る群から選択される単離されたポリヌクレオチド。

【請求項37】 ペプチド結合により結合された第1部分および第2部分から本質的に成る融合タンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチドであって、前記第1部分は、

a) 請求項1に記載のポリペプチド；

b) アミノ末端の領域；コラーゲン様ドメインを形成する14のGly - Xaa - Xaaコラーゲン反復および1つのGly - Xaa - Proコラーゲン反復（ここでXaaは任意のアミノ酸残基である）；および配列番号1のアミノ酸残基119～123、141～143、149～152、156～158、162～173、178～184、189～196、200～211、216～221、および240～244に対応する10ベータ鎖を含んでなるカルボキシル末端のCIqドメイン；を含んでなるポリペプチド；

c) コラーゲン様ドメインまたはトリマー化またはオリゴマー化することができるコラーゲン様ドメインの部分を含んでなる、配列番号2に示すzacrp5ポリペプチドの部分；

d) CIqドメインまたはCIqドメインの活性部分を含んでなる、配列番号2に示すzacrp5ポリペプチドの部分；または

e) コラーゲン様ドメインおよびCIqドメインを含んでなる、配列番号2に示すzacrp5ポリペプチドの部分；

から成る群から選択され；そして

前記第2部分は他のポリペプチドを含んでなる；

ことを特徴とするポリヌクレオチド。

【請求項38】 配列番号12のヌクレオチド1～ヌクレオチド756のヌクレオチド配列から成る単離されたポリヌクレオチド。

【請求項39】 下記の作用可能に連鎖された因子：

転写プロモーター；

請求項1に記載のポリペプチドをコードするDNAセグメント；および

転写ターミネーター；

を含んでなる発現ベクター。

【請求項40】 前記DNAセグメントが配列番号2の残基18～252に対して少なくとも90%のアミノ酸同一性を有するポリペプチドをコードする、請求項39に

記載の単離された発現ベクター。

【請求項41】 前記コラーゲン様ドメインが14のGly - Xaa - Xaaコラーゲン反復および1つのGly - Xaa - Proコラーゲン反復から成る、請求項39に記載の単離された発現ベクター。

【請求項42】 前記DNAセグメントが下記を含んでなるポリペプチド：

アミノ末端の領域；

コラーゲン様ドメインを形成する14のGly - Xaa - Xaaコラーゲン反復および1つのGly - Xaa - Proコラーゲン反復、ここでXaaは任意のアミノ酸残基である；および

配列番号2のアミノ酸残基119～123、141～143、149～152、156～158、162～173、178～184、189～196、200～211、216～221、および240～244に対応する10ペータ鎖を含んでなるカルボキシル末端のCIqドメイン；  
をコードする請求項39に記載の単離された発現ベクター。

【請求項43】 前記コラーゲン様ドメインが配列番号2のアミノ酸残基70～111を含んでなる、請求項39に記載の単離された発現ベクター。

【請求項44】 前記ポリペプチドと配列番号2との間の差が保存的アミノ酸置換のためである、請求項39に記載の単離された発現ベクター。

【請求項45】 前記ポリペプチドが配列番号2のポリペプチドと特異的に結合する抗体と特異的に結合する、請求項39に記載の単離された発現ベクター。

【請求項46】 前記DNAが配列番号2の残基70～252を含んでなるポリペプチドをコードする、請求項39に記載の単離された発現ベクター。

【請求項47】 前記DNAセグメントが配列番号2の残基18～252を含んでなるポリペプチドをコードする、請求項39に記載の単離された発現ベクター。

【請求項48】 前記DNAセグメントが配列番号2の残基1～252を含んでなるポリペプチドをコードする、請求項39に記載の単離された発現ベクター。

【請求項49】 前記DNAセグメントが前記ポリペプチドに作用可能に連鎖された分泌シグナル配列をさらにコードする、請求項39に記載の発現ベクター。

【請求項50】 前記分泌シグナル配列が配列番号2の残基1～17を含んでなる、請求項39に記載の発現ベクター。

【請求項51】 請求項39に記載の発現ベクターが導入されており、前記DNAセグメントによりコードされる前記ポリペプチドを発現する、培養された細胞。

【請求項52】 コラーゲン様ドメインを有するポリペプチドをコードするDNAセグメントを含んでなる、1またはそれ以上の発現ベクターをさらに含む、請求項51に記載の培養された細胞。

【請求項53】 請求項39に記載の発現ベクターが導入された細胞を培養し；

ここで前記細胞は前記DNAセグメントによりコードされる前記タンパク質を発現し；そして

前記発現された細胞を回収する；  
工程を含む、タンパク質を製造する方法。

【請求項54】 前記発現されたタンパク質がホモトリマーである、請求項53に記載の方法。

【請求項55】 前記発現されたタンパク質がヘテロトリマーである、請求項53に記載の方法。

【請求項56】 (a) zacr<sub>p5</sub>核酸プローブをハイブリダイゼーション条件下に (i) 生物学的試料から単離された被験RNA分子、または (ii) 単離されたRNA分子から合成された核酸分子と接触させ、ここで前記プローブは請求項25に記載の核酸分子のヌクレオチド配列の一部を含んでなるヌクレオチド配列、またはその相補体から成り；そして

(b) 核酸プローブと被験RNA分子または合成された核酸分子とのハイブリッドの形成を検出する；  
工程を含み、ここでハイブリッドの存在は生物学的試料中のzacr<sub>p5</sub> RNAの存在を示す、生物学的試料中のzacr<sub>p5</sub>遺伝子の発現の存在を検出する方法。

【請求項57】 (a) 生物学的試料を請求項20に記載の抗体、または抗体フラグメントと接触させ、ここで生物学的試料に対する抗体または抗体フラグメントの結合を可能とする条件下に前記接触を実施し；そして

(b) 結合した抗体または結合した抗体フラグメントを検出する；

工程を含む、生物学的試料中のzacrp5の存在を検出する方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 発明の背景

細胞 - 細胞および細胞 - 細胞外基質の相互作用は、多細胞生物の種々の細胞間の情報の交換およびそれらの間の共同作用を可能とし、大部分の生物学的プロセスのための基本である。これらの相互作用は受精から死までのすべてにおいてある役割を演ずる。このような相互作用は発生および分化の間において必須であり、かつ生物の機能および保護のために重大である。例えば、細胞とその環境との間の相互作用は組織の改造を開始しかつモジュレートすることが必要である。これらの改造は、例えば、多数の因子に応答して開始されることがある。このような因子は、肉体的損傷、細胞障害性損傷、代謝的ストレスまたは発生的刺激を包含する。病理学と治癒（または代謝的最適化）との間のモジュレーションは、一部分、刺激された細胞と細胞外基質ならびに局所的溶媒との相互作用により実施することができる。

## 【0002】

細胞とそれらの環境との間の相互作用においてある役割を演じ、かつ細胞外基質と細胞との界面において作用するように思われるタンパク質の1ファミリーは、脂肪細胞補体関係タンパク質である。これらのタンパク質は、Acrp30、すなわち、脂肪細胞により独占的に発現される247アミノ酸のポリペプチド、を包含する。Acrp30ポリペプチドは、アミノ末端のシグナル配列、未知の相同性を有する27アミノ酸のストレッチ、22の完全なGly - Xaa - Proまたは不完全なGly - Xaa - Xaaコラーゲン反復およびカルボキシ末端の球状ドメインから構成されている。

## 【0003】

Scherer他、J. Biol. Chem. 270(45) : 26746 - 9、1995および国際特許出願No. WO 96/39429参照。Acrp30、インスリンにより調節される豊富なヒト血清タンパク質は、特にカルボキシ末端の球状ドメインにおいて、補体因子Clqおよび冬眠するシベリアシマリスの夏血清タンパク質(Hib27)に対して構造的類似性を共有する。Acrp30の発現は脂肪細胞の分化の間に100を超えて誘導される。Acrp30はエネルギー収支のモジュレーションおよび被験試料中の脂肪細胞の同

定において使用することが示唆されている。

【0004】

追加のメンバーは、zsig37 (WO 99/04000)、すなわち、心臓、大動脈および胎盤において主として発現され、14のコラーゲン反復およびAcrp30に類似するClq球状ドメインを有する、281アミノ酸残基のタンパク質、を包含する。zsig37は補体活性を阻害することが示され、SK5繊維芽細胞に結合し、Clq-細胞応答を開始することが知られている濃度において増殖を刺激する。また、zsig37は、投与量依存的方法で、ヒト全血および血小板に富んだプラスミド中の血小板のコラーゲン活性化を特異的に阻害する(同時継続米国出願、09/253,640)。また、zsig39 (WO 99/10492)、すなわち、心臓および小腸において主として発現され、22または23のコラーゲン反復およびAcrp30およびzsig37に類似するClqドメインを有する、243アミノ酸残基のタンパク質、が包含する。

【0005】

これらのタンパク質のすべてはClqドメインを共有する。補体因子Clqは3つの関係するポリペプチド(A、BおよびC鎖)の6コピーから成り、各ポリペプチドは約225アミノ酸長さであり、付近のアミノ末端のコラーゲンドメインおよびカルボキシ末端の球状領域を有する。6つの三重らせん領域は6つのA、6つのBおよび6つのC鎖のコラーゲンドメインにより形成されており、中央領域および6つのストークを形成する。球状ヘッド部分はA、BおよびC鎖の球状C末端ドメインのアソシエーションにより形成される。したがって、Clqは中央のフィブリル領域に対して6つのコラーゲン様ストークを介して結合された、6つの球状ヘッドから構成されている。Sellar他、Biochem. J. 274:481-90、1991。

【0006】

この立体配置は花束としばしば呼ばれる。Acrp30は、単一の型のポリペプチド鎖から形成された、同様な花束構造を有する。Acrp30のClq球状ドメインは、10のベータ鎖「ジェリーロール」トポロジーを有することが決定された(ShapiroおよびScherer、Curr. Biol. 8:335-8、1998)。構造因子、例えば、フォルディングトポロジー、保存された残基および同様なトリマー界面およびイントロンの位置は腫瘍壊死因子のファミリーに類似し、TNFとClqとの間の結合を示唆す

る。zsig39およびzsig37はその上この構造および相同性を共有する。

#### 【0007】

細胞の相互作用においてある役割を演ずるタンパク質、例えば、転写因子およびホルモンは診断および治療の薬剤として有効である。特異的相互作用、例えば、改造をモジュレートするタンパク質は特に有効であろう。本発明は、本明細書における教示から当業者にとって明らかである、これらおよび他の用途のための、このようなポリペプチドを提供する。

#### 【0008】

##### 発明の要約

1つの面において、本発明は、配列番号2の残基70~252に対して少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸残基の配列を含んでなり、前記配列が、コラーゲン様ドメインを形成するGly - Xaa - XaaおよびGly - Xaa - Proコラーゲン反復、ここでXaaは任意のアミノ酸残基である；およびカルボキシル末端のCIqドメイン；を含んでなる、単離されたポリペプチドを提供する。1つの面において、ポリペプチドは配列番号2の残基18~252に対して少なくとも90%のアミノ酸同一性を有する。関係する態様において、前記ポリペプチドと配列番号2との間の差が保存的アミノ酸置換のためである。

#### 【0009】

他の態様において、コラーゲン様ドメインが14のGly - Xaa - Xaa反復および1つのGly - Xaa - Pro反復から成る。なお他の態様において、ポリペプチドは、アミノ末端の領域；コラーゲン様ドメインを形成する14のGly - Xaa - Xaa反復および1つのGly - Xaa - Pro反復、ここでXaaは任意のアミノ酸残基である；および配列番号2のアミノ酸残基119~123、141~143、149~152、156~158、162~173、178~184、189~196、200~211、216~221、および240~244に対応する10ベータ鎖を含んでなるカルボキシル末端のCIqドメイン；を含んでなる。それ以上の態様において、ポリペプチドは配列番号2のポリペプチドと特異的に結合する抗体と特異的に結合する。

#### 【0010】

他の態様において、コラーゲン様ドメインは配列番号2のアミノ酸残基70~111

を含んでなる。他の態様において、Clqドメインは配列番号2のアミノ酸残基112～252を含んでなる。他の態様において、ポリペプチドは配列番号2の残基70～252、配列番号2の残基18～252、または配列番号2の残基1～252を含んでなる。他の態様において、ポリペプチドは分子間ジサルファイド結合により複合化されてホモトリマーを形成している。なお他の態様において、ポリペプチドは分子間ジサルファイド結合によりコラーゲン様ドメインを有する1またはそれ以上のポリペプチドに対して複合化されて、ヘテロトリマーを形成している。

【0011】

それ以上の態様において、ポリペプチドは、アミノまたはカルボキシル末端において、親和標識、トキシン、ラジオヌクレオチド、酵素および発蛍光団から成る群から選択される部分に共有結合されている。本発明は、また、下記のポリペプチドから成る群から選択される単離されたポリペプチドを提供する：a) 配列番号2の残基70～残基111のアミノ酸残基の配列から成るポリペプチド；およびb) 配列番号2の残基112～残基252のアミノ酸残基の配列から成るポリペプチド。

【0012】

他の態様において、ペプチド結合により結合された第1部分および第2部分から本質的に成り、前記第1部分は、

a) 配列番号2の残基70～252に対して少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸残基の配列を含んでなり、前記配列が、コラーゲン様ドメインを形成するGly - Xaa - XaaおよびGly - Xaa - Proコラーゲン反復、ここでXaaは任意のアミノ酸残基である；およびカルボキシル末端のClqドメイン；を含んでなるポリペプチド；

【0013】

b) アミノ末端の領域；コラーゲン様ドメインを形成する14のGly - Xaa - Xaaコラーゲン反復および1つのGly - Xaa - Proコラーゲン反復、ここでXaaは任意のアミノ酸残基である；および配列番号2のアミノ酸残基119～123、141～143、149～152、156～158、162～173、178～184、189～196、200～211、216～221、および240～244に対応する10ペータ鎖を含んでなるカルボキシル末端のClqドメイン；を含んでなるポリペプチド；

## 【0014】

c) コラーゲン様ドメインまたはトリマー化またはオリゴマー化することはできないコラーゲン様ドメインの部分を含んでなる、配列番号2に示すzacrp5ポリペプチドの部分；

d) ClqドメインまたはClqドメインの活性部分を含んでなる、配列番号2に示すzacrp5ポリペプチドの部分；またはe) コラーゲン様ドメインおよびClqドメインを含んでなる、配列番号2に示すzacrp2ポリペプチドの部分；

から成る群から選択されるポリペプチドから成り；そして前記第2部分は他のポリペプチドを含んでなる。

## 【0015】

関係する態様において、第1部分は、

a) 配列番号2のアミノ酸残基70～アミノ酸残基111の配列から成るポリペプチド；

b) 配列番号2のアミノ酸残基112～アミノ酸残基252の配列から成るポリペプチド；

c) 配列番号2のアミノ酸残基70～252の配列から成るポリペプチド；

d) 配列番号2のアミノ酸残基18～252のアミノ酸残基の配列から成るポリペプチド；および

e) 配列番号2のアミノ酸残基1～252アミノ酸残基の配列から成るポリペプチド；

から成る群から選択される。

本発明は、また、薬学上許容されるビヒクルと組み合わせられた、前述のポリペプチドを提供する。

## 【0016】

他の面において、本発明は、動物にポリペプチドを接種し、ポリペプチドは、

a) 配列番号2の残基70～252に対して少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸残基の配列を含んでなり、前記配列が、コラーゲン様ドメインを形成するGly - Xaa - XaaおよびGly - Xaa - Proコラーゲン反復、（ここでXaaは任意のアミノ酸残基である）；およびカルボキシル末端のClqドメイン；を含んでなる

ポリペプチド；

【0017】

b) アミノ末端の領域；コラーゲン様ドメインを形成する14のGly - Xaa - Xaaコラーゲン反復および1つのGly - Xaa - Proコラーゲン反復、ここでXaaは任意のアミノ酸残基である；および配列番号2のアミノ酸残基119～123、141～143、149～170、156～158、162～173、178～184、189～196、200～211、216～221、および240～244に対応する10ベータ鎖を含んでなるカルボキシル末端のC1qドメイン；を含んでなるポリペプチド；

c) コラーゲン様ドメインまたはトリマー化またはオリゴマー化することはできないコラーゲン様ドメインの部分を含んでなる、配列番号2に示すzacrp5ポリペプチドの部分；

【0018】

d) C1qドメインまたはC1qドメインの活性部分を含んでなる、配列番号2に示すzacrp5ポリペプチドの部分；または

e) コラーゲン様ドメインおよびC1qドメインを含んでなる、配列番号2に示すzacrp5ポリペプチドの部分；

から成る群から選択され；そしてここで前記ポリペプチドは動物において免疫応答を誘発して抗体を産生し；

そして動物から抗体を単離する、ことを含む、ポリペプチドに対する抗体を産生する方法を提供する。

【0019】

また、前述のポリペプチドに特異的に結合する抗体または抗体フラグメントが提供される。1つの態様において、抗体は、

- a) ポリクローナル抗体；
- b) ネズミモノクローナル抗体；
- c) 上記b) に由来するヒト化モノクローナル抗体；および
- d) ヒトモノクローナル抗体；

から成る群から選択される。

他の態様において、抗体フラグメントは、F(ab')、F(ab)、Fab'、Fab、Fv

、scFv、および最小認識単位から成る群から選択される。他の態様において、前述の抗体に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体が提供される。また、本発明によれば、前述のポリペプチドのエピトープに特異的に結合する結合性タンパク質が提供される。

【0020】

他の面において、本発明は、前述の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を提供する。また、本発明において、

- a) 配列番号1のヌクレオチド1～ヌクレオチド759のヌクレオチド配列；
- b) 配列番号1のヌクレオチド52～ヌクレオチド759のヌクレオチド配列；
- c) 配列番号1のヌクレオチド208～ヌクレオチド303のヌクレオチド配列；
- d) 配列番号1のヌクレオチド334～ヌクレオチド759のヌクレオチド配列；
- e) 配列番号1のヌクレオチド208～ヌクレオチド759のヌクレオチド配列；
- f) 配列番号1のヌクレオチド52～ヌクレオチド111のヌクレオチド配列；

【0021】

- g) 配列番号2の残基70～111のアミノ酸残基の配列から成るポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；
  - h) 配列番号2の残基112～残基252のアミノ酸残基の配列から成るポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；
  - i) ストリンジェント洗浄条件後に、配列番号1のヌクレオチド配列、または配列番号1の相補体から成るポリヌクレオチドに対してハイブリダイゼーションして止まるポリヌクレオチド；
  - j) 上記a)、b)、c)、d)、e)、f)、g)、h)またはi)に対して相補的であるヌクレオチド配列；および
  - k) 上記g)またはh)の縮重ヌクレオチド配列；
- から成る群から選択される単離されたポリヌクレオチドが提供される。

【0022】

また、前述の融合タンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチドが提供される。

本発明は、また、配列番号12のヌクレオチド1～ヌクレオチド756のヌクレオチ

ド配列から成る単離されたポリヌクレオチド。

他の面において、本発明は、下記の作用可能に連鎖された因子を含んでなる発現ベクターを提供する：転写プロモーター；前述のポリペプチドをコードするDNAセグメント；および転写ターミネーター。1つの態様において、DNAセグメントはポリペプチドに作用可能に連鎖された分泌シグナル配列をさらにコードする。関係する態様において、分泌シグナル配列は配列番号2の残基1～17を含んでなる。

#### 【0023】

本発明は、また、前述の発現ベクターは導入されており、前記DNAセグメントによりコードされるポリペプチドを発現する、培養された細胞を提供する。1つの態様において、培養された細胞はコラーゲン様ドメインを有するポリペプチドをコードするDNAセグメントを含んでなる、1またはそれ以上の発現ベクターをさらに含む。他の面において、本発明は、前述の発現ベクターは導入された細胞を培養し；ここで前記細胞は前記DNAセグメントによりコードされる前記タンパク質を発現し；そして前記発現された細胞を回収する；ことを含む、タンパク質を製造する方法を提供する。1つの態様において、発現されたタンパク質はホモトリマーである。他の態様において、発現されたタンパク質はヘテロトリマーである。

#### 【0024】

本発明は、(a) zacrp5核酸プローブをハイブリダイゼーション条件下に(i) 生物学的試料から単離された被験RNA分子、または(ii) 単離されたRNA分子から合成された核酸分子と接触させ、ここでプローブは前述の核酸分子のヌクレオチド配列の一部を含んでなるヌクレオチド配列、またはその補体から成り；そして(b) 核酸プローブと被験RNA分子または合成された核酸分子とのハイブリッドの形成を検出する；ことを含む、ここでハイブリッドの存在は生物学的試料中のzacrp5 RNAの存在を示す、生物学的試料中のzacrp5遺伝子の発現の存在を検出する方法を提供する。

#### 【0025】

他の面において、(a) 生物学的試料を前述の抗体、または抗体フラグメント

と接触させ、ここで生物学的試料に対する抗体または抗体フラグメントの結合を可能とする条件下に接触を実施し；、そして(b)結合した抗体または結合した抗体フラグメントを検出する；ことを含む、生物学的試料中のzacrp5の存在を検出する方法が提供される。

#### 【0026】

##### 発明の詳細な説明

本発明を詳細に説明する前に、下記の用語を定義することはその理解の助けとなるであろう：

用語「親和標識」は、本明細書において、ポリペプチドの精製または検出を提供するか、あるいは基質へのポリペプチドの結合部位を提供するために、ペプチドに結合させることができるポリペプチドのセグメントを表すために使用される。原理的には、抗体または他の特異的な結合因子が利用可能な任意のペプチドまたはタンパク質を親和標識として使用することができる。

#### 【0027】

親和標識は下記のを包含する：ポリヒスチジントラクト、プロテインA (Nilsson他、EMBO J. 4:1075、1985；Nilsson他、Methods Enzymol. 198:3、1991)、グルタチオンSトランスフェラーゼ (SmithおよびJohnson、Gene 67:31、1988)、サブスタンスP、Flag<sup>TM</sup>ペプチド (Hopp他、Biotechnology 6:1204-10、1988、Eastman Kodak Co.、コネチカット州ニューヘブン、から入手可能である)、ストレプトチアビジン結合ペプチド、または他の抗原エピトープまたは結合ドメイン。一般に、Ford他、Protein Expression and Purification 2:95-107、1991、参照。親和標識をコードするDNAは、商業的供給会社から入手可能である (例えば、Pharmacia Biotech、ニュージャージー州ピスカタウェイ)。

#### 【0028】

用語「アレレ変異型」は、本明細書において、同一染色体遺伝子座を占有する遺伝子の2またはそれ以上のオールタネイト形態の任意のものを表すために使用される。アレレの変動は突然変異により天然に起こり、そして集団内に表現型の多形性を生じさせることがある。遺伝子の突然変異はサイレント (コードされた

ポリペプチドの非変化)であるか、あるい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。アレレ変異型という用語は、また、本明細書において遺伝子のアレレ変異型によりコードされるタンパク質を表すために使用される。

【0029】

用語「アミノ末端」または「カルボキシル末端」は、本明細書において、ポリペプチド内の位置を表すために使用される。この関係が許す場合、これらの用語は近接性または相対的位置を表すためにポリペプチドの特定の配列または部分を参照して使用される。例えば、ペプチド内の参照配列に対してカルボキシル末端に位置するある種の配列は、参照配列のカルボキシル末端に対して近接して位置するが、完全なポリペプチドのカルボキシル末端に必ずしも存在しない。

【0030】

用語「相補体/抗相補体の対」は、適当な条件下に非共有結合的にアソシエートした安定な対を形成する、非同一部分を表す。例えば、ビオチンおよびアビジン(またはストレプトアビジン)は、相補体/抗相補体の対のプロトタイプのメンバーである。他の典型的な相補体/抗相補体の対は、レセプター/リガンドの対、抗体/抗原(またはハプテンまたはエピトープ)の対、センス/アンチセンスポリヌクレオチドの対、およびその他を包含する。相補体/抗相補体の対の引き続く解離を望む場合、補体/抗補体の対は好ましくは $< 10^9$  / Mの結合アフィニティを有する。

【0031】

用語「ポリヌクレオチド分子の相補体」は、相補的塩基配列を有しかつ参照配列に比較して逆の向きを有するポリヌクレオチド分子である。例えば、配列5' ATGCACGGG 3'は5' CCCGTGCAT 3'に対して相補的である。

用語「contig」は、他のポリヌクレオチドに対して同一であるか、あるいは相補的な配列の隣接するストレッチを有するポリヌクレオチドを表す。隣接する配列は、それらの全体においてあるいはポリヌクレオチドの部分的ストレッチに沿って、ポリヌクレオチド配列の所定のストレッチを「オーバーラップ」させると言われる。例えば、ポリヌクレオチド配列5' - ATGGCTTAGCTT - 3'に対する代表的

なcontigは5' - TAGCTTgagtct - 3'および3' - gtcgacTACCGA - 3'である。

【0032】

用語「縮重ヌクレオチド配列」は、1またはそれ以上の縮重コドンを含むヌクレオチド配列（ポリペプチドをコードする参照ポリヌクレオチド分子と比較して）を表す。縮重コドンはヌクレオチドの異なるトリプレットを含有するが、同一アミノ酸残基をコードする（すなわち、GAUおよびGACのトリプレットの各々はAspをコードする）。

【0033】

用語「発現ベクター」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鎖された、問題のポリペプチドをコードするセグメントからなる、線状または円形のDNA分子を表すために使用される。このような追加のセグメントは、プロモーターおよびターミネーターの配列を包含し、そして、また、1またはそれ以上の複製起点、1またはそれ以上の選択可能なマーカー、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、およびその他を包含することができる。発現ベクターは、一般に、プラスミドまたはウイルスDNAから誘導されるか、あるいは双方の因子を含有することができる。

【0034】

用語「単離された」は、ポリヌクレオチドに適用されるとき、ポリヌクレオチドがその自然の遺伝的環境から取出され、こうして他の余分のまたは望ましくないコーディング配列を含まず、そして遺伝子操作されたタンパク質の産生系内で使用するために適当な形態であることを表す。このような単離された分子はそれらの自然の環境から分離されたものであり、そしてcDNAおよびゲノムのクローンを包含する。本発明の単離されたDNA分子は、それらが通常アソシエートされる他の遺伝子を含まないが、天然に存在する5'および3'の非翻訳領域、例えば、プロモーターおよびターミネーターを包むことができる。アソシエートされた領域の同定は当業者にとって明らかであろう（例えば、DyanおよびTijan、Nature 316 : 774 - 78、1985、参照）。

【0035】

「単離された」ポリペプチドまたはタンパク質は、その自然環境、例えば、血

液および動物の組織、以外の条件において見出されるポリペプチドまたはタンパク質である。好ましい形態において、単離されたポリペプチドは他のポリペプチド、特に動物由来の他のポリペプチドを実質的に含まない。高度に精製された形態、すなわち、95%より大きい純度、より好ましくは99%より大きい純度のポリペプチドを提供することが好ましい。この関係において使用するとき、用語「単離された」は別の物理的形態、例えば、二量体、あるいはグリコシル化または誘導化された形態の同一のポリペプチドの存在を排除しない。

#### 【0036】

用語「作用可能に連鎖された」は、DNAセグメントについて言及するとき、セグメントがそれらの意図する目的のために調和して機能するように、例えば、転写がプロモーターにおいて開始し、コーディングセグメントを通してターミネーターに進行するように、セグメントが配置されていることを示す。

用語「オーソログ」は、異なる種からのポリペプチドまたはタンパク質の機能的対応物である、1つの種から得られたポリペプチドまたはタンパク質を表す。オーソログ間の配列の差は種形成の結果である。

「パラログ」は、生物により作られた、明確な、構造的に関係するタンパク質である。パラログは遺伝子の重複を通して生ずると考えられる。例えば、 $\alpha$ -グロビン、 $\beta$ -グロビン、およびミオグロビンは互いにパラログである。

#### 【0037】

「ポリヌクレオチド」は、5' 3'末端の方向に読んだ、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド塩基の一本鎖または二本鎖のポリマーである。ポリヌクレオチドはRNAおよびDNAを包含し、天然源から単離され、in vitroで合成されるか、あるいは天然の分子と合成の分子との組み合わせから製造することができる。ポリヌクレオチドのサイズは、塩基対(略号「bp」)、ヌクレオチド(「nt」)、またはキロ塩基(「kb」)として表される。この関係が許す場合、後者の2つの用語は一本鎖または二本鎖であるポリヌクレオチドを記載することができる。

#### 【0038】

この用語を二本鎖の分子に適用するとき、それは全体の長さを表すために使用

され、そして用語「塩基対」に等しいと理解されるであろう。当業者は認識するように、二本鎖ポリヌクレオチドの2つの鎖はわずかに長さが異なることがあり、そして酵素の切断の結果その末端は食い違うことがある；こうして、二本鎖ポリヌクレオチド内のすべてのヌクレオチドは対合していなことがある。このような不對末端は一般に20ヌクレオチド長さを越えない。

「ポリペプチド」は、自然にまたは合成的に生産された、ペプチド結合により結合されたアミノ酸残基のポリマーである。約10アミノ酸残基より小さいポリペプチドは普通に「ペプチド」と呼ばれる。

#### 【0039】

「プローブおよび/またはプライマー」は、本明細書において使用するとき、RNAまたはDNAであることができる。DNAはcDNAまたはゲノムDNAであることができる。ポリヌクレオチドのプローブおよびプライマーは一本鎖または二本鎖のDNAまたはRNAであり、一般に合成オリゴヌクレオチドであるが、クローニングされたcDNAまたはゲノム配列またはその補体から発生させることができる。分析用プローブは一般に少なくとも20ヌクレオチド長さであるが、多少これより短いプローブ(14~17ヌクレオチド)を使用することができる。PCRプライマーは少なくとも5ヌクレオチド長さ、好ましくは15ntまたはそれより長い、より好ましくは20~30ntである。

#### 【0040】

遺伝子の小さい領域を分析のためにターゲットするとき、短いポリヌクレオチドを使用することができる。遺伝子の全体の分析のために、ポリヌクレオチドプローブは全体のエクソンまたはそれ以上を含んでなることができる。プローブを、この分野においてよく知られている技術に従い、例えば、酵素、ビオチン、放射性核種、発蛍光団、化学発光因子、常磁性粒子およびその他(これらは多数の源、例えば、モレキュラー・プローブス・インコーポレーテッド(Molecular Probes, Inc.)、オレゴン州エウジーン、およびアマーシャム・コーポレーション(Amersham Corporation)、イリノイ州アーリントン・ハイツ、から商業的に入手可能である)で標識化して検出可能なシグナルを提供することができる。

#### 【0041】

用語「プロモーター」は、本明細書において、RNAポリメラーゼの結合を提供しかつ転写を開始させるDNA配列を含有する遺伝子の部分を表す、この分野において認識されている意味において使用される。プロモーター配列は普通に、しかし常にではないが、遺伝子の5'非コーディング領域の中に見出される。

【0042】

用語「レセプター」は、生物活性分子（すなわち、リガンド）に結合し、細胞上のリガンドの作用を伝達する、細胞関連タンパク質を表す。膜に結合したレセプターは、細胞外リガンド結合性ドメインと、典型的にはシグナルトランスダクションに関係する細胞内エフェクタードメインとからなる、多ペプチド構造により特徴づけられる。レセプターへのリガンドの結合は、エフェクタードメインと、細胞中の1またはそれ以上の他の分子との間の相互作用を引き起こす、レセプターにおけるコンフォメーションの変化を生ずる。この相互作用は、引き続いて、細胞の代謝の変更に導く。

【0043】

レセプター - リガンドの相互作用に関係する代謝の事象は、遺伝子の転写、リン酸化、脱リン酸化、サイクル的AMP産生の増加、細胞のカルシウムの移動化、膜脂質の移動化、細胞の接着、イノシトール脂質の加水分解、およびリン脂質の加水分解を包含する。大部分の核レセプターは、また、アミノ末端のトランス作用性ドメイン、DNA結合性ドメインおよびリガンド結合性ドメインを包含する、多ドメイン構造を示す。一般に、レセプターは、膜結合、細胞質ゾルまたは核レセプター；モノマーのレセプター（例えば、甲状腺刺激ホルモンのレセプター、ベータ - アドレナリン作動性レセプター）またはマルチマーのレセプター（例えば、PDGFレセプター、成長ホルモンレセプター、IL - 3レセプター、GM - CSFレセプター、G - CSFレセプター、エリトロポイエチンレセプターおよびIL - 6レセプター）であることができる。

【0044】

用語「分泌シグナル配列」は、ポリペプチド（「分泌ペプチド」）をコードするDNA配列を表し、それは、より大きいポリペプチドの1成分として、より大きいポリペプチドが合成される細胞の分泌経路を通してそのポリペプチドを向ける。

通常、より大きいポリペプチドは、分泌経路を通る移行の間に切断されて、分泌ペプチドを除去する。

【0045】

「可溶性レセプター」は、細胞膜に結合しないレセプターポリペプチド。最も普通には、可溶性のレセプターはトランスメンブランおよび細胞質ドメインを欠如するリガンド結合性レセプターのポリペプチドである。可溶性レセプターは、追加のアミノ酸残基、例えば、ポリペプチドの精製を提供するまたは基質へのポリペプチドの結合部位を提供する親和標識を含んでなることができる。多数の細胞表面のレセプターは、タンパク質分解により産生されるか、あるいは選択的にスプライスされたmRNAから翻訳される、天然に存在する、可溶性対応物を有する。レセプターのポリペプチドは、それぞれ、膜の定着またはシグナルトランスダクションを提供する、これらのセグメントの十分な部分を欠如するとき、トランスメンブランおよび細胞内ポリペプチドのセグメントを実質的に含まないと言われる。

【0046】

用語「スプライス変異型」は、本明細書において、遺伝子から転写されたRNAの別の形態を表すために使用される。スプライス変異型は転写されたRNA分子内の、あるいはそれ程普通ではないが別々に転写されたRNA分子の間の、オルタネイトスプライス部位の使用により自然に発生し、そして同一遺伝子から転写されたいくつかのmRNAを生ずることがある。スプライス変異型は、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。また、スプライス変異型という用語は、本明細書において、ある遺伝子から転写されたmRNAのスプライス変異型によりコードされるタンパク質を表すために使用される。

【0047】

不正確な分析法（例えば、ゲル電気泳動）により決定されたポリマーの分子量および長さは、近似値であると理解されるであろう。このような値を「約」Xまたは「ほぼ」Xとして表すとき、Xの記載する値は±10%の正確さであると理解されるであろう。

【0048】

本発明は、一部分、脂肪細胞補体関係タンパク質zsig37 (WO 99/04000) に対する相同性を有する新規なDNA配列の発見に基づく。このDNA配列は、アミノ末端のシグナル配列、非相同性の隣接するN末端領域、14のコラーゲン反復から構成されたコラーゲンドメインおよびカルボキシ末端の球状様C1qドメインを有するポリペプチドをコードする。前述の一般的ポリペプチド構造はzsig37、zsig39、Acrp30およびC1qドメインにより共有される(図面参照)。整列されたタンパク質中のカルボキシ末端の球状C1qドメインの中に見出される、相同性の他の領域は、本発明において、他のファミリーメンバーを検索する有用なプライマーとして同定された。例えば、zsig37、zsig39、Acrp30およびC1qドメインは、プライマーを使用する検索において同定されるであろう、鎖内ジサルファイド結合は配列番号2の残基26、29、30、112および158においてシステインを含むことができる。

#### 【0049】

本発明の新規なzacrp5ポリヌクレオチドは、仕上げられていないゲノム配列において最初に同定された。ゲノム配列は染色体16に由来する遺伝子座HS349E11上に位置する。配列番号7は、開始コドンにおいて開始するzacrp5の同定されたエクソン1、ヌクレオチド1~208、イントロン1、ヌクレオチド209~870および停止コドンにおいて終わるエクソン2、ヌクレオチド871~1421を提供する。厳格にエクソン予測と呼ぶものを使用して、新規な脂肪細胞補体関係因子は他の脂肪細胞補体関係因子、zsig37 (WO 99/04000) に対して相同性であることが見出された。

#### 【0050】

zacrp5と他のファミリーのメンバーとの間の全分子にわたるアミノ酸レベルにおける同一性百分率を表1Aに示す。C1qドメインにわたる同一性百分率を表1Bに示す。整列は下記のデフォルト設定を有するクルスタルクス(Clustalx)多重整列ツールを使用して実行した：ブラサム系列重量マトリックス(Blosum Series Weight Matricies)、ギャップオープニングペナルティ：10.0、ギャップエクステンションペナルティ：0.05。同一性百分率を計算する前に、多重整列を手によりさらに同調させた。同一性百分率はオーバーラップにわたる同一残基の

数である。

【0051】

【表1】

表1

表1 A

	zsig37	zacrp5	ACRP30	zsig39	Clq C
zsig37	100.0	48.0	27.9	24.7	20.0
zacrp5	48.0	100.0	25.0	25.5	21.2
ACRP30	27.9	25.0	100.0	35.4	33.2
zsig39	24.7	25.5	35.4	100.0	32.9
Clq C	20.0	21.2	33.2	32.9	100.0

表1 B

	zacrp5	zsig37	zsig39	ACRP30	Clq C
zacrp5	100.0	57.4	27.0	27.4	22.1
zsig37	57.4	100.0	28.4	31.1	21.4
zsig39	27.0	28.4	100.0	37.8	38.2
ACRP30	27.4	31.1	37.8	100.0	36.6
Clq C	22.1	21.4	38.2	36.6	100.0

【0052】

zacrp5のヌクレオチド配列を配列番号1に記載し、そしてその推定されたアミノ酸配列を配列番号2に記載する。一般に前述したように、zacrp5ポリペプチドは配列番号2のアミノ酸1 (Met) ~ アミノ酸残基17 (Ala) の範囲のシグナル配列

、配列番号1のヌクレオチド1～51を包含する。したがって、成熟ポリペプチドは配列番号2のアミノ酸18 (Trp)～アミノ酸残基252 (Leu)、配列番号1のヌクレオチド52～759の範囲である。成熟ポリペプチド内で、配列番号2のアミノ酸18 (Trp)～アミノ酸残基69 (Lys)、配列番号1のヌクレオチド52～207の間の範囲の、既知の相同性をもたないN末端領域が見出された。さらに、コラーゲン様ドメインが配列番号2のアミノ酸70 (Gly) および111 (Ala)、配列番号1のヌクレオチド208～333の間に見出された。

#### 【0053】

コラーゲン様ドメインにおいて、1つの完全なGly - Xaa - Proおよび13の不完全なGly - Xaa - Xaa反復が観測された。Acrp30は22の完全なまたは不完全な反復を含有する。zsig37は14コラーゲン反復を有し、そしてzsig39は22または23コラーゲン反復を有する。このドメインにおいて配列番号2のアミノ酸残基90および108に見出されるプロリン残基をヒドロキシル化することができる。zacrp5ポリペプチドは、また、配列番号2の約アミノ酸112 (Cys)～252 (Leu)、配列番号1のヌクレオチド334～759の範囲のカルボキシル末端のC1qドメインを含む。

#### 【0054】

C1qドメイン内にかなりな量の保存された構造が存在して、適切なフォルディングを可能とする。不完全な芳香族モチーフ (F - X (5) - [ND] - X (4) - [FYWL] - X (6) - F - X (5) - G - X - Y - X - F - X - [FY] (配列番号8) が配列番号2の残基138 (Phe)～168 (Leu) の間に見出された。Xはアミノ酸残基を表し、そして括弧 ( ) 中の数字は残基のアミノ酸の数を表す。正方形の括弧 [ ] 内に含有されるアミノ酸残基は、その特定の位置におけるアミノ酸残基の選択を制限する。このモチーフの最後残基はPheまたはTyrの代わりにLeuである。zacrp5ポリペプチド、ヒトzsig37、ヒトzsig39、ヒトC1q CおよびAcrp30はコラーゲンドメイン内およびC1qドメインにおいて相同性であるように思われるが、成熟ポリペプチドのN末端部分において相同性であるように思われない。

#### 【0055】

本発明の他の面は、zacrp5ポリペプチドフラグメントを包含する。好ましいフラグメントは、配列番号2のアミノ酸1 (Met)、18 (Trp) または70 (Gly)～ア

ミノ酸111 (Ala) の範囲のzacrp5ポリペプチドのコラーゲン様ドメインを含有するフラグメント、コラーゲン様ドメインを含有するzacrp5ポリペプチドの部分または二量化またはオリゴマー化することができるコラーゲン様ドメインの部分を含む。本明細書において使用するとき、「コラーゲン」または「コラーゲン様ドメイン」は1系列の反復するトリプレットアミノ酸配列を意味し、「反復」または「コラーゲン反復」はモチーフGly - Xaa - ProまたはGly - Xaa - Xaaにより表され、ここでXaaは任意のアミノ酸残基である。

【0056】

このようなドメインは14程度に多いまたはそれより多いコラーゲン反復を含有することができる。そのうえ、このようなコラーゲン様ドメインを含有するフラグメントまたはタンパク質は、ヘテロマー構築物、通常トリマーを形成することができる。構造分析および他のコラーゲン様ドメインを含有するタンパク質に対する相同性は、コラーゲン様ドメインを含んでなるzacrp5ポリペプチド、フラグメントまたは融合物が他のコラーゲンドメインを含有するポリペプチドと複合化してホモトリマーおよびヘテロトリマーを形成することができることを示す。

【0057】

これらのコラーゲン様ドメインを含有するフラグメントは、いっそう詳しく後述するように、コラーゲンのトリマー化またはオリゴマー化の研究においてまたは融合タンパク質の形成において特に有用である。このようなフラグメントをコードするポリヌクレオチドは、また、本発明に包含され、

(a) 配列番号1に示すヌクレオチド1、52または208～ヌクレオチド333のヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド分子；

(b) 配列番号2のアミノ酸残基70 (Gly) ~ アミノ酸残基111 (Ala) のアミノ酸配列に対して少なくとも80%のアミノ酸配列の同一性を有するzacrp5ポリペプチドフラグメントをコードするポリヌクレオチド分子；

(c) 上記 (a) または (b) に対して相補的な分子；および

(d) zacrp5ポリペプチドのコラーゲン様ドメインのフラグメントをコードする縮重ヌクレオチド配列；から成るグループを含む。

【0058】

他のコラーゲン様ドメインを含有するポリペプチドは、脂肪細胞補体関係タンパク質のファミリーのメンバー、例えば、zsig37、zsig39およびAcrp30を包含する。本発明のトリマーのタンパク質は、ポリペプチド内の保存されたシステイン残基の間で形成された分子間ジサルファイド結合により形成される。したがって、本発明は、分子間ジサルファイド結合により複合化されてホモトリマーを形成するzacrp6ポリペプチドを提供する。さらに、本発明は、分子間ジサルファイド結合によりコラーゲン様ドメインを有する他のポリペプチドに対して複合化されてヘテロトリマーを形成するzacrp5ポリペプチドを提供する。

#### 【0059】

他の好ましいフラグメントは、配列番号2のアミノ酸112 (Cys) ~ 252 (Leu) の範囲のzacrp5ポリペプチドの球状C1qドメイン、C1qドメインを含有するzacrp5ポリペプチドの部分またはC1qドメインの活性部分を含む。他のC1qドメインを含有するタンパク質は、zsig37 (WO 99/04000)、zsig39 (WO 99/10492)、C1q A、BおよびC (Sellar他、前掲、Reid、前掲、およびReid他、Biochem. J. 203: 559 - 69、1982)、シマリス冬眠関連血漿タンパク質HP - 20、HP - 25およびHP - 27 (Takamatsu他、Mol. Cell. Biol. 13: 1516 - 21、1993およびKondoおよびKondo、J. Biol. Chem. 267: 473 - 8、1992)、ヒトプレセレベリン (Urade他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1069 - 73、1991)、ヒト内皮細胞マルチメリン (Hayward他、J. Biol. Chem. 270: 18246 - 51、1995) および脊椎動物コラーゲンVIIIおよびX型 (Muragaki他、Eur. J. Biochem. 197: 615 - 22、1991) を包含する。

#### 【0060】

ACRP30の球状C1qドメインは、TNFファミリーに対する有意な相同性を示す10ベータ鎖「ジェリーロール」トポロジー (ShapiroおよびScherer、Curr. Biol. 8: 335 - 8、1998) を有することが決定され、そして配列番号2により表されるzacrp5配列はこの構造のすべての10のベータ鎖 (アミノ酸残基119 ~ 123、141 ~ 143、149 ~ 152、156 ~ 158、162 ~ 173、178 ~ 184、189 ~ 196、200 ~ 211、216 ~ 221、および240 ~ 244) を含有する。これらの鎖は、それぞれ、「A」、「A'」、「B」、「B'」、「C」、「D」、「E」、「F」、「G」および「H」と表示した。

## 【0061】

zacrp5は、アミノ酸残基125～151および183～196に、2つのレセプター結合性ループを有する。アミノ酸残基162 (Gly)、164 (Tyr)、211 (Leu) および241 (Phe) は、CD40、TNF、TNF、ACRP30およびzacrp5を包含するスーパーファミリーを通して保存されるように思われる。

## 【0062】

これらのフラグメントは、細胞および細胞外基質の相互作用の研究およびモジュレーションにおいて特に有用である。抗菌活性は、また、このようなフラグメントの中に存在することがある。TNFタンパク質に対する相同性は、このようなフラグメントが肥満症に関係するインスリン耐性、免疫調節、炎症応答、アポトーシスおよび溶骨細胞の成熟において有用であろう。

## 【0063】

このようなフラグメントをコードするポリヌクレオチドは、また、本発明に包含され、

(a) 配列番号1に示すヌクレオチド334～ヌクレオチド252のヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド分子；

(b) 配列番号2のアミノ酸残基112 (Phe)～アミノ酸残基252 (Leu) のアミノ酸配列に対して少なくとも80%のアミノ酸配列の同一性を有するzacrp5ポリペプチドフラグメントをコードするポリヌクレオチド分子；

(c) 上記 (a) または (b) に対して相補的な分子；および

(d) zacrp5ポリペプチドのC1qドメインのフラグメントをコードする縮重ヌクレオチド配列；から成るグループを含む。

## 【0064】

本発明の他のzacrp5ポリペプチドフラグメントは、コラーゲン様ドメインおよび配列番号2のアミノ酸残基70 (Gly)～252 (Leu) の範囲のC1qドメインの両方を含む。このようなフラグメントをコードするポリヌクレオチドは、また、本発明に包含され、

(a) 配列番号1に示すヌクレオチド208～ヌクレオチド759のヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド分子；

(b) 配列番号2のアミノ酸残基70 (Gly) ~ アミノ酸残基252 (Leu) のアミノ酸配列に対して少なくとも80%のアミノ酸配列の同一性を有するzacrp5ポリペプチドフラグメントをコードするポリヌクレオチド分子；

(c) 上記 (a) または (b) に対して相補的な分子；および

(d) zacrp5ポリペプチドのコラーゲン様ドメイン - C1qドメインのフラグメントをコードする縮重ヌクレオチド配列；から成るグループを含む。

#### 【0065】

高度に保存されたアミノ酸、特にzacrp5ポリペプチドのカルボキシ末端のC1qドメインにおける高度に保存されたアミノ酸は、新しいファミリーメンバーを同定するツールとして使用することができる。例えば、逆方向転写 - ポリメラーゼ連鎖反応 (RT - PCR) を使用して、種々の組織源から得られたRNAからの保存されたモチーフをコードする配列を増幅することができる。特に、保存された配列から設計された、高度に縮重のプライマーはこの目的に有用である。特に、下記のプライマーおよびそれらの補体はこの目的に有用である：

#### 【0066】

配列番号2のアミノ酸残基161 ~ 166をコードする縮重プライマー配列

MSN GGN NTN TAY TWY YT (配列番号9)

配列番号2のアミノ酸残基214 ~ 219をコードする縮重プライマー配列

SRN GAN VVN GTN TGG BT (配列番号10)

配列番号2のアミノ酸残基240 ~ 245をコードする縮重プライマー配列

RYN TTY WSN GGN YWY YT (配列番号11)

前述のポリヌクレオチドの相補体に対応するプローブがまた包含される。

#### 【0067】

本発明は、また、本明細書に開示するzacrp5ポリペプチドをコードする、DNAおよびRNA分子を包含する、ポリヌクレオチド分子を提供する。種々の組織から配列番号1のポリヌクレオチドを単離するために、プローブおよび/またはプライマーを配列番号1および配列番号7のエクソン予測された領域から設計する。zacrp5を発現する組織は、ハイブリダイゼーション (ノザンプロット) または逆転写酵素 (RT) PCRにより同定することができた。次いで、zacrp5の発現を示す組

織から、ライブラリーを発生させる。次いで、本明細書において記載するようにプローブを使用するハイブリダイゼーションおよび/またはプライマーを使用するPCRにより、このようなライブラリーから単一クローンを同定する。cDNA配列のコンフォメーションは、本発明において提供される配列を使用して確認することができる。

【0068】

当業者は容易に認識するように、遺伝暗号のデジェネラシーにかんがみて、かなりの配列変動がこれらのポリヌクレオチド分子間で可能である。配列番号12は、配列番号2のzacrp5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。当業者は認識するように、配列番号11の縮重配列は、また、UをTと置換することによって配列番号2をコードするすべてのRNA配列を提供する。こうして、zacrp5ポリペプチドをコードする配列番号12のヌクレオチド1~ヌクレオチド756およびそれらのRNA同等物は本発明に包含される。縮重ヌクレオチド位置を表すために配列番号12内で使用した1文字コードを表2に記載する。「解」はコード文字により表されるヌクレオチドである。「相補体」は1またはそれ以上の相補的ヌクレオチドのコードである。例えば、コードYはCまたはTを表し、そしてその相補体RはAまたはGを表し、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。

【0069】

【表2】

表2

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

## 【0070】

所定のアミノ酸についてすべての可能なコドンを含む、配列番号12において使用する縮重コドンを表3に記載する。

## 【0071】

## 【表3】

表3

アミノ酸	1文字 コード	コドン	縮重コドン
Cys	C	TGC TGT	TGY
Ser	S	AGC AGT TCA TCC TCG TCT	WSN
Thr	T	ACA ACC ACG ACT	ACN
Pro	P	CCA CCC CCG CCT	CCN
Ala	A	GCA GCC GCG GCT	GCN
Gly	G	GGA GGC GGG GGT	GGN
Asn	N	AAC AAT	AAY
Asp	D	GAC GAT	GAY
Glu	E	GAA GAG	GAR
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
Any	X		NNN

## 【0072】

当業者は認識するように、各アミノ酸をコードするすべての可能なコドンを代表する縮重コドンを決定的するとき、多少の不明確さが導入される。例えば、セリンの縮重コドン(WSN)は、ある環境において、アルギニン(AGR)をコードすることができ、そしてアルギニンの縮重コドン(MGN)は、ある環境において、セ

リン (AGY) をコードすることができる。同様な関係がフェニルアラニンおよびロイシンをコードするコドンの間に存在する。したがって、縮重配列に包含される、いくつかのポリヌクレオチドは変異型アミノ酸配列をコードすることができるが、当業者は、配列番号2のアミノ酸配列を参照することによって、このような変異型配列を容易に同定することができる。変異型配列は、本明細書において記載するように、機能性について容易に試験することができる。

#### 【0073】

また、当業者は認識するように、異なる種は「優先的コドンの使用」を示すことができる。一般に、下記の文献を参照のこと：Grantham他、Nucl. Acids Res. 8：1893 - 912、1980；Haas他、Curr. Biol. 6：315 - 24、1996；Wain-Hobson他、Gene 13：355 - 64、1981；GrosjeanおよびFiers、Gene 18：199 - 209、1982；Holm、Nucl. Acids Res. 14：3075 - 87、1986；Ikemura、J. Mol.

Biol. 158：573 - 97、1982。本発明において使用するとき、用語「優先的コドンの使用」または「優先的コドン」は、ある種の細胞において最も頻繁に使用され、こうして各アミノ酸をコードする可能なコドンの1つまたはわずかの代表的なものに好んで使用される、タンパク質翻訳コドンを言及する、この分野の用語である（表3参照）。

#### 【0074】

例えば、アミノ酸のスレオニン (Thr) はACA、ACC、ACG、またはACTによりコードされることができるが、哺乳動物細胞において、ACCは最も普通に使用されるコドンである；他の種、例えば、昆虫細胞、酵母、ウイルスまたは細菌において、異なるThrコドンは優先的であることができる。特定の種の優先的コドンを、この分野において知られている種々の技術により、本発明のポリヌクレオチドの中に導入することができる。

#### 【0075】

組換えDNAの中への優先的コドンの導入は、例えば、特定の細胞の型または種内のタンパク質の翻訳を効率よくすることによって、タンパク質の産生を増強することができる。したがって、配列番号12に開示されている縮重コドンの配列は、この分野において普通に使用されかつ本明細書において開示する、種々の細胞

の型および種におけるポリヌクレオチドの発現を最適化するための鑄型として働く。優先的コドンを含む配列を、本明細書において開示するように、種々の種における発現について試験し、発現のために最適化し、そして機能性について試験することができる。

#### 【0076】

本発明は、さらに、他の種からの対応物を表すポリペプチドおよびポリヌクレオチド（オーソログ）を提供する。これらの種は下記のを包含するが、これらに限定されない：哺乳動物、トリ、両生類、爬虫類、魚類、昆虫および他の脊椎動物および無脊椎動物。特に興味あるものは、他の哺乳動物種、例えば、ネズミ、ブタ、ヒツジ、ウシ、イヌ、ネコ、ウマ、および他の霊長類のポリペプチドからのzacrp5ポリペプチドである。

#### 【0077】

ヒトzacrp5のオーソログは、本発明により提供される情報および組成物を慣用のクローニング技術と組み合わせて使用して、クローニングすることができる。例えば、本明細書において開示するように、zacrp5を発現する組織および細胞型から得られるmRNAを使用して、cDNAをクローニングすることができる。本明細書において開示する配列から設計されたプローブでノザンロットをプロービングすることによって、mRNAの適当な源を同定することができる。次いで、陽性の組織または細胞系統のmRNAからライブラリーを調製することができる。

#### 【0078】

次いで、種々の方法、例えば、完全なまたは部分的ヒトcDNAで、または開示した配列をベースとする1またはそれ以上の組の縮重プローブでプロービングすることによって、zacrp5をコードするcDNAを単離することができる。また、本明細書に開示する代表的ヒトzacrp5配列から設計したプライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応により、cDNAをクローニングすることができる。追加の方法において、cDNAライブラリーを使用して宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトすることができる、そしてzacrp5ポリペプチドに対する抗体で問題のcDNAの発現を検出することができる。また、ゲノムのクローンの単離に同様な技術を適用することができる。

## 【0079】

当業者は認識するように、配列番号1に開示する配列はヒトzacrp5の単一のアレレを表し、そしてアレレ変異型およびオルタネイトスプライシングが起こることが期待される。この配列のアレレ変異型は、標準的手順に従い、異なる個体からのcDNAまたはゲノムのライブラリーをプロービングすることによって、クローニングすることができる。配列番号1に示すヌクレオチド配列のアレレ変異型は、サイレント突然変異体含有するものおよび突然変異がアミノ酸配列を変化させるものを包含し、配列番号2のアレレ変異型であるタンパク質と同様に、本発明の範囲内に入る。

## 【0080】

交互にスプライスされたmRNAから発生するcDNA分子は、zacrp5ポリペプチドの性質を保持し、このようなcDNAおよびmRNAによりコードされるポリペプチドと同様に、本発明の範囲内に入る。これらの配列のアレレ変異型およびスプライス変異型は、この分野において知られている標準的手順に従い、異なる個体または組織からのcDNAまたはゲノムのライブラリーをプロービングすることによって、クローニングすることができる。

## 【0081】

本発明の好ましい態様において、単離された核酸分子は、ストリンジェント条件下に、配列番号1のヌクレオチド配列を有する核酸分子または配列番号1に対して相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子に対してハイブリダイゼーションするであろう。一般に、ストリンジェント条件は、規定されたイオン強度およびpHにおいて、特定の配列の熱的融点( $T_m$ )よりも約5 低いように選択される。 $T_m$ はターゲット配列の50%が完全に合致するプローブにハイブリダイゼーションする温度(規定されたイオン強度およびpHにおいて)である。

## 【0082】

1対の核酸分子、例えば、DNA - DNA、RNA - RNAおよびDNA - RNAは、ヌクレオチド配列がある程度の相補性を有する場合、ハイブリダイゼーションすることができる。ハイブリッドは二重らせん中のミスマッチ塩基対を許容できるが、ハイブリッドの安定性はミスマッチの程度により影響される。ミスマッチのハイブリッ

ドの $T_m$ は1~1.5%の塩基対ミスマッチ毎に1℃だけ低下する。ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシイを変化させると、ハイブリッドの中に存在するミスマッチの程度をコントロールすることができる。ハイブリダイゼーション温度が増加しかつハイブリダイゼーション緩衝液のイオン強度が減少するにつれて、ストリンジェンシイの程度は増加する。

#### 【0083】

ストリンジェントハイブリダイゼーション条件は、ハイブリッドの $T_m$ よりも約5~25℃低い温度および1Mまでの $Na^+$ を有するハイブリダイゼーション緩衝液を包含する。より低い温度におけるより高い程度のストリンジェンシイはホルムアミドの添加により達成することができる。ホルムアミドは、緩衝液中の1%のホルムアミドにつきハイブリッドの $T_m$ を約1℃だけ低下させる。一般に、このようなストリンジェント条件は20~70℃の温度および6×までのSSCおよび0~50%のホルムアミドを含有するハイブリダイゼーション緩衝液を包含する。より高い程度のストリンジェンシイは、40~70℃の温度において、4×までのSSCおよび0~50%のホルムアミドを含有するハイブリダイゼーション緩衝液を使用して達成可能である。

#### 【0084】

高度にストリンジェントの条件は、典型的には、42~70℃の温度、および1×までのSSCおよび0~50%のホルムアミドを含有するハイブリダイゼーション緩衝液を包含する。ハイブリダイゼーションおよび洗浄の間に異なる程度のストリンジェンシイを使用して、配列に対する最大の特異的結合を達成することができる。典型的には、増加する程度のストリンジェンシイにおいてハイブリダイゼーション後の洗浄を実施して、ハイブリダイゼーションした複合体からハイブリダイゼーションしなかったポリヌクレオチドプローブを除去することができる。

#### 【0085】

上記条件は指針として働くこと意味し、そして当業者は特定のポリペプチドのハイブリッドとともに使用するためにこれらの条件を適合させることができる。特定のターゲット配列の $T_m$ は、ターゲット配列の50%が完全に合致したプローブ配列にハイブリダイゼーションする温度（規定された条件下に）である。 $T_m$ に影

響を及ぼす条件は、ポリヌクレオチドプローブのサイズおよび塩基対含量、ハイブリダイゼーション溶液のイオン強度、およびハイブリダイゼーション溶液中の脱安定化因子の存在を包含する。

【0086】

$T_m$ を計算する多数の方程式はこの分野において知られており、そして変化する長さのDNA、RNAおよびDNA - RNAハイブリッドおよびポリヌクレオチドプローブ配列について特異的である（例えば、下記の文献を参照のこと：Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版（Cold Spring Harbor Press 1989）；Ausubel他（編者）、Current Protocols in Molecular Biology（John Wiley & Sons, Inc. 1987）；BergerおよびKimmel（編者）、Guide to Molecular Cloning Techniques（Academic Press, Inc. 1987）；およびWetmur、Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 26:227（1990））。

【0087】

配列解析ソフトウェア、例えば、OLIGO 6.0（LSR；ミネソタ州ロングレイク）およびPrimer Premier 4.0（Premier Biosoft International；カリフォルニア州パロアルト）、ならびにインターネット上のサイトは、所定の配列を解析しかつユーザー規定基準に基づいて $T_m$ を計算するための入手可能な道具である。また、このようなプログラムにより、規定された条件下に所定の配列を解析し、適当なプローブ配列を同定することができる。典型的には、>50塩基対の、より長いポリヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションを計算した $T_m$ よりも約20~25 だけ低い温度において実施する。<50塩基対の、より小さいプローブについて、ハイブリダイゼーションは典型的には $T_m$ または5~10 だけ低い温度において実施される。これにより、DNA - DNAおよびDNA - RNAハイブリッドについてハイブリダイゼーション速度を最大にすることができる。

【0088】

ポリヌクレオチド配列の長さは、ハイブリッド形成の速度および安定性に影響を及ぼす。<50塩基対の、より小さいプローブ配列は、相補的配列との平衡化に急速に到達するが、低い安定性のハイブリッドを形成することがある。数分から数時間のいずれかのインキュベーション時間を使用して、ハイブリッドを形成するこ

とができる。より長いプローブ配列はいつそうゆっくり平衡化するようになるが、より低い温度においてさえいつそう安定な複合体を形成する。インキュベーションは一夜またはそれより長い時間進行させることができる。一般に、インキュベーションは計算したCot時間の3倍に等しい期間の間実施される。Cot時間は、ポリヌクレオチド配列が再アソシエーションするために要する時間であり、この分野において知られている方法により特定の配列について計算することができる。

#### 【0089】

ポリヌクレオチド配列の塩基対組成はハイブリッド複合体の熱安定性に影響を与え、これによりハイブリダイゼーション温度およびハイブリダイゼーション緩衝液のイオン強度に影響を及ぼすであろう。A-T対は塩化ナトリウムを含有する水溶液中でG-C対よりも安定性が低い。したがって、G-C含量が高くなるほど、ハイブリッドはより安定になる。配列内のGおよびC残基の均一な分布もまたハイブリッドの安定性に積極的に寄与する。さらに、塩基対組成を操作して所定の配列の $T_m$ を変更することができる。例えば、5-メチルデオキシシチジンをデオキシシチジンと置換し、5-ブロモデオキシウリジンをチミジンと置換して $T_m$ を増加することができ、これに対して7-デアズ-2'-デオキシグアノシンをグアノシンと置換して $T_m$ に対する依存性を減少することができる。

#### 【0090】

ハイブリダイゼーション緩衝液のイオン濃度は、また、ハイブリッドの安定性に影響を与える。ハイブリダイゼーション緩衝液は、一般に、ブロッキング剤、例えば、デンハルト溶液(Sigma Chemical Co.、ミズリー州セントルイス)、変性サケ精子DNA、tRNA、ミルク粉末(BLOTTO)、ヘパリンまたはSDS、および $Na^+$ 源、例えば、SSC(1×SSC:0.15Mの塩化ナトリウム、15mMのクエン酸ナトリウム)またはSSPE(1×SSPE:1.8MのNaCl、10mMの $NaH_2PO_4$ 、1mMのEDTA、pH7.7)を含有する。

#### 【0091】

緩衝液のイオン濃度を減少させることによって、ハイブリッドの安定性を増加させる。典型的には、ハイブリダイゼーション緩衝液は10mM~1Mの $Na^+$ を含有す

る。脱安定化剤または変性剤、例えば、ホルムアミド、テトラアルキルアンモニウム塩、グアニジニウムカチオンまたはチオシアネートカチオンをハイブリダイゼーション溶液に添加して、ハイブリッドの $T_m$ を変更させる。典型的には、ホルムアミドを50%までの濃度において使用して、より好都合な、より低い温度においてインキュベーションを実施することができる。また、RNAプローブを使用するとき、ホルムアミドは非特異的バックグラウンドを減少する作用をする。

#### 【0092】

例示として、42 において50%のホルムアミド、5×SSC (1×SSC : 0.15Mの塩化ナトリウムおよび15mMのクエン酸ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム (pH 7.6)、5×デンハルト溶液 (100×デンハルト溶液 : 2% (w/v) のフィコール400、2% (w/v) のポリビニルピロリドン、および2% (w/v) のウシ血清アルブミン)、10%のデキストラン硫酸、および20 µg/mlの変性、剪断サケ精子DNAを含んだる溶液中で、変異型zacrp5ポリペプチドをコードする核酸分子を、配列番号1のヌクレオチド配列 (またはその補体) を有する核酸分子と一夜ハイブリダイゼーションさせることができる。

#### 【0093】

当業者はこれらのハイブリダイゼーション条件の変更を案出することができる。例えば、より高いまたはより低い温度、例えば、約65 において、ホルムアミドを含有しない溶液中で、ハイブリダイゼーション混合物をインキュベートすることができる。そのうえ、プレミックスハイブリダイゼーション溶液は入手可能であり (例えば、EXPRESSHYBハイブリダイゼーション溶液、CLONTECH Laboratories, Inc.) そしてハイブリダイゼーションを製造業者の使用説明書に従い実施することができる。

#### 【0094】

ハイブリダイゼーション後、核酸分子をストリンジェント条件下に、または高度にストリンジェントな条件下に洗浄して非ハイブリダイゼーション核酸分子を除去する。典型的なストリンジェント洗浄条件は、0.5× ~ 2×SSCおよび0.1%のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) の溶液中の55 ~ 65 における洗浄を包含する。すなわち、変異型zacrp5ポリペプチドをコードする核酸分子は配列番号1のヌク

レオチド配列（またはその補体）を有する核酸分子とストリンジェント洗浄条件下にハイブリダイゼーションし、ここで洗浄ストリンジェントは55～65 における0.5×～2×SSCおよび0.1%のSDSに等しく、55 における0.5×SSCおよび0.1%のSDS、または65 における2×SSCおよび0.1%のSDSを包含する。当業者は、例えば、洗浄溶液中のSSCをSSPEと置換することによって、同等条件を容易に案出することができる。

#### 【0095】

典型的な高度にストリンジェントな洗浄条件は、50～65 における0.1×～0.2×SSCおよび0.1%のドデシル硫酸ナトリウム（SDS）の溶液中の洗浄を包含する。換言すると、変異型zacrp5ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは配列番号1のヌクレオチド配列（またはその補体）を有する核酸分子と高度にストリンジェントな洗浄条件下にハイブリダイゼーションし、ここで洗浄ストリンジェントは55～65 における0.1×～0.2×SSCおよび0.1%のSDSに等しく、50 における0.1×SSCおよび0.1%のSDS、または65 における0.2×SSCおよび0.1%のSDSを包含する。

#### 【0096】

本発明は、また、配列番号2の単離されたzacrp5ポリペプチドおよびそれらのオーソログに対して実質的に類似する、単離されたzacrp5ポリペプチドを提供する。用語「実質的に類似する配列の同一性」は、本明細書において、配列番号2に示す配列またはそれらのオーソログに対して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%のまたは95%より大きい配列の同一性を有するポリペプチドを表すために使用される。本発明は、また、配列番号2のアミノ酸残基70～252の配列に対して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%のまたは95%より大きい配列の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドを包含する。本発明は、さらに、このようなポリペプチドをコードする核酸分子を包含する。同一性百分率を決定する方法を後述する。

#### 【0097】

本発明は、また、下記の2つの基準を使用して同定できる、zacrp5の種々の核

酸分子を包含する：前述したような、配列番号2のアミノ酸配列をもつコードされたポリペプチドの間の類似性の決定、およびハイブリダイゼーションアッセイ。このようなzacrp5変異型は下記の核酸分子を包含する：

(1) スリンジェント洗浄条件下に配列番号1のヌクレオチド配列（またはその相補体）を有する核酸分子とハイブリダイゼーションする核酸分子、ここで洗浄ストリンジェンシイは55～65 における $0.5\times\sim 2\times$ SSC、0.1%のSDSに等しい、および

(2) 配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%のまたは95%より大きい配列の同一性を有するポリペプチドをコードする核酸分子。

【0098】

あるいは、zacrp5変異型は、

(1) 高度にストリンジェントの洗浄条件下に配列番号1のヌクレオチド配列（またはその補体）を有する核酸分子とハイブリダイゼーションする核酸分子、ここで洗浄ストリンジェンシイは50～65 における $0.1\times\sim 0.2\times$ SSC、0.1%のSDSに等しい、および

(2) 配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%のまたは95%より大きい配列の同一性を有するポリペプチドをコードする核酸分子、として特徴づけることができる。

【0099】

配列の同一性の百分率は慣用法により決定される。例えば、下記の文献を参照のこと：Altschul他、Bull. Math. Bio. 48：603、1986およびHenikoffおよびHenikoff、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89：10915、1992。簡単に述べると、表4（アミノ酸は標準的1文字コードにより示されている）に示すように10のギャップオープニングペナルティー、1のギャップエクステンションペナルティー、およびHenikoffおよびHenikoff（前掲）の「ブロサム（BLOSUM）62」スコアリングマトリックスを使用して、2つのアミノ酸配列を整列させて整列スコアを最適化する。次いで同一性百分率を次のように計算する：

【0100】

【数1】

〔同一の整合の総数〕

---

×100

〔長い方の配列の長さ+2つの配列の整列のため  
に長い方の配列に導入されるギャップの数〕

【0101】

【表4】

表4

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

【0102】

当業者は認識するように、2つのアミノ酸配列を整列するために有効な多数のアルゴリズムが存在する。PearsonおよびLipmanの「FASTA」類似性の検索アルゴリズムは、本明細書に開示するアミノ酸配列および推定上の変異型zacrp5のアミノ酸配列が共有する同一性のレベルを検査する、適当なタンパク質整列法である。FASTAアルゴリズムは下記の文献に記載されている：PearsonおよびLipman、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444、1988、およびPearson、Meth. Enzy

mol. 183 : 63, 1990.

#### 【0103】

簡単に述べると、まず、保存的アミノ酸の置換、挿入、または欠失を考慮しないで、問題の配列（例えば、配列番号2）、および同一性の最高密度（ktup変数が1である場合）または同一性の対（ktup=2である場合）を有する試験配列が共有する領域を同定することによって、FASTAは配列の類似性を特性決定する。次いで、アミノ酸置換マトリックスを使用してすべての対合アミノ酸の類似性を比較することによって、同一性の最高密度をもつ10領域を再スコアリングし、そして最高スコアに寄与する残基のみを含むように、領域の末端を「トリミング」する。

#### 【0104】

「カットオフ」値（配列の長さおよびktup値に基づいて前もって決定した式により計算される）より大きいスコアをもつ、いくつかの領域が存在する場合、トリミングした最初の領域を検査して、領域を結合してギャップをもつ近似整列を形成できるかどうかを決定する。最後に、アミノ酸配列の挿入または欠失を可能とする、Needleman - Wunsch - Sellersアルゴリズムの変法（NeedlemanおよびWunsch, J. Mol. Biol. 48 : 444, 1970 ; Sellers, SIAM J. Appl. Math. 26 : 787, 1974）を使用して、2つのアミノ酸配列の最高のスコアリング領域を整列させる。

#### 【0105】

FASTA分析のためのパラメーターの例は次の通りである：ktup=1, ギャップオープンペナルティー=10、ギャップエクステンションペナルティー=1、および置換マトリックス=BLOSUM62。Pearson, Meth. Enzymol. 183 : 63, 1990の付録2に説明されているように、スコアリングマトリックスファイル（「SMATRIX」）を変更することによって、これらのパラメーターをFASTAプログラムの中に導入することができる。

#### 【0106】

また、上に開示した比を使用して核酸分子の配列の同一性を決定するために、FASTAを使用することができる。ヌクレオチド配列を比較するために、ktup値は1

~6、好ましくは4~6の範囲であることができる。

#### 【0107】

本発明は、配列番号2のアミノ酸配列と比較して、1またはそれ以上の「保存的アミノ酸置換」を有するポリペプチドをコードする核酸分子を包含する。保存的アミノ酸置換はアミノ酸の化学的特性に基づくことができる。すなわち、配列番号2の1またはそれ以上のアミノ酸置換を含有する変異型を得ることができ、ここでアルキルアミノ酸はzacrp5アミノ酸配列中のアルキルアミノ酸と置換されており、芳香族アミノ酸はzacrp5アミノ酸配列中の芳香族アミノ酸と置換されており、硫黄含有アミノ酸はzacrp5アミノ酸配列中の硫黄含有アミノ酸と置換されており、ヒドロキシ含有アミノ酸はzacrp5アミノ酸配列中のヒドロキシ含有アミノ酸と置換されており、酸性アミノ酸はzacrp5アミノ酸配列中の酸性アミノ酸と置換されており、塩基性アミノ酸はzacrp5アミノ酸配列中の塩基性アミノ酸と置換されているか、あるいは二塩基性モノカルボン酸アミノ酸はzacrp5アミノ酸配列中の二塩基性モノカルボン酸アミノ酸と置換されている。

#### 【0108】

例えば、普通のアミノ酸の間で、「保存的アミノ酸置換」は、下記の基の各々内のアミノ酸間の置換により例示される：(1)グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシン、(2)フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン、(3)セリンおよびトレオニン、(4)アスパラギン酸塩およびグルタミン酸塩、(5)グルタミンおよびアスパラギン、および(6)リシン、アルギニンおよびヒスチジン。

#### 【0109】

BLOSUM62表は、関係するタンパク質の500より多いグループの高度に保存された領域を表す、タンパク質配列のセグメントの約2,000の局所的な多重整列から誘導されたアミノ酸置換マトリックスである(HenikoffおよびHenikoff、Proc. Natl'l. Acad. Sci. USA、89:10915、1992)。したがって、本発明のアミノ酸配列の中に導入することができる保存的アミノ酸置換を定めるために、BLOSUM62置換頻度を使用することができる。

#### 【0110】

化学的特性にのみ基づくアミノ酸置換を設計することができる（前述したように）が、「保存的アミノ酸置換」という言葉は好ましくは-1より大きいBLOSUM62値により表される置換を意味する。例えば、置換が0、1、2、または3により特徴づけられる場合、アミノ酸置換は保存的である。このシステムに従うと、好ましい保存的アミノ酸置換は少なくとも1（例えば、1、2または3）のBLOSUM62値により特徴づけられるが、より好ましい保存的アミノ酸置換は少なくとも2（例えば、2または3）のBLOSUM62値により特徴づけられる。

#### 【0111】

配列番号1に記載するヌクレオチドをヌクレオチドで置換することによって、zacr<sub>p</sub>5遺伝子における保存的アミノ酸変化を導入することができる。このような「保存的アミノ酸」の変異型は、例えば、オリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発、リンカー-走査突然変異誘発、ポリメラーゼ連鎖反応を使用する突然変異誘発、およびその他により得ることができる（下記の文献を参照のこと：Ausubel（1995）pp. 8-10~8-22；およびMcPherson（編者）、Directed Mutagenesis: A Practical Approach（IRL Press 1991））。細胞および細胞外相互作用のモジュレートするこのような変異型の能力ならびに野生型タンパク質の他の性質は、標準的方法、例えば、本明細書に記載するアッセイを使用して決定することができる。あるいは、抗zacr<sub>p</sub>5抗体に特異的に結合する能力により、変異型zacr<sub>p</sub>5ポリペプチドを同定することができる。

#### 【0112】

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むことができる。天然に存在しないアミノ酸は、限定されずに、下記のを包含する：トランス-3-メチルプロリン、2,4-メタノプロリン、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-および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、および4-フルオロフェニルアラニン

。

## 【0113】

天然に存在しないアミノ酸残基をタンパク質の中に組込む、いくつかの方法はこの分野において知られている。例えば、化学的にアミノアシル化されたサプレッサー tRNA を使用してナンセンス突然変異を抑制する、*in vitro*系を使用することができる。アミノ酸を合成し、tRNA をアミノアシル化する方法はこの分野において知られている。典型的には、大腸菌 (*E. coli*) S30 抽出物および商業的に入手可能な酵素および他の試薬を含んでなる、無細胞系において、ナンセンス突然変異を含有するプラスミドの転写および翻訳は実施される。タンパク質をクロマトグラフィーにより精製する。例えば、下記の文献を参照のこと：Robertson 他、*J. Am. Chem. Soc.* 113 : 2722、1991；Ellman 他、*Methods Enzymol.* 202 : 301、1991；Chung 他、*Science* 259 : 806 - 809、1993；および Chung 他、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 : 10145 - 9、1993。

## 【0114】

第2の方法において、突然変異された mRNA および化学的にアミノアシル化されたサプレッサー tRNA のマイクロインジェクションにより、キセノプス・オオサイト (*Xenopus oocytes*) 中で翻訳を実施する (Turcatti 他、*J. Biol. Chem.* 271 : 19991、1996)。第3の方法において、置換すべき天然のアミノ酸 (例えば、フェニルアラニン) の非存在においてかつ所望の天然に存在しない1またはそれ以上のアミノ酸 (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または4 - フルオロフェニルアラニン) の存在下に、大腸菌 (*E. coli*) 細胞を培養する。

## 【0115】

天然に存在しないアミノ酸をその天然の対応物の代わりにタンパク質の中に組込む。Koide 他、*Biochem.* 33 : 7470、1994、参照。*in vitro* 化学的修飾により、天然に存在するアミノ酸残基を天然に存在しない種に変換することができる。化学的修飾を部位特異的突然変異誘発と組合わせて、置換の範囲をさらに拡張することができる (Wynn および Richards、*Protein Sci.* 2 : 395、1993)。

制限された数の非保存的アミノ酸、遺伝暗号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、および非天然のアミノ酸をzacrp5アミノ酸残基と置換することができる。

#### 【0116】

既知の突然変異誘発およびスクリーニングの方法、例えば、下記の文献に記載されている方法を使用して、多重アミノ酸置換を行い、試験することができる：Reidhaar - OlsonおよびSauer、Science 241：53、1988またはBowieおよびSauer、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86：2152、1989。簡単に述べると、これらの著者らはポリペプチド中の2またはそれ以上の位置を同時にランダム化し、機能的ポリペプチドについて選択し、次いで突然変異化ポリペプチドを配列決定して、各位置における許容可能な置換のスペクトルを決定する方法を開示している。使用できる他の方法は下記の方法を包含する：ファージディスプレイ（例えば、Lowman他、Biochem. 30：10832、1991；Ladner他、米国特許第5,223,409号；Huse、国際公開WO 92/06204）および領域特異的突然変異誘発（Derbyshire他、Gene 46：145、1986；Ner他、DNA 7：127、1988）。

#### 【0117】

また、開示したzacrp5ヌクレオチドおよびポリペプチド配列の変異型を、下記の文献に開示されているように、DNAシャフリングにより発生させることができる：Stemmer、Nature 370：389、1994、Stemmer、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91：10747、1994および国際開WO 90/20078。簡単に述べると、親DNAをランダムフラグメント化し、次いでPCRによりリアセンブリーして、ランダムに導入された点突然変異を生じさせることによって、in vitro相同的組換えにより変異型DNA分子を発生させる。

#### 【0118】

親DNA分子のファミリー、例えば、アレレ変異型または異なる種からのDNA分子を使用して、追加の可変性をプロセスの中に導入することによって、この技術を修飾することができる。所望の活性について選択またはスクリーニングし、次いで突然変異誘発およびアッセイをさらに反復して、所望の突然変異を選択すると同時に有害な変化に対して選択することによって、配列を急速に「進化」させる。

。

## 【0119】

本明細書に開示する突然変異誘発法を大きい処理量の自動化スクリーニング法と組合わせて、宿主細胞においてクローニングされ、突然変異化されたポリペプチドの活性を検出することができる。生物学的に活性なポリペプチド、または抗zacrp5抗体に結合するポリペプチドをコードする突然変異化DNA分子を宿主細胞から回収し、現代的装置を使用して急速に配列決定することができる。これらの方法は、問題の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とし、未知構造のポリペプチドに適用することができる。

## 【0120】

本発明のポリペプチドにおける必須アミノ酸は、この分野において知られている手順、例えば、部位特異的突然変異誘発またはアラニン走査突然変異誘発に従い同定することができる (CunninghamおよびWells、*Science* 244:1081、1989; Bass他、*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88:4498、1991; CoombsおよびCorey、*Site-Directed Mutagenesis and Protein Engineering*、*Proteins: Analysis and Design*、Angeletti (編者)、pp. 259-311 (Academic Press, Inc. 1998)。

## 【0121】

後者の技術において、単一のアラニンの突然変異を分子中のすべての残基において導入し、そして、後述するように、生ずる突然変異体分子を生物学的活性について試験して、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。また、Hilton他、*J. Biol. Chem.* 271:4699、1996参照。必須アミノ酸の同定は、また、関係するポリペプチドとの相同性から推定することができる。

## 【0122】

zacrp5レセプター結合性ドメインの位置は、核磁気共鳴、結晶学、電子回折またはフォトアフィニティー標識化のような技術により、推定上の接触部位のアミノ酸の突然変異と組み合わせて、決定して、構造の物理的解析により同定することができる。例えば、下記の文献を参照のこと: de Vos他、*Science* 255:306、1992、Smith他、*J. Mol. Biol.* 224:899、1992、およびWlodaver他、*FEBS Lett.* 309:59、1992。そのうえ、ビオチンまたはFITCで標識化されたzacrp5

はzacrp5レセプターの発現クローニングのための使用することができる。

#### 【0123】

本発明は、また、本明細書に記載するzacrp5ポリペプチドのエピトープを支持する部分を含んでなるポリペプチドフラグメントまたはペプチドを提供する。このようなフラグメントまたはペプチドは「免疫原性エピトープ」を含むことができる。免疫原性エピトープは、全体のタンパク質を免疫原として使用するとき、抗体の応答を誘発するタンパク質の部分である。免疫原性エピトープを支持するペプチドは標準的方法により同定することができる（例えば、Geysen他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998、1983、参照）。

#### 【0124】

対照的に、ポリペプチドのフラグメントまたはペプチドは、抗体が特異的に結合するタンパク質分子の領域である、「抗原エピトープ」を含むことができる。ある種のエピトープはアミノ酸の線状または隣接ストレッチから成り、そしてこのようなエピトープの抗原性は変性因子により崩壊されない。タンパク質のエピトープを模擬できる、比較的短い合成ペプチドを使用して、タンパク質に対する抗体の産生を刺激することができることはこの分野において知られている（例えば、Sutcliffe他、Science 219:660、1983参照）。したがって、本発明の抗原性エピトープを支持するペプチドおよびポリペプチドは、本明細書に記載するポリペプチドに結合する抗体を発生させるために有用である。

#### 【0125】

エピトープを支持するペプチドおよびポリペプチドは、配列番号2の少なくとも4~10アミノ酸、少なくとも10~15アミノ酸、または約15~約30アミノ酸を含有することが好ましい。このようなエピトープを支持するペプチドおよびポリペプチドは、本明細書に記載するように、zacrp5ポリペプチドをフラグメント化するか、あるいは化学的ペプチド合成により製造することができる。そのうえ、エピトープはランダムペプチドライブラリーのファージディスプレイにより選択できる（例えば、下記の文献を参照のこと：LaneおよびStephen、Curr. Opin. Immunol. 5:268、1993、およびCortese他、Curr. Opin. Biotechnol. 7:616、1996）。

## 【0126】

エピトープを同定し、そしてエピトープを含んでなる小さいペプチドから抗体を産生する標準的方法は、例えば、下記の文献に記載されている：Mole、"Epitope Mapping"、Methods in Molecular Biology、Vol. 10、Manson(編)、pp. 105 - 16 (The Humana Press, Inc. 1992)、Price、"Production and Characterization of Synthetic Peptide - Derived Antibodies"、Monoclonal Antibodies : Production, Engineering, and Clinical Application、RitterおよびLadyman(編者)、pp. 60 - 84 (Cambridge University Press 1995)、およびColigan他(編者)、Current Protocols in Immunology、pp. 9. 3. 1 - 9. 3. 5およびpp. 9. 4. 1 - 9. 4. 11 (John Wiley & Sons 1997)。

## 【0127】

変異型zacrp5遺伝子の特定のヌクレオチド配列を無視して、この遺伝子は細胞または細胞外の相互作用、または野生型タンパク質の他の活性をモジュレートするその能力により特徴づけられるポリペプチドをコードする。さらに詳しくは、変異型zacrp5遺伝子は、本明細書に記載するヒトzacrp5遺伝子によりコードされるポリペプチドの活性の少なくとも50%の、好ましくは70、80、または90%より大きい活性を示すポリペプチドをコードする。

## 【0128】

変異型および融合タンパク質を包含する、任意のzacrp5ポリペプチドについて、当業者は上記表2および3に記載される情報を使用して、その変異型をコードする、完全に縮重のポリヌクレオチド配列を容易に発生させることができる。そのうえ、当業者は標準的ソフトウェアを使用して、本明細書に記載するヌクレオチドおよびアミノ酸配列をベースとするzacrp5変異型を案出することができる。したがって、本発明は、下記の配列の少なくとも1つを提供するデータ構造でコードされたコンピューターで読取り可能な媒体を包含する：配列番号1、配列番号2または配列番号11。

## 【0129】

コンピューターで読取り可能な媒体の適当な形態は、磁気媒体および光学的に

読取り可能な媒体を包含する。磁気媒体の例は、ハードまたは固定ドライブ、ランダムアクセスメモリー（RAM）チップ、フロッピーディスク、デジタル線状テープ（DLT）、ディスクカシエ、およびZIPディスクを包含する。光学的に読取り可能な媒体は、コンパクトディスク（例えば、CD - 読出し専用メモリー（ROM）、CD - 再書込み可能な（RW）、およびCD - 再記録可能な）、およびデジタル多角的／ビデオディスク（DVD）（例えば、DVD - ROM、DVD - RAM、およびDVD + RW）により例示される。

#### 【0130】

さらに、本発明は、種々のポリペプチド融合物および1またはそれ以上のポリペプチド融合物を含んでなる関係するマルチマータンパク質を提供する。例えば、zacrp5ポリペプチドは、米国特許第5,155,027号および米国特許第5,567,584号に開示されているように、二量化タンパク質に対する融合物として調製することができる。これに関して好ましい二量化タンパク質は、免疫グロブリン構築物の定常領域を包含する。免疫グロブリン - zacrp5ポリペプチドの融合物を遺伝子操作された細胞において発現させて、種々のマルチマーのzacrp5アナログを産生することができる。補助的ドメインをzacrp5ポリペプチドに融合させて、それらを特異的細胞、組織、または高分子（例えば、コラーゲン）に対してターゲッティングすることができる。

#### 【0131】

例えば、ターゲット細胞の使用上のレセプターに特異的に結合するリガンドに対してzacrp5ポリペプチドを融合することによって、zacrp5ポリペプチドまたはタンパク質を前もって決定した細胞型ニターゲッティングすることができる。このようにして、ポリペプチドおよびタンパク質を治療または診断の目的でターゲッティングすることができる。zacrp5ポリペプチドを1またはそれ以上の成分、例えば、精製のための親和標識およびターゲッティングドメインに対して融合することができる。ポリペプチドの融合物は、また、特にドメイン間に、1またはそれ以上の切断部位を含むことができる。Tuan他、Connective Tissue Research 34 : 1 - 9、1996参照。

#### 【0132】

本発明の融合タンパク質は下記の成分からなる：

(1) (a) 配列番号2に示され、アミノ酸残基1 (Met)、18 (Trp) または70 (Gly) ~ アミノ酸残基252 (Leu) のアミノ酸残基の配列を含んでなるポリペプチド分子；

(b) 配列番号2のアミノ酸70 (Gly) ~ アミノ酸111 (Pro) の範囲のポリペプチド分子、コラーゲン様ドメインを含有するzacrp5ポリペプチドの部分、または二量体化またはオリゴマー化することができるコラーゲン様ドメインの部分；

(c) 配列番号2のアミノ酸112 (Cys) ~ アミノ酸252 (Leu) の範囲のポリペプチド分子、C1qドメインを含有するzacrp5ポリペプチドの部分またはC1qドメインの活性部分；または

(d) アミノ酸70 (Gly) ~ 252 (Leu) の範囲のポリペプチド分子、コラーゲン様ドメインおよびC1qドメインを含むzacrp5ポリペプチドの部分から成る群より選択されるポリペプチド；および

(2) 他のポリペプチド。

#### 【0133】

他のポリペプチドはオールタネイティブまたは追加のC1qドメイン、オールタネイティブまたは追加のコラーゲン様ドメイン、融合タンパク質の分泌を促進するシグナルペプチドまたはその他であることができる。このようなドメインは他の脂肪細胞補体関係タンパク質ファミリーのメンバー、本明細書において開示するようなコラーゲンおよび/またはC1qドメインを有する他のタンパク質から得ることができる。補体の球状ドメインはIgGに結合し、こうして、zacrp5ポリペプチド、フラグメントまたは融合物の球状ドメインは同様な役割を有することができる。

#### 【0134】

アミノ酸1 (Met) ~ アミノ酸252 (Leu) の範囲のzacrp5ポリペプチド；アミノ酸18 (Trp) ~ アミノ酸252 (Leu) の範囲の成熟zacrp5ポリペプチド；またはアミノ酸1 (Met) ~ アミノ酸17 (Ala) の範囲の、それらの分泌リーダーフラグメントを、細胞のタンパク質の分泌の研究において使用することができる。本発明のこの面の好ましい態様において、成熟ポリペプチドを推定上の分泌シグナル配

列として形成する；融合タンパク質の発現を指令することができる調節領域を支持するプラスミドを被験細胞の中に導入する；そして成熟タンパク質の分泌をモニターする。モニターはこの分野において知られている技術、例えば、HPLCおよびその他により実施することができる。

#### 【0135】

全長のタンパク質、それらのフラグメントおよび融合ポリペプチドを包含する、本発明のポリペプチドを、慣用技術に従い、遺伝子操作された宿主細胞において製造することができる。適当な宿主細胞は、外因的DNAで形質転換またはトランスフェクトし、培養において増殖させることができる細胞の型であり、そして細菌、真菌細胞、および培養された高等真核細胞を包含する。真核細胞、特に多細胞微生物の培養された細胞は好ましい。クローニングされたDNA分子を操作し、外因的DNAを種々の宿主細胞の中に導入する技術は下記の文献に記載されている：Sambrook他、前掲、およびAusubel他、前掲。

#### 【0136】

一般に、zacrp5ポリペプチドをコードするDNA配列は、発現ベクター内に一般に転写プロモーターおよびターミネーターを含む、その発現に必要な他の遺伝因子に作用可能に連鎖される。このベクターは、また、1またはそれ以上の選択可能なマーカーおよび1またはそれ以上の複製起点を普通に含有するが、当業者は認識するように、ある種の系内で選択可能なマーカーを別々のベクター上に提供し、そして宿主細胞のゲノムの中への組込みにより外因的DNAの複製を得ることができる。プロモーター、ターミネーター、選択可能なマーカー、ベクターおよび他の因子の選択は、当業者のレベル内の日常的設計事項である。多数のこのような因子は文献に記載されており、そして商業的供給会社から入手可能である。

#### 【0137】

zacrp5ポリペプチドを宿主細胞の分泌経路の中に向けるために、分泌シグナル配列（また、リーダー配列、シグナル配列、プレプロ配列または前配列として知られている）を発現ベクターの中に準備する。分泌シグナル配列はzacrp5ポリペプチドのそれであることができるか、あるいは他の分泌されたタンパク質（例えば、t-PA）から誘導するか、あるいは新規に合成することができる。

## 【0138】

分泌シグナル配列をzacrp5ポリペプチドDNA配列に正しいリーディングフレームで結合させる。分泌シグナル配列は普通に問題のポリペプチドをコードするDNA配列に対して5'に配置されるが、ある種の分泌シグナル配列は問題のDNA配列の中のどこかに位置決定することができる（例えば、Welch他、米国特許第5,037,743号；Holland他、米国特許第5,143,830号、参照）。逆に、類似する方法により、zacrp5ポリペプチドのシグナル配列の一部（配列番号2のアミノ酸残基1～17）を使用してオールタネイティブタンパク質の分泌を指令することができる。

## 【0139】

本発明のポリペプチドの中に含有される分泌シグナル配列を使用して、他のポリペプチドを分泌経路の中に向けることができる。本発明はこのような融合ポリペプチドを提供する。配列番号2のアミノ酸残基1～17から誘導された分泌シグナル配列が他のポリペプチドに作用可能に連鎖されたシグナル融合ポリペプチドを、この分野において知られておりかつ本明細書に開示されている方法により、作ることができる。

## 【0140】

好ましくは、本発明の融合ポリペプチドの中に含有される分泌シグナル配列を追加のペプチドに対してアミノ末端的に融合させて、追加のペプチドを分泌経路の中に向ける。このような構築物はこの分野において知られている多数の用途を有する。例えば、これらの新規な分泌シグナル配列の融合構築物は、例えば、常態で分泌されないタンパク質の活性成分、例えば、レセプターの分泌を指令することができる。このような融合物をin vivoまたはin vitroにおいて使用して、ペプチドを分泌経路を通して向けることができる。

## 【0141】

培養された哺乳動物細胞は本発明において適当な宿主である。外因的DNAを哺乳動物の宿主細胞の中に導入する方法は下記の方法を包含する：リン酸カルシウム仲介トランスフェクション（Wigler他、Cell 14：725、1978；CorsaroおよびPearson、Somatic Cell Genetics 7：603、1981；GrahamおよびVan der Eb、Virology 52：456、1973）、エレクトロポレーション（Neumann他、EMBO J.

1 : 841 - 5、1982)、DEAE - デキストリン仲介トランスフェクション (Ausubel 他、前掲)、およびリポソーム仲介トランスフェクション (Hawley - Nelson他、Focus 15 : 73、1993 ; Ciccarone他、Focus 15 : 80、1993)、およびウイルスベクター (MillerおよびRosman、BioTechniques 7 : 980 - 90、1989 ; WangおよびFiner、Nature Med. 2 : 714 - 6、1996)。

#### 【0142】

培養された哺乳動物細胞における組換えポリペプチドの産生は、例えば、下記の特許文献に記載されている : Levinson他、米国特許第4,713,339号 ; Hagen他、米国特許第4,784,950号 ; Palmiter他、米国特許第4,579,821号 ; およびRingold、米国特許第4,656,134号。適当な培養された哺乳動物細胞は下記のを包含する : COS - 1 (ATCC No. CRL 1650)、COS - 7 (ATCC No. CRL 1651)、BHK (ATCC No. CRL 1632)、BHK570 (ATCC No. CRL 10314)、293 (ATCC No. CRL 1573 ; Graham他、J. Gen. Virol. 36 : 59 - 72、1977) ; およびチャイニーズハムスター卵巣 (例えば、CHO - K1 ; ATCC No. CRL 61) 細胞系統。

#### 【0143】

追加の適当な細胞系統はこの分野において知られており、そして公衆の寄託機関、例えば、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection) バージニア州マンナッサス、から入手可能である。一般に、強い転写プロモーター、例えば、SV - 40またはサイトメガロウイルスからのプロモーターは好ましい。例えば、米国特許第4,956,288号参照。他の適当なプロモーターは、メタロチオネイン遺伝子からのプロモーター (米国特許第4,579,821号および米国特許第4,601,978号) およびアデノウイルスの主要な後期プロモーターを包含する。

#### 【0144】

薬剤選択を一般に使用して、外来DNAが挿入された、培養された哺乳動物細胞について選択する。このような細胞は普通に「トランスフェクタント」と呼ばれる。例えば、選択因子の存在において培養され、問題の遺伝子をそれらの子孫に移行させることができる細胞は、「安定なトランスフェクタント」と呼ばれる。

好ましい選択可能なマーカーは、抗生物質の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剤、例えば、G-418またはその他の存在において実施される。また、選択系を使用して、問題の遺伝子の発現レベルを増加することができる、「増幅」と呼ぶ方法。

#### 【0145】

低いレベルの選択因子の存在においてトランスフェクタントを培養し、次いで選択因子の量を増加して、導入された遺伝子の産物を高いレベルで産生する細胞について選択することによって、増幅は実施される。好ましい増幅可能な選択可能なマーカーは、メトトレキセートに対する耐性を付与する、ジヒドロフォレートリダクターゼである。他の薬剤耐性遺伝子（例えば、ヒグロマイシン耐性、多薬剤耐性、プロマイシンアセチルトランスフェラーゼ）を使用することもできる。

#### 【0146】

変更された表現型を導入するオールタネイティブマーカー、例えば、緑色蛍光タンパク質、または細胞表面のタンパク質、例えば、CD4、CD8、クラスIのMHC、胎盤アルカリ性ホスファターゼを使用して、FACSソーティングまたは磁気ビーズ分離技術により、トランスフェクトされない細胞からトランスフェクトされた細胞をソーティングすることができる。植物細胞、昆虫細胞およびトリの細胞を包含する、他の高等真核細胞を宿主細胞として使用することもできる。

#### 【0147】

植物細胞中で遺伝子を発現するためのベクターとしてアグロバクテリウム・リゾゲネス (*Agrobacterium rhizogenes*) を使用することは、Sinkar他、*J. Biosci. (Bangalore)* 11: 47 - 58、1987、において概観されている。昆虫細胞の形質転換およびその中の外来ポリペプチドの産生は、Guarino他、米国特許第5,162,222号およびWIPO公開WO 94/06463に開示されている。オートグラファト・カリフォルニカ (*Autographa californica*) 核多角体病ウイルス (AcNPV) から普通に誘導される、組換えバキュロウイルスで、昆虫細胞を感染させることができる。

#### 【0148】

下記の文献を参照のこと：KingおよびPossee、The Baculovirus Expression System : A Laboratory Guide、London、Chapman & Hall、O'Reilly他、Baculovirus Expression Vectors : A Laboratory Manual、New York、Oxford University Press、1994 ; およびRichardson、C. D. 編者、Baculovirus Expression Protocols、Methods in Molecular Biology、Totowa、NJ、Humana Press、1995。

#### 【0149】

組換えzacrp5バキュロウイルスを作る第2の方法は、Luckowが記載するトランスポゾンベースとする系を利用する(Luckow他、J. Virol. 67 : 4566 - 79、1993)。この系はBac - to - Bac™キット(Life Technologies、マリランド州ロックビレ)で販売されている。この系は転移ベクター、pFastBac1™(Life Technologies)を利用し、ここでpFastBac1™は「バクミド(bacmid)」と呼ばれる大きいプラスミドとして大腸菌(E. coli)の中に維持されたバキュロウイルスのゲノムの中にzacrp5ポリペプチドをコードするDNAを動かすために、Tn7トランスポゾンを含む。

#### 【0150】

pFastBac1™転移ベクターは、問題の遺伝子、この場合においてzacrp5の発現を推進するためにAcNPVポリヘドリンプロモーターを利用する。しかしながら、pFastBac1™をかなりの程度に修飾することができる。ポリヘドリンプロモーターを除去し、バキュロウイルスの基本的タンパク質プロモーター(また、Pcor、p6.9またはMPプロモーターとして知られている)で置換することができ、このプロモーターはバキュロウイルス感染において初期に発現され、分泌されたタンパク質を発現させるために好都合であることが示された。

#### 【0151】

下記の文献を参照のこと：Hill - PerkinsおよびPossee、J. Gen. Virol. 71 : 971 - 6、1990 ; Bonning他、J. Gen. Virol. 75 : 1551 - 6、1994 ; およびChazenbalkおよびRapoport、J. Biol. Chem. 270 : 1543 - 9、1995。このような転移ベクター構築物において、基本的タンパク質プロモーターの短いおよび長いバージョンを使用することができる。そのうえ、自然zacrp5分泌シグナル配

列を昆虫タンパク質に由来する分泌シグナル配列で置換された、転移ベクターを構築することができる。

#### 【0152】

例えば、エクチステロイドグルコシルトランスフェラーゼ (EGT)、ミツバチメリチン (Invitrogen、カリフォルニア州カールスバッド)、またはバキュロウイルスgp67 (PharMingen、カリフォルニア州サンディエゴ) からの分泌シグナル配列を構築物において使用して、自然zacrp5分泌シグナル配列を置換することができる。さらに、転移ベクターは、発現されたzacrp5ポリペプチドのC末端またはN末端におけるエピトープ標識、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物を含むことができる (Grussenmeyer、他、Proc. Natl. Acad. Sci. 82 : 7952 - 4、1985)。

#### 【0153】

この分野において知られている技術を使用して、zacrp5を含有する転移ベクターを大腸菌 (E. coli) の中に形質転換し、そして組換えバキュロウイルスを示す中断されたlacZ遺伝子を含有するバクミドについてスクリーニングする。組換えバキュロウイルスのゲノムを含有するバクミドDNAを普通の技術に従い単離し、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。zacrp5を発現する組換えベクターを引き続いて生成させる。この分野において普通に使用されている方法により、組換えウイルスの系統を作る。

#### 【0154】

宿主細胞、典型的にはヨトウガ、スポドプテラ・フルギペルダ (Spodoptera frugiperda) に由来する細胞系統を感染させるために、組換えウイルスを使用する。一般に、下記の文献を参照のこと : GlickおよびPasternak、Molecular Biotechnology : Principle and Applications of Recombinant DNA、ASM Press、Washington、D. C.、1994。他の適当な細胞系統は、トリコデルマ・ニ (Trichoderma ni) に由来するHigh Five<sup>TM</sup>細胞系統 (Invitrogen) である (米国特許第5,300,435号)。商業的に入手可能な無血清培地を使用して、細胞を増殖させかつ維持する。

## 【0155】

適当な培地はSf9細胞についてSf900 II™ (Life Technologies) またはESF 921™ (Expression System) ; およびトリコデルマ・ニ (T.ni) 細胞についてEx - cell10450™ (JRH Bioscience、カンサス州レネクサ) またはExpress Five0™ (Life Technologies) である。細胞をほぼ $2 \sim 5 \times 10^5$ 細胞の接種密度から $1 \sim 2 \times 10^6$ 細胞の密度に増殖させ、この時組換えウイルスの系統を0.1~10、より典型的には3付近の感染の多重度で添加する。使用する手順は一般に入手可能な実験室のマニュアルに記載されている (KingおよびPossee、前掲 ; O'Reilly他、前掲 ; Richardson、前掲)。本明細書に記載する方法に従い、上清からのzacrp5ポリペプチドの引き続く精製を実施することができる。

## 【0156】

酵母細胞を包含する真菌細胞を本発明において使用することもできる。これに関して特に興味ある酵母種は、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)、およびピキア・メタノリカ (*Pichia metanolica*) を包含する。外因的DNAでサッカロミセス・セレビスエ (*S. cerevisiae*) を形質転換し、それから組換えポリペプチドを生産する方法は、例えば、下記の特許文献に記載されている : Kawasaki、米国特許第4,599,311号 ; Kawasaki他、米国特許第4,931,373号 ; Brake、米国特許第4,870,008号 ; Welch他、米国特許第5,037,743号 ; およびMurry他、米国特許第4,845,075号。

## 【0157】

選択可能なマーカーにより決定された表現型、普通の薬剤耐性または特定の栄養 (例えば、ロイシン) の非存在において増殖する能力により、形質転換された細胞を選択する。サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) において使用するために好ましいベクター系は、Kawasaki他 (米国特許第4,931,373号) により開示されているPOT1ベクター系であり、これによりグルコースを含有する培地中の増殖により形質転換細胞を選択することができる。

## 【0158】

酵母において使用するために適当なプロモーターおよびターミネーターは、解

糖酵素遺伝子（例えば、Kawasaki、米国特許第4,599,311号；Ingsman他、米国特許第4,615,974号；およびBitter、米国特許第4,977,092号、参照）およびアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子からのものを包含する。また、米国特許第4,990,446号；米国特許第5,063,154号；米国特許第5,139,936号および米国特許第4,661,454号、参照。

#### 【0159】

ハンゼヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、クルイベロマイセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*)、クルイベロマイセス・フラギリス (*Kluyveromyces fragilis*)、ウスチラゴ・マイディス (*Ustilago maydis*)、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)、ピキア・メタノリカ (*Pichia metanolica*)、ピキア・ゲイレルモンディイ (*Pichia guilliermondii*) およびカンジダ・マルトサ (*Candida maltosa*) を包含する、他の酵母のための形質転換系はこの分野において知られている。

#### 【0160】

例えば、Gleeson他、J. Gen. Microbiol. 132:3459-65、1986およびCregg、米国特許第4,882,279号、参照。McKnight他、米国特許第4,935,349号の方法に従い、アスペルギルス (*Aspergillus*) 細胞を利用することができる。アクレモニウム・クリソゲナム (*Acremonium chrysogenum*) は、Sumino他、米国特許第5,162,228号に開示されている。ニューロスポラ (*Neurospora*) を形質転換する方法は、Lambowitz、米国特許第4,486,533号に開示されている。

#### 【0161】

組換えタンパク質の生産のための宿主としてピキア・メタノリカ (*Pichia metanolica*) を使用することは、WIPO公開WO 97/17450、WO 97/17451、WO 98/02536、およびWO 98/02565に開示されている。ピキア・メタノリカ (*P. metanolica*) の形質転換において使用するDNA分子は二本鎖、円形のプラスミドとして普通に製造され、これらは好ましくは形質転換の前に線状化される。ピキア・メタノリカ (*P. metanolica*) におけるタンパク質の産生のために、プラスミド中のプロモーターおよびターミネーターはピキア・メタノリカ (*P. metanoli*

ca) の遺伝子、例えば、ピキア・メタノリカ (*P. metanolica*) のアルコール利用遺伝子 (AUG1またはAUG2) のそれであることが好ましい。

#### 【0162】

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)、ホルメートデヒドロゲナーゼ (FMD)、およびカタラーゼ (CAT) 遺伝子のプロモーターを包含する。宿主染色体の中へのDNAの組込みを促進するために、宿主DNA配列により双方の末端においてフランクされたプラスミドの全体の発現セグメントを有することが好ましい。ピキア・メタノリカ (*Pichia metanolica*) において使用するために好ましい選択可能なマーカーはピキア・メタノリカ (*P. metanolica*) のADE2遺伝子であり、これはホスホリボシル-5-アミノイミダゾールカルボキシラーゼ (AIRC; EC4.1.1.21) をコードし、これはアデニンの非存在においてade2宿主細胞を増殖させる。

#### 【0163】

メタノールの使用を最小としようとする、大規模の工業的方法のために、双方のメタノール利用遺伝子 (AUG1および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産のために、液胞プロテアーゼ遺伝子 (PEP4およびPRB1) を欠如する宿主細胞は好ましい。問題のポリペプチドをコードするDNAを含有するプラスミドをピキア・メタノリカ (*P. metanolica*) 細胞の中に導入することを促進するために、エレクトロポレーションを使用する。2.5~4.5kV/cm、好ましくは約3.75kV/cmの電界強度を有する、指数的に減衰する、パルス電界、および1~40ミリセカント、最も好ましくは約20ミリセカントの時間定数 ( ) を使用する、エレクトロポレーションにより、ピキア・メタノリカ (*P. metanolica*) 細胞を形質転換することが好ましい。

#### 【0164】

細菌大腸菌 (*Escherichia coli*)、バシラス (*Bacillus*) および他の属の株を包含する、原核宿主細胞は、また、本発明において有用である。これらの宿主を発現させ、その中でクローニングされた外来DNA配列を発現する技術はこの分野においてよく知られている (例えば、Sambrook他、前掲参照)。大腸菌 (*E. coli*) のような細菌においてzacrp5ポリペプチドを発現させるとき、ポリペプチ

ドを、典型的には不溶性粒子として、細胞質の中に保持させることができるか、あるいは細菌の分泌配列によりペリプラスミック空間の中に向けることができる。

#### 【0165】

前者の場合において、細胞を溶解し、粒子を回収し、例えば、グアニジンイソチオシアネートまたは尿素を使用して、変性する。次いで変性されたポリペプチドをリフォールディングさせ、変性物の希釈により、例えば、尿素の溶液および還元されたグルタチオンおよび酸化されたグルタチオンとの組み合わせに対する透析、および引き続き緩衝化生理食塩水に対する透析により、二量体化させることができる。後者の場合において、細胞を崩壊させて（例えば、超音波処理または浸透圧ショックにより）ペリプラスミック空間の内容物を解放し、これにより変性およびリフォールディングの必要性を排除することによって、ポリペプチドをペリプラスミック空間から可溶性の、機能的形態で回収することができる。

#### 【0166】

形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞を、慣用手順に従い、栄養素および選択した宿主細胞の成長に必要な他の成分を含有する培地中で培養する。規定された培地および複合培地を包含する、種々の適当な培地は、この分野において知られており、そして一般に炭素源、窒素源、必須アミノ酸、ビタミンおよび無機質を含む。培地は、また、必要に応じて、成長因子または血清のような成分を含有することができる。一般に、外因的に添加されたDNAを含有する細胞について成長培地を選択する。この選択は、例えば、薬剤選択または必須栄養素の欠如により実施され、必須栄養素は発現ベクター上に担持されるか、あるいは宿主細胞の中に共トランスフェクトされた選択可能なマーカーにより補足される。

#### 【0167】

分画および/または慣用の精製方法および培地を使用して、発現された組換えzacrp5ポリペプチド（またはzacrp5のフラグメントまたは融合ポリペプチド）を精製することができる。試料の分画のために、硫酸アンモニウム沈降および酸またはカオトロープ抽出を使用することができる。典型的な精製工程は、ヒドロキシアパタイト、サイズ排除、FPLCおよび逆相高性能液体クロマトグラフィーを包

含することができる。適当なアニオン交換媒質は、誘導化デキストラン、アガロース、セルロース、ポリアクリルアミド、特製シリカ、およびその他を包含する。PEI、DEAE、QAEおよびQ誘導体は好ましく、DEAE高速流れセファローズ (Pharmacia、ニュージャージー州ピスカタウェイ) は特に好ましい。

#### 【0168】

典型的なクロマトグラフィー媒質は、フェニル、ブチル、またはオクチル基で誘導化された媒質、例えば、フェニル - セファローズFF (Pharmacia)、トヨパールブチル650 (Toso Haas、ペンシルベニア州モントゴメリヴィレ)、オクチル - セファローズ (Pharmacia) およびその他；またはポリアクリル樹脂、例えば、Amberchrom CG 71 (Toso Haas) およびその他を包含する。適当な固体支持体は、ガラスビーズ、シリカをベースとする樹脂、セルロース樹脂、アガロースビーズ、架橋アガロースビーズ、ポリスチレンビーズ、架橋ポリアクリルアミド樹脂、およびその他を包含し、これらはこれらを使用する条件下に不溶性である。

#### 【0169】

これらの支持体は、アミノ基、カルボキシル基、スルフヒドリル基、ヒドロキシル基および/または炭水化物部分によるタンパク質の結合を可能とする反応性基で修飾することができる。化学的カップリングの例は、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、およびカーボジイミドの化学的カップリングのためのカルボキシルおよびアミノ誘導体を包含する。

#### 【0170】

これらおよび他の固体の媒質はこの分野においてよく知られており、かつ広く使用されており、そして商業的供給会社から入手可能である。レセプターのポリペプチドを支持媒質に結合する方法は、この分野においてよく知られている。特定の方法の選択は日常的設計事項であり、そして一部分選択した支持体の性質により決定される。例えば、下記の文献を参照のこと：Affinity Chromatography : Principle & Methods、Pharmacia LKB Biotechnology、スイス国ウツサラ、1988。

## 【0171】

本発明のポリペプチドは、それらの構造的および結合的性質を利用することによって、単離することができる。例えば、固定化金属イオン吸着 (IMAC) クロマトグラフィーを使用して、ヒスチジンに富んだタンパク質またはHisタグを有するタンパク質を精製することができる。簡単に述べると、ゲルをまず2価の金属イオンで帯電させてキレート化剤を形成する (Sulkowski, Trends in Biochem. 3:1-7, 1985)。ヒスチジンに富んだタンパク質は、使用する金属イオンに依存して、異なるアフィニティーでこのマトリックスに吸着され、競合的溶離、pHの低下、または強いキレート剤の使用により溶離されるであろう。

## 【0172】

他の精製法は、レクチンアフィニティークロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーによるグリコシル化タンパク質の精製を包含する (Methods in Enzymol., Vol. 182, Guide to Protein Purification, M. Deutscher (編), Academic Press, サンディエゴ, 1990, pp. 529-39)。本発明の追加の態様の範囲内において、下記の実施例の節に詳細に論じられているように、問題のポリペプチドと親和標識 (例えば、マルトース結合性タンパク質、FLAG、Glu-Gluタグ、免疫グロブリンドメイン) との融合物を構築して、精製を促進することができる。

## 【0173】

タンパク質の再フォルディング (および必要に応じて再酸化) 手法を好都合に使用することができる。汚染する高分子、特に他のタンパク質および核酸に関して >80%の純度、より好ましくは >90%、なおより好ましくは >95%の純度にタンパク質を精製することが好ましく、製剤学的に純粋な状態、すなわち、99.9%より大きい純度にタンパク質を精製すること、そしてタンパク質は感染因子および発熱因子を含有しないことが特に好ましい。好ましくは、精製されたタンパク質は他のタンパク質、特に動物由来の他のタンパク質を実質的に含まない。

## 【0174】

zacrp5ポリペプチドまたはそのフラグメントは、また、この分野においてよく知られている方法。例えば、排除固相合成、部分的固相法、フラグメント縮合反

応または古典的溶液合成により化学的合成的に製造することができる。例えば、Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149参照。このようなzacrp5ポリペプチドはモノマーまたはマルチマーであることができ、グリコシル化されているか、あるいはされていないことができ、ペギル化されているか、あるいはされていないことができ、そして初期のメチオニンアミノ酸残基を含むか、あるいは含まないことができる。

#### 【0175】

リガンド結合性ポリペプチド、例えば、zacrp5結合性ポリペプチドをリガンドの精製に使用することもできる。ポリペプチドを固体支持体、例えば、アガロース、架橋したアガロース、ガラス、セルロース樹脂、シリカをベースとする樹脂、ポリスチレン、架橋ポリアクリルアミド、または使用条件下に安定である同様な物質のビーズ上に固定化する。

#### 【0176】

固体支持体にポリペプチドを結合する方法はこの分野において知られており、そしてアミン化学、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、およびヒドラジド活性化を包含する。生ずる媒質は一般にカラムの形態に形造り、そしてリガンドを含有する流体をカラムに1またはそれ以上の回数通過させて、リガンドをリガンド結合性ポリペプチドに結合させる。次いで塩濃度、カオトロップ因子(グアニジンHCl)、またはリガンド-レセプターの結合を崩壊するpHの変化により、リガンドを溶離する。

#### 【0177】

リガンド結合性レセプター(または抗体、補体/抗補体の対の一方のメンバー)またはそれらの結合性フラグメント、および商業的に入手可能なバイオセンサー計器(BIAcore™、Pharmacia Biosensor、ニュージャージー州ピスカタウェイ)を使用するアッセイシステムを好都合に使用することができる。このようなレセプター、抗体、補体/抗補体の対のメンバーまたはフラグメントをレセプターチップの表面上に固定化する。この計器の使用は下記の文献に開示されている: Karlsson, J. Immunol. Methods 145:229-40, 1991およびCunninghamお

よびWells, J. Mol. Biol. 234 : 554 - 63, 1993。

【0178】

アミンまたはスルフヒドリル化学を使用して、レセプター、抗体、補体 / 抗補体の対のメンバーまたはフラグメントをフローセル内の金薄膜に結合したデキストラン繊維に共有結合させる。被験試料をセルに通過させる。リガンド、エピトープ、または補体 / 抗補体の対のメンバーが試料の中に存在する場合、それはそれぞれ固定化されたレセプター、抗体またはメンバーに結合し、媒質の屈折率を変化させ、これは金薄膜表面のプラズモン共鳴の変化として検出される。このシステムは、結合アフィニティーをそれから計算することができるオンおよびオフの割合、および結合の化学量論の評価を可能とする。

【0179】

また、この分野において知られている他のアッセイシステムにおいて、リガンド結合性ポリペプチドを使用することができる。このようなシステムは結合アフィニティーを測定するスキャッチャード分析 (Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51 : 660 - 72, 1949) および比色アッセイ (Cunningham他、Science 253 : 545 - 48, 1991およびCunningham他、Science 245 : 821 - 25, 1991参照)。

【0180】

本発明は、また、抗zacrp5抗体を提供する。例えば、zacrp5発現ベクターの産物、または天然源から単離されたzacrp5を抗原として使用して、zacrp5に対する抗体を得ることができる。特に有効な抗zacrp5抗体は、zacrp5に「特異的に結合する」。抗体が $10^6$  / Mまたはそれより大きい、好ましくは $10^7$  / Mまたはそれより大きい、より好ましくは $10^8$  / Mまたはそれより大きい、最も好ましくは $10^9$  / Mまたはそれより大きい結合アフィニティー ( $K_a$ ) でzacrp5ポリペプチド、ペプチドまたはエピトープに結合する場合、抗体は「特異的に結合する」と考える。抗体の結合アフィニティーは、例えば、スキャッチャード分析 (Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51 : 660, 1949) により、容易に決定することができる。適当な抗体は、特定のドメインにおいてzacrp5に結合する抗体を包含する。

【0181】

抗原zacrp5エピトープを支持するペプチドおよびポリペプチドを使用して、抗

zacrp5抗体を製造することができる。本発明の抗原エピトープを支持するペプチドおよびポリペプチドは、配列番号2内に含有される少なくとも9、好ましくは15～約30アミノ酸の配列を含有する。しかしながら、本発明のアミノ酸配列のより大きい部分を含んでなり、本発明のポリペプチドの30～50アミノ酸、またはアミノ酸配列の全体までの任意の長さのアミノ酸を含有し、かつ本発明のポリペプチドのアミノ酸配列の全体を包含する、ペプチドまたはポリペプチドは、また、zacrp5に結合する抗体を誘導するために有効である。

#### 【0182】

水性溶媒中の実質的な溶解度を提供するようにエピトープ支持ペプチドのアミノ酸配列を選択することが望ましい(すなわち、配列は比較的親水性の残基を含むが、疎水性残基を回避することが好ましい)。親水性ペプチドは疎水性プロットから予測することができる、例えば、下記の文献を参照のこと：HoppおよびWoods、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78：3824 - 8、1981およびKyteおよびDoolittle、J. Mol. Biol. 157：105 - 142、1982。そのうえ、プロリン残基を含有するアミノ酸配列は、また、抗体産生に望ましいことがある。

#### 【0183】

組換えzacrp5タンパク質または天然源から単離されたzacrp5に対するポリクローナル抗体は、この分野においてよく知られている方法を使用して製造することができる。例えば、下記の文献を参照のこと：Green他、“Production of Polyclonal Antisera,” Immunochemical Protocols (Manson、編)、pp. 1 - 5 (Humana Press 1992)、およびWilliams他、“Expression of foreign proteins in E. coli using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies,” DNA Cloning 2: Expression Systems、第2版、Glover他(編者)、p. 15 (Oxford University Press 1995)。

#### 【0184】

アジュバント、例えば、明礬(水酸化アルミニウム)またはフロインド完全アジュバントまたはフロインド不完全アジュバントを使用して、zacrp5ポリペプチドの免疫原性を増加することができる。免疫化に有効なポリペプチドは、また、融合ポリペプチド、例えば、zacrp5またはその一部分と免疫グロブリンまたはマ

ルトース結合性タンパク質との融合物を包含する。ポリペプチド免疫原は全長の分子またはその一部分であることができる。ポリペプチドの一部が「ハプテン様」である場合、このような一部分は免疫化のために好都合には高分子担体（例えば、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、ウシ血清アルブミン（BSA）または破傷風トキソイド）に結合または連鎖することができる。

#### 【0185】

ポリクローナル抗体は典型的には動物、例えば、ウマ、雌牛、イヌ、ニワトリ、ラット、マウス、ウサギ、ハムスター、モルモット、ヤギまたはヒツジにおいて発生させるが、本発明の抗zacrp5抗体は類人猿の抗体に由来することができる。ヒヒにおいて診断的、療法的に有効な抗体を発生させる一般的技術は、例えば、下記の文献に記載されている：Goldenberg、国際特許公開No.WO 91/11465、およびLosman他、Int. J. Cancer 46:310、1990。また、抗体はトランスジェニック動物、例えば、トランスジェニックヒツジ、雌牛、ヤギまたはブタにおいて発生させることができ、そして酵母および真菌中で修飾された形態でならびに哺乳動物細胞および昆虫細胞中で発現させることができる。

#### 【0186】

あるいは、モノクローナル抗zacrp5抗体を発生させることができる。特異的抗原に対する齧歯類モノクローナル抗体は、この分野において知られている方法により得ることができる（例えば、下記の文献を参照のこと：Kohler他、Nature 256:495、1975；Coligan他（編者）、Current Protocols in Immunology、Vol. 1、pp. 2.5.1 - 2.6.7（John Wiley & Sons 1991）；Picksley他、“Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in E. coli,” DNA Cloning: Expression Systems、第2版、Glover他（編者）、p. 63（Oxford University Press 1995））。

#### 【0187】

簡単に述べると、モノクローナル抗体は次のようにして得ることができる。zacrp5遺伝子産物を含んでなる組成物をマウスに注射し、血清試料を取出すことにより抗体産生を確認し、脾臓を取出してBリンパ球を獲得し、Bリンパ球を骨髄腫細胞と融合してハイブリドーマを産生し、ハイブリドーマをクローニングし、

抗原に対する抗体を産生する陽性クローンを選択し、抗原に対する抗体を産生するクローンを培養し、そしてハイブリドーマ培養物から抗体を単離する。

【0188】

さらに、本発明の抗zacrp5抗体はヒトモノクローナル抗体に由来することができる。抗原チャレンジにตอบสนองして特異的ヒト抗体を産生するように操作されたトランスジェニックマウスから、ヒトモノクローナル抗体は得られる。この技術において、内因的重鎖および軽鎖遺伝子座のターゲット崩壊を含有する胚幹細胞系統に由来したマウスの中に、ヒト重鎖および軽鎖遺伝子座の因子を導入する。トランスジェニックマウスはヒト抗原に対して特異的なヒト抗体を合成することができる。そしてこのマウスを使用してヒト抗体分泌ハイブリドーマを産生することができる。トランスジェニックマウスからヒト抗体を得る方法は、例えば、下記の文献に記載されている：Green他、Nature Genet. 7:13、1994；Lonberg他、Nature 368:856、1994；およびTaylor他、Int. Immun. 6:579、1994。

【0189】

種々のよく確立された技術により、モノクローナル抗体をハイブリドーマ培養物から単離し、精製することができる。このような単離技術は、プロテインAセファローズを使用するアフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、およびイオン交換クロマトグラフィーを包含する（例えば、下記の文献を参照のこと：Coligen、pp. 2.7.1 - 2.7.12およびpp. 2.9.1 - 2.9.3；Bailes他、“Purification of Immunoglobulin G (IgG),” Methods in Molecular Biology, Vol. 10, pp. 79 - 104 (The Humana Press, Inc. 1992) )。

【0190】

特定の用途のために、抗zacrp5抗体のフラグメントを製造することが望ましい。このような抗体フラグメントは、例えば、抗体のタンパク質分解的加水分解により、得ることができる。抗体フラグメントは、慣用法に従い全抗体のペプシンまたはパイン消化により得ることができる。例示として、抗体をペプシンで酵素的に消化してF(ab)'<sub>2</sub>と表示する5Sフラグメントを形成することによって、

抗体フラグメントを製造することができる。チオール還元剤を使用して、このフラグメントをさらに切断して、3.5S Fab'1価フラグメントを産生することができる。

#### 【0191】

必要に応じて、ジサルファイド結合の切断から生ずるスルフヒドリル基のブロッキング基を使用して、切断反応を実施することができる。別法として、ペプシンを使用する酵素的切断は2つの1価FabフラグメントおよびFcフラグメントを直接的に産生する。これらの方法は、例えば、下記の文献に記載されている：Goldenberg、米国特許第4,331,647号；Nisonoff他、Arch. Biochem. Biophys. 89：230、1960；Porter、Biochem. J. 73：119、1959；Edelman他、in Methods in Enzymology、Vol. 1、p. 422 (Academic Press 1967)；およびColigan、前掲。

#### 【0192】

フラグメントが無傷の抗体により認識される抗原に結合するかぎり、抗体を切断する他の方法、例えば、重鎖を分離して1価の軽-重鎖フラグメントを形成する方法、フラグメントをさらに切断する方法、または他の酵素的、化学的または遺伝学的技術を使用することもできる。

例えば、Fvフラグメントは $V_H$ および $V_L$ 鎖のアソシエーションを含んでなる。下記の文献に記載されているように、このアソシエーションは非共有結合であることができる：Inbar他、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69：2659、1972。あるいは、可変鎖は細胞間ジサルファイド結合により結合するか、あるいは化学物質、例えば、グルタルアルデヒドにより架橋することができる（例えば、下記の文献を参照のこと：Sandhu、Crit. Rev. Biochem. 12：437、1992）。

#### 【0193】

Fvフラグメントは、ペプチドリッカーにより接続された $V_H$ および $V_L$ 鎖を含んでなることができる。オリゴヌクレオチドにより接続された $V_H$ および $V_L$ ドメインをコードするDNA配列を含んでなる構造的遺伝子を構築することによって、これらの一本鎖抗原結合性タンパク質（scFv）は製造される。構造遺伝子を発現ベクターの中に挿入し、次いで発現ベクターを宿主細胞、例えば、大腸菌（E. coli）

の中に導入する。これらの組換え宿主細胞は、2つのVドメインを架橋するリンカーペプチドを有する単一のポリペプチド鎖を合成する。scFvを産生する方法は、例えば、下記の文献に記載されている：Whitlow他、Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:97、1991；また、Bird他、Science 242:423、1988；Ladner他、米国特許第4,946,778号；Pack他、Bio/Technology 11:1271、1993；およびSandhu、前掲。

#### 【0194】

例示として、リンパ球をin vitroにおいてzacrp5ポリペプチドに暴露し、ファージまたは同様なベクター中の抗体表示ライブラリーを選択することによって、scFvを得ることができる（例えば、固定化または標識化zacrp5タンパク質またはペプチドを使用する）。潜在的zacrp5ポリペプチド結合性ドメインを有するペプチドをコードする遺伝子は、ファージ上で（ファージ表示）または細菌、例えば、大腸菌（E. coli）上で表示された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ることができる。

#### 【0195】

ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、多数の方法、例えば、ランダム突然変異誘発およびランダムポリヌクレオチド合成により得ることができる。これらのランダムペプチド表示ライブラリーを使用して、既知のターゲットと相互作用するペプチドについてスクリーニングすることができる。このターゲットはタンパク質またはポリペプチド、例えば、リガンドまたはレセプター、生物学的または合成的高分子、または有機または無機の物質であることができる。

#### 【0196】

このようなランダムペプチド表示ライブラリーをつくりかつスクリーニングする技術はこの分野において知られている（Ladner他、米国特許第5,223,409号、Ladner他、米国特許第4,946,778号、Ladner他、米国特許第5,403,484号、Ladner他、米国特許第5,571,698号、およびKay他、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およびこのようなライブラリーをスクリーニングするキットは、例えば、Clontech（カリフォルニア州パロアルト）、Invitrogen Inc.（カリフォルニ

ア州サンディエゴ)、New England Biolabs, Inc. (マサチューセッツ州ベバリー)、およびPharmacia LKB Biotechnology Inc. (ニュージャージー州ピスカタウェイ)から商業的に入手可能である。本明細書に開示するzacrp5配列を使用して、ランダムペプチド表示ライブラリーをスクリーニングして、zacrp5に結合するタンパク質を同定することができる。

【0197】

抗体フラグメントの他の形態は、単一の相補性決定領域(CDR)をコードするペプチドである。問題の抗体のCDRをコードする遺伝子を構築することによって、CDRペプチド(「最小認識単位」)を得ることができる。このような遺伝子は、例えば、抗体産生細胞のRNAから可変領域を合成するPCRにより製造される(例えば、下記の文献を参照のこと:Larrick他、Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:106、1991); Courtenay-Luck、"Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies," Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application、Ritter他、(編者)、p. 166 (Cambridge University Press 1995); およびWard他、"Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," Monoclonal Antibodies: Principles and Applications、Birch他、(編者)、p. 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995) )。

【0198】

あるいは、抗zacrp5抗体は「ヒト化」モノクローナル抗体から誘導することができる。マウス相補性決定領域をマウス免疫グロブリンの重および軽可変鎖からヒト可変ドメインの中に転移することによって、ヒト化モノクローナル抗体を産生する。次いでヒト抗体の典型的な残基を、ネズミ対応物のフレームワーク領域において置換する。ヒトモノクローナル抗体に由来する抗体成分の使用は、ネズミ定常領域の免疫原性に関連する潜在的問題を排除する。

【0199】

ネズミ免疫グロブリン可変領域をクローニングする一般的技術は、例えば、下記の文献に記載されている: Orlandi他、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86: 3833、1989。ヒト化モノクローナル抗体を産生する技術は、例えば、下記の文献

に記載されている：Jones他、Nature 321：522、1986；Carter他、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89：4285、1992；Sandhu、Crit. Rev. Biotech. 12：437、1992；Singer他、J. Immun. 150：2844、1993；Sudhir（編者）、Antibody Engineering Protocols（Humana Press, Inc. 1995）；Kelley、“Engineering Therapeutic Antibodies,” Protein Engineering: Principles and Practice、Cleland他（編者）、pp. 399 - 434（John Wiley & Sons, Inc. 1996）；およびQueen他、米国特許第5,693,762号（1997）。

#### 【0200】

ポリクローナル抗イディオタイプ抗体は、動物を抗zacrp5抗体または抗体フラグメントで標準的技術に従い免疫化することによって製造することができる。例えば、下記の文献を参照のこと：Green他、“Production of Polyclonal Antisera,” Methods In Molecular Biology: Immunochemical Protocols、Manson（編者）、pp. 1 - 12（Humana Press 1992）。

#### 【0201】

また、Coligan、前掲、pp. 2.4.1 - 2.4.7参照。あるいは、モノクローナル抗イディオタイプ抗体は、前述の技術に従い、免疫原として抗zacrp5抗体または抗体フラグメントを使用して製造することができる。別法として、ヒト化抗イディオタイプ抗体または類人猿抗イディオタイプ抗体は前述の技術に従い製造することができる。抗イディオタイプ抗体を製造する方法は、例えば、下記の文献に記載されている：Irie、米国特許第5,208,146号、Greene他、米国特許第5,637,677号、およびVarthakaviおよびMinocha、J. Gen. Virol. 77：1875、1996。

#### 【0202】

ファージ（ファージディスプレイ）上にまたは細菌、例えば、大腸菌（E. coli）上にディスプレイされたランダムまたは方向づけられたライブラリーをスクリーニングすることによって、潜在的zacrp5ポリペプチド結合性ドメインを有するポリペプチド、「結合性タンパク質」をコードする遺伝子を得ることができる。ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、多数の方法、例えば、ランダム突然変異誘発およびランダムポリヌクレオチド合成において得ることができる。あるいは、拘束ファージディスプレイライブラリーを製造することもできる。

これらのペプチドディスプレイライブラリーを使用して、既知のターゲットと相互作用するペプチドについてスクリーニングすることができる。ここでターゲットはタンパク質またはポリペプチド、例えば、リガンドまたはレセプター、生物学的または合成的高分子、または有機または無機の物質であることができる。

#### 【0203】

このようなペプチドディスプレイをつくりかつスクリーニングする技術はこの分野において知られており（Ladner他、米国特許第5,223,409号；Ladner他、米国特許第4,946,778号；Ladner他、米国特許第5,403,484号およびLadner他、米国特許第5,571,698号）そしてペプチドディスプレイライブラリーおよびこのようなライブラリーをスクリーニングするキットは、例えば、クロンテック（Clontech、カリフォルニア州パロアルト）、インビトロゲン（Invitrogen、カリフォルニア州サンディエゴ）、ニュー・イングランド・バイオラプス・インコーポレーテッド（New England Biolabs, Inc.、マサチューセッツ州ベバーリイ）およびファーマシアLKBバイオテクノロジー・インコーポレーテッド（Pharmacia LKB Biotechnology, Inc.、ニュージャージー州ピスカタウェイ）から商業的に入手可能である。本明細書に開示するzacrp5配列を使用してペプチドディスプレイライブラリーをスクリーニングして、zacrp5に結合するタンパク質を同定することができる。zacrp5ポリペプチドと相互作用する、これらの「結合性タンパク質」を本質的に抗体と同様に使用することができる。

#### 【0204】

この分野において知られている種々のアッセイを利用して、zacrp5タンパク質またはペプチドに特異的に結合する抗体および/または結合性タンパク質を検出することができる。典型的なアッセイは下記の文献に詳細に記載されている：Antibodies: A Laboratory Manual、HarlowおよびLane（編者）、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1988。このようなアッセイの代表的例は下記のものを含む：並流免疫電気泳動、ラジオイムノアッセイ、放射線免疫沈降、酵素結合イムノアッセイ（ELISA）、ドットプロットまたはウェスタンプロットアッセイ、阻害または競合アッセイ、およびサンドイッチアッセイ。さらに、野生型vs突然変異体zacrp5タンパク質またはポリペプチドに対する結合について、

抗体をスクリーニングすることができる。

【0205】

zacrp5に対する抗体および結合性タンパク質は下記の用途に使用することができる：zacrp5を発現する細胞の標識化；アフィニティー精製によるzacrp5の単離；zacrp5ポリペプチドの循環レベルを測定する診断アッセイ；根元的病理または疾患のマーカーとして可溶性zacrp5の検出または定量；FACSを使用する方法において；発現ライブラリーのスクリーニング；抗イディオタイプ抗体を発生させるため；およびin vitroおよびin vivoにおける精子形成または同様な活性のzacrp5ポリペプチドのモジュレーションをブロックする中和性抗体またはアンタゴニストとして。

【0206】

適当な直接的タグまたは標識は、放射性核種、酵素、基質、コファクター、インヒビター、蛍光マーカー、化学発光マーカー、磁気粒子およびその他を包含する；間接的タグまたは標識は、ビオチン - アビジンまたは他の補体 / 抗補体の対を中間体として使用することを特徴とする。そのうえ、アッセイ、例えば、ウェスタンブロットアッセイまたはこの分野において知られている他のアッセイにおいて、zacrp5またはそのフラグメントに対する抗体をin vitroにおいて使用して、変性されたzacrp5またはそのフラグメントを検出することができる。

【0207】

本発明における抗体またはポリペプチドは、また、薬剤、トキシン、放射性核種およびその他と直接的または間接的に複合化することができ、そしてこれらの複合体はin vivoの診断または療法の応用において使用することができる。例えば、対応する抗相補的分子（例えば、それぞれ、レセプターまたは抗原）を発現する組織または器官を同定または処置するために、本発明のポリペプチドまたは抗体を使用することができる。さらに詳しくは、zacrp5ポリペプチドまたは抗zacrp5抗体、またはそれらの生物活性フラグメントまたは部分を検出可能な分子または細胞障害性分子にカップリングさせ、そして抗相補的分子を発現する細胞、組織または器官を有する哺乳動物に送達することができる。

【0208】

本発明の追加の面は、前述のzacrp5ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストを同定する方法を提供し、前記アゴニストまたはアンタゴニストは本明細書においてさらに論ずるように価値のある特性を有することができる。1つの態様において、zacrp5ポリペプチドアゴニストを同定する方法が提供され、この方法はアゴニストに対して応答性の細胞を準備し、被検化合物の存在下に細胞を培養し、細胞の応答をzacrp5ポリペプチドの存在下に培養した細胞と比較し、そして細胞の応答が同一型である被検化合物を選択することを含む。

#### 【0209】

他の態様において、zacrp5ポリペプチドのアンタゴニストを同定する方法が提供され、この方法はzacrp5ポリペプチドに対して応答性の細胞を準備し、zacrp5ポリペプチドの存在下に細胞の第1部分を培養し、zacrp5ポリペプチドおよび被検化合物の存在下に細胞の第2部分を培養し、そして細胞の第1部分に比較して細胞の第2部分の細胞の応答の減少を検出することを含む。本明細書に開示するアッセイに加えて、レセプターの結合またはzacrp5依存的細胞応答の刺激/阻害を測定するように設計された、種々のアッセイにおいて、試料をzacrp5活性の阻害について試験することができる。

#### 【0210】

例えば、zacrp5刺激細胞経路に対して応答性であるリポーター遺伝子構築物でzacrp5応答性細胞システムをトランスフェクトすることができる。この型のリポーター遺伝子構築物はこの分野において知られており、そして一般にアッセイ可能なタンパク質、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鎖された、zacrp5 - DNA応答因子を含んでなるであろう。

#### 【0211】

DNA応答因子は下記のを包含するが、これらに限定されない：環状AMP応答因子(CRE)、ホルモン応答因子(HRE)、インスリン応答因子(IRE) (Nasrin他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:5273-7, 1990)および血清応答因子(SRE) (Shaw他、Cell 56:563-72, 1989)。環状AMP応答因子は下記の文献において概観されている：Roestler他、J. Biol. Chem. 263(19):9063-6, 1988およびHabener、Molec. Endocrinol. 4(8):1087-94, 1990。ホ

ルモン応答因子は、Beato、Cell 56:335-44。1989において概観されている。

#### 【0212】

リポーター遺伝子発現のzacrp5刺激の減少により証明されるように、ターゲット細胞に対するzacrp5の活性を阻害する能力について、候補の化合物、溶液、混合物または抽出物を試験する。この型のアッセイは、細胞表面レセプターに対するzacrp5の結合を直接的にブロックする化合物、ならびにレセプター-リガンド結合に引き続いて細胞経路のプロセスをブロックする化合物を検出するであろう。

#### 【0213】

別法において、検出可能な標識（例えば、<sup>125</sup>I、ビオチン、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、FITC、およびその他）で標識化したzacrp5を使用して、化合物または試料をレセプターに対するzacrp5の結合の直接的ブロックについて試験することができる。このアッセイにおいて、レセプターに対する標識化zacrp5の結合を阻害する被験試料の能力は阻害活性を示し、これは二次的アッセイにより確認することができる。結合アッセイにおいて使用するレセプターは細胞のレセプターまたは単離し、固定化されたレセプターであることができる。

#### 【0214】

脂肪細胞補体関連タンパク質は、細胞-細胞または細胞-細胞外基質の相互作用、特に組織の改造のモジュレーターを包含する相互作用に関係づけられる。多数の自己免疫および改造に関係する疾患の表現型的発現は、炎症および/または組織の改造プロセスの広範な活性化である。機能的器官または下位器官は置換された生物学的構造物の機能を実行できない種々の細胞外基質（ECM）成分により置換されることがしばしば起こる。これらの疾患における初期事象、およびその結果生ずる過剰の細胞外基質の沈着については完全には理解されていない。

#### 【0215】

初期事象は、損傷または最適な生物学的構造物の調節の初期混乱を包含すると仮定されてきた。興味深いことには、時には細胞内成分は、特定の疾患を示す、自己抗原として見出された。免疫系による抗体産生は、これらの細胞内タンパク質に対して過度の暴露後、過剰のまたは不適切な改造の結果であることがある。

改造プロセスをターゲティングすることによって、有効な自己抗原を減少させることができるであろう。したがって、zacrp5ポリペプチド、フラグメント、融合物、アゴニスト、アンタゴニストおよびその他は、種々の自己免疫および改造疾患をモジュレートするとき有益であろう。

#### 【0216】

関節における結合組織または筋肉の損傷に応答する不適切な改造は、損傷部位における細胞成分の過剰の解放に対する感受性を生ずることがある。zacrp6ポリペプチド、フラグメント、融合物、アゴニスト、アンタゴニストおよびその他は、このような応答と関節炎に関連する炎症との間にアソシエーションが存在するかどうかを決定する場合、有効であろう。このようなインジケータは、炎症の減少および疼痛または剛性の軽減を包含する。

#### 【0217】

動物モデルにおいて、適用は関節の巨視的検査および後足の腫脹の変化から誘導されるであろう。zacrp6ポリペプチド、フラグメント、融合物、アゴニスト、アンタゴニストおよびその他は、骨関節炎の動物モデルに投与して (Kikuchi他、Osteoarthritis Cartilage 6:177-86, 1998およびLohmander他、Arthritis Rheum 42:534-44, 1999)、コラゲナーゼの作用により刺激された炎症から生ずる、これらの組織の破壊の抑制を探ることができる。

#### 【0218】

強皮症の症状を示す自己抗原的は細胞質タンパク質と考えられるものであることが、最近の研究により示された。zacrp5についてのノックアウト動物は、本明細書において記載するように、本発明において提供されるzacrp5ポリペプチド、フラグメント、融合物、およびその他は、脂肪細胞補体関係タンパク質により仲介される局所的組織の不適切なまたは不完全な修復による炎症に対する応答として、このようなタンパク質に対する抗体が発生されるかどうかの決定において有効であろう。

#### 【0219】

本発明において提供される、zacrp5ポリペプチド、フラグメント、融合物、およびその他は、過剰のおよび/または不適切な動脈改造は動脈硬化症および動脈

損傷、例えば、動脈閉塞におけるプラーク形成においてある役割を演ずるかどうかを、ここにおいて提供される方法により、決定するとき有効であろう。脂肪細胞補体タンパク質 $\alpha 2\text{M}$ を使用する脈管損傷（および根元的細胞外基質）の治療は、非常に初期の段階における脈管改造プロセスを変更するように思われる（同時継続米国出願第09/253,604号）。脂肪細胞補体タンパク質を使用する治療は、損傷後において血小板を比較的静止状態に保持し、前改造性および前炎症性タンパク質および細胞の過剰のリクルートメントを排除する作用することができる。

#### 【0220】

このファミリーの他のメンバーは、例えば、脂肪、またはコレステロールの存在により誘導される改造をモジュレートすることができる。血液の過剰量のコレステロールおよび脂肪は、正しい脂肪細胞補体タンパク質のファミリーのメンバーの非存在において、改造を活性化することができる。

Acrp30は活性的に増殖する脂肪組織においてのみ発現される。結合組織の改造は脂肪細胞のこの活性化に厳密に関係づけられる。過剰の重量増加（脂肪）と糖尿病との間に明瞭な関係が存在する。したがって、Acrp30は脂肪改造関係づけられ、そしてこのプロセスは肥満の個体において酷使されるようである。その結果、不適切な脂肪貯蔵の作用はII型糖尿病に寄与する。

#### 【0221】

エネルギー収支（エネルギー代謝、栄養状態、脂肪貯蔵およびその他を包含する）は、健康について重要な基準である。このエネルギーのホメオスタシスは、随意および不随意の機能のために必要なエネルギー発生させるための食物摂取および炭水化物および脂肪の代謝を包含する。タンパク質の代謝はエネルギー発生に導くことができるが、好ましくは筋肉の形成または修復に導く。他の結果の中で、エネルギーのホメオスタシスは脂肪組織の過度または過小の形成に導く。

#### 【0222】

脂肪の形成および貯蔵はインスリンでモジュレートされる。例えば、インスリンは細胞の中へのグルコースの輸送を刺激し、細胞においてグルコースは - グリセロホスフェートに代謝され、後者は脂肪酸のエステル化に使用されて、トリ

グリセリドとしての脂肪酸の貯蔵を可能とする。さらに、脂肪細胞（脂肪の細胞）は、遊離脂肪酸の脂肪細胞への変換を増強する、特異的輸送タンパク質を発現する。

#### 【0223】

また、脂肪細胞は、グルコースおよび脂肪の代謝のホメオスタシスのコントロールをモジュレートすると考えられる、いくつかのタンパク質を分泌する。これらの追加の脂肪細胞分泌タンパク質は、アジプシン、補体因子C3およびB、腫瘍壊死因子、ob遺伝子産物およびAcrp30を包含する。また、脂肪細胞におけるインスリン調節分泌経路の存在を示唆する証拠が存在する。Scherer他、J. Biol. Chem. 270(45):26746-9、1995。これらの成分の過度または過小の分泌は、脂肪組織の過度または過小の形成により一部分衝撃され、肥満症または拒食症に直接または間接的に関連する病理学的症状に導くことがある。

#### 【0224】

他の脂肪細胞補体関係タンパク質、例えば、Acrp30に対する相同性に基づいて、zacrp5ポリペプチド、フラグメント、融合物、アゴニストまたはアンタゴニストを使用して哺乳動物におけるエネルギー収支をモジュレートするか、あるいは損傷から内皮細胞を保護することができる。エネルギー収支のモジュレーションに関する、zacrp5ポリペプチドは細胞の代謝反応をモジュレートする。このような代謝反応は、脂肪生成、グルコース新生、グリコーゲン分解、脂質生成、グルコース吸収、タンパク質合成、熱発生、酸素の利用およびその他を包含する。

#### 【0225】

zacrp5ポリペプチドは、また、交感神経系または副交感神経系に関連する組織中のポリペプチドの発現により示されるように、神経伝達物質として、または神経伝達のモジュレーターとしての使用を見出すことができる。これに関して、zacrp5ポリペプチドは、例えば、脳またはその他における2-デオキシ-グルコースの吸収により証明されるように、栄養分の吸収における実用性を見出すことができる。

#### 【0226】

この分野において知られているか、あるいは本明細書において記載されている

他の方法の中で、哺乳動物のエネルギー収支を下記の代謝機能の1または2以上をモニターすることによって評価することができる：脂肪生成、グルコース新生、グリコーゲン分解、脂質生成、グルコース吸収、タンパク質合成、熱発生、酸素の利用およびその他。これらの代謝機能は、いっそう詳細に後述するように、当業者に知られている技術（アッセイまたは動物モデル）によりモニターされる。

#### 【0227】

例えば、インスリンのグルコース調節作用は、肝臓、骨格筋および脂肪組織において主として発揮される。インスリンはこれらの組織中のその細胞のレセプターに結合し、組織特異的作用を開始し、これは、例えば、グルコース産生の阻害およびグルコース利用の刺激を生ずる。肝臓において、インスリンはグルコース吸収を刺激し、グルコース新生およびグリコーゲン分解を阻害する。骨格筋および脂肪組織において、インスリンはグルコースの吸収、貯蔵および利用を刺激する作用をする。

#### 【0228】

前述の代謝機能のすべてをモニターする、この分野において認識されている方法が存在する。こうして、当業者は、zacrp5ポリペプチド、フラグメント、融合タンパク質、抗体、アゴニストまたはアンタゴニストを代謝のモジュレート機能のために評価することができる。典型的なモジュレーション技術は後述される。

#### 【0229】

脂肪生成、グルコース新生およびグリコーゲン分解は、哺乳動物のエネルギー収支の相互に関係する成分であり、既知の技術、例えば、ob / obマウスまたはdb / dbマウスにより評価することができる。ob / obマウスは、ob（肥満）位置における不活性化突然変異に対してホモ結合的である同系繁殖マウスである。このようなob / obマウスは過食性および代謝低下性であり、循環OBタンパク質の産生を欠如すると考えられる。db / dbマウスはdb（糖尿病）位置における不活性化突然変異に対してホモ結合的である同系繁殖マウスである。db / dbマウスは、また、糖尿病の表現型を表示する以外、ob / obマウスのそれに類似する表現型を表示する。このようなdb / dbマウスは循環OBタンパク質の作用に対して耐性であると考えられる。また、これらのパラメーターを評価する種々のin vitro法がこの分

野において知られている。

#### 【0230】

インスリン刺激脂質生成は、例えば、トリグリセリド中の $^{14}\text{C}$ -アセテートの取込み (Mackall他、J. Biol. Chem. 251:6462-4、1976) またはトリグリセリドの蓄積 (Kletzien他、Mol. Pharmacol. 41:393-8、1992) の測定によりモニターすることができる。

#### 【0231】

グルコースの吸収は、例えば、インスリン刺激グルコース輸送についてのアッセイにおいて評価することができる。1g/lのグルコース、0.5または1.0%のBSA、20mMのHepes、および2mMのグルタミンを含有するDMEMの中に、非トランスフェクト、分化L6筋管 (G418の非存在下に維持される) を入れる。2~5時間培養した後、0.5または1.0%のBSA、20mMのHepes、および2mMのグルタミンを含有する、新鮮な、無グルコースDMEMと培地を置換する。適当な濃度のインスリンまたはIGF-1、または希釈系列の被験物質を添加し、細胞を20~30分間インキュベートする。 $^3\text{H}$ または $^{14}\text{C}$ 標識化デオキシグルコースを約50mMの最終濃度に添加し、細胞をほぼ10~30分間インキュベートする。

#### 【0232】

次いで細胞を冷緩衝液 (例えば、PBS) で急速にすぎ、適当な溶解剤 (例えば、1%のSDSまたは1NのNaOH) で溶解する。次いでシンチレーションカウンターで計数することによって、細胞ライゼートを評価する。グルコース輸送のインヒビターであるサイトカラシンbの存在下に細胞をインキュベートすることによって測定して、細胞に関連する放射能を非特異的結合を減じた後のグルコース輸送の測度として採る。他の方法は、例えば、Manchester他、Am. J. Physiol. 266 (Endocrinol. Metab. 29): E326 - E333、1994 (インスリン刺激グルコース輸送) に記載されている方法を包含する。

#### 【0233】

タンパク質合成は、例えば、被験細胞と $^3\text{S}$ -メチオニンとインキュベートした後、 $^3\text{S}$ -メチオニン標識化タンパク質の沈澱を $^3\text{S}$ -メチオニンおよびタンパク質合成の推定上のモジュレーターと比較することによって評価することができる。

る。

熱発生は下記の文献に記載されているようにして評価することができる：B. Stanley, *The Biology of Neuropeptide Y and Related Peptides*, W. ColmersおよびC. Wahlestedt (編者)、Humana Press、Ottawa、1993、pp. 457 - 509；C. Billington他、*Am. J. Physiol.* 260：R321、1991；N. Zarrjevski他、*Endocrinology* 133：1753、1993；C. Billington他、*Am. J. Physiol.* 266：R1765、1994；Heller他、*Am. J. Physiol.* 252(4 Pt 2)：R661 - 7、1987；およびHeller他、*Am. J. Physiol.* 245：R321 - 8、1993。また、代謝速度は、種々の技術により測定することができ、熱発生の間接的測度である。

#### 【0234】

酸素の利用は、Heller他、*Pflugers Arch* 369：55 - 9、1977に記載するようにして評価することができる。この方法は、また、視床下部温度および代謝熱産生の分析を含んだ。酸素の利用および熱調節は、また、ヒトにおいてHaskell他、*J. Appl. Physiol.* 51：948 - 54、1981に記載されているように評価された。

#### 【0235】

神経伝達物質の機能を脳における2 - デオキシ - グルコースの吸収をモニターすることによって評価することができる。このパラメーターはこの分野において知られている技術（アッセイまたは動物モデル）、例えば、オートラジオグラフィによりモニターされる。有効なモニター技術は、例えば、Kilduff他、*J. Neurosci.* 10：2463 - 75、1990に記載されており、下記の文献に記載されているように、関係する技術を使用して「冬眠心臓」を評価する：Gerber他、*Circulation* 94(4)：651 - 8、1996、およびFallavollita他、*Circulation* 95：1900 - 9、1997。

#### 【0236】

さらに、zacrp5ポリペプチド、そのフラグメント、融合物、アゴニストまたはアンタゴニストは、抗微生物の用途に療法上有用である。例えば、補体成分C1qは、感染因子、例えば、細菌およびウイルスに対する宿主の防御においてある役

割を演ずる。C1qはいくつかの特殊化された機能を示すことが知られている。例えば、C1qは結合した抗体またはC反応性タンパク質（CRP）との相互作用を介して補体のカスケードを誘発する。

#### 【0237】

また、C1qはある種の細菌、RNAウイルス、マイコプラズマ、尿酸結晶、細菌のエンドトキシンの脂質A成分およびある種の細胞内オルガネラの膜と直接的に相互作用する。C1qレセプターに対するC1qの結合は、食作用を促進すると考えられる。また、C1qは宿主の防御系の抗体形成の面を増強するように思われる。例えば、下記の文献を参照のこと：Johnston、*Pediatr. Infect. Dis. J.* 12(1)：933 - 41、1993。こうして、可溶性C1q様分子は、感染因子の溶解または食作用を促進する抗菌剤として有用であろう。

#### 【0238】

zacrp5フラグメントならびにzacrp5ポリペプチド、融合タンパク質、アゴニスト、アンタゴニストおよび抗体は、この分野において知られている手法に従い、それらの抗微生物特性に関して評価することができる。例えば、下記の文献を参照のこと：Barsum他、*Eur. Respir. J.* 8(5)：709 - 14、1995；Sandovsky - Losica他、*J. Med. Vet. Mycol. (England)* 28(4)：279 - 87、1990；Mehentee他、*J. Gen. Microbiol. (England)* 135(Pt. 8)：2181 - 8、1989；SegalおよびSavage、*Journal of Medical and Vet. Mycol.* 24：477 - 9、1986およびその他。

#### 【0239】

所望ならば、これに関するzacrp5の性能をこれに関して機能的であることが知られているタンパク質、例えば、プロリンに富んだタンパク質、リゾチーム、ヒスタチン、ラクトペルオキシダーゼまたはその他と比較することができる。さらに、zacrp5のフラグメント、ポリペプチド、融合タンパク質、アゴニスト、アンタゴニストまたは抗体を1またはそれ以上の抗微生物因子と組み合わせて評価して、相乗効果を同定することができる。当業者は認識するように、zacrp5のポリペプチド、フラグメント、融合タンパク質、アゴニスト、アンタゴニストおよび抗体の抗微生物特性を同様に評価することができる。

## 【0240】

神経伝達物質または神経伝達モジュレーターとして、本発明のzacrp5ポリペプチドフラグメントならびにzacrp5ポリペプチド、融合タンパク質、アゴニスト、アンタゴニストまたは抗体は、また、カルシウムイオン濃度、筋肉収縮、ホルモン分泌、DNA合成または細胞成長、リン酸イノシトールの代謝回転、アラキドン酸塩の放出、ホスホリパーゼ-Cの活性化、胃内容排出、ヒト好中球の活性化またはADCC能力、スーパーオキシドアニオンの産生およびその他をモジュレートすることができる。これらの性質の評価は既知の方法、例えば、本明細書において記載する方法により実施することができる。

## 【0241】

細胞内カルシウムレベルに対するzacrp5ポリペプチド、フラグメント、融合物、抗体、アゴニストまたはアンタゴニストの衝撃は、この分野において知られている方法、例えば、Dobrzanski他、Regulatory Peptides 45:341-52、1993、およびその他に記載されている方法により評価することができる。筋肉収縮に対するzacrp5ポリペプチド、フラグメント、融合物、アゴニストまたはアンタゴニストの衝撃は、この分野において知られている方法、例えば、SmitsおよびLebevre、J. Auton. Pharmacol. 14:383-92、1994、Belloli他、J. Vet. Pharmacol. Therap. 17:379-83、1994、Maggi他、Regulatory Peptides 53:259-74、1994、およびその他に記載されている方法により評価することができる。

## 【0242】

ホルモン分泌に対するzacrp5ポリペプチド、フラグメント、融合物、アゴニストまたはアンタゴニストの衝撃は、この分野において知られている方法、例えば、プロラクチンの放出について、Henriksen他、J. Recep. Sig. Transd. Res. 15(1-4):529-41、1995、およびその他に記載されている方法により評価することができる。

## 【0243】

DNA合成または細胞成長に対するzacrp5ポリペプチド、フラグメント、融合物、アゴニストまたはアンタゴニストの衝撃は、この分野において知られている方

法、例えば、Dobrzanski他、Regulatory Peptides 45 : 341 - 52、1993、およびその他に記載されている方法により評価することができる。リン酸イノシトールの代謝回転に対するzacrp5ポリペプチド、フラグメント、融合物、アゴニストまたはアンタゴニストの衝撃は、この分野において知られている方法、例えば、Dobrzanski他、Regulatory Peptides 45 : 341 - 52、1993、およびその他に記載されている方法により評価することができる。

#### 【0244】

また、アラキドン酸塩の放出に対するzacrp5ポリペプチド、フラグメント、融合物、アゴニストまたはアンタゴニストの衝撃は、この分野において知られている方法、例えば、Dobrzanski他、Regulatory Peptides 45 : 341 - 52、1993、およびその他に記載されている方法により評価することができる。ホスホリパーゼ - Cの活性化に対するzacrp5ポリペプチド、フラグメント、融合物、アゴニストまたはアンタゴニストの衝撃は、この分野において知られている方法、例えば、Dobrzanski他、Regulatory Peptides 45 : 341 - 52、1993、およびその他に記載されている方法により評価することができる。

#### 【0245】

胃内容排出に対するzacrp5ポリペプチド、フラグメント、融合物、アゴニストまたはアンタゴニストの衝撃は、この分野において知られている方法、例えば、Varga他、Eur. J. Pharmacol. 286 : 109 - 112、1995、およびその他に記載されている方法により評価することができる。ヒト好中球の活性化およびADCC能力に対するzacrp5ポリペプチド、フラグメント、融合物、アゴニストまたはアンタゴニストの衝撃は、この分野において知られている方法、例えば、Wozniak他、Immunology 78 : 629 - 34、1993、およびその他に記載されている方法により評価することができる。スーパーオキシドのアニオンの産生に対するzacrp5ポリペプチド、フラグメント、融合物、アゴニストまたはアンタゴニストの衝撃は、この分野において知られている方法、例えば、Wozniak他、Immunology 78 : 629 - 34、1993、およびその他に記載されている方法により評価することができる。

#### 【0246】

コラーゲンは血小板凝集の効力のあるインデューサーである。これは血管損傷

から回復する患者に危険を付与する。コラーゲン誘導血小板凝集のインヒビターは、コラーゲン被覆した表面に対する血小板の結合をブロックし、そして関連するコラーゲン誘導血小板凝集を減少するために有用であろう。C1qは補体経路の1成分であり、防御メカニズムを刺激し、ならびに組織の損傷を引き起こすことがある毒性酸素種の発生を誘発することが見出された (Tenner、Behring Inst. Mitt. 93 : 241 - 53、1993)。

#### 【0247】

C1q結合性部位が血小板上に見出された。C1qは免疫結合性相手に対して独立して、血小板凝集を阻害するが、血小板の付着または形状変化を阻害しないことが見出された。C1qのアミノ末端領域はコラーゲンとの相同性を共有する (PeerschkeおよびGhebrehiwet、J. Immunol. 145 : 2984 - 88、1990)。C1qおよび補体経路の阻害は、本明細書に開示するか、あるいはこの分野において知られている方法、例えば、SubaおよびCsako、J. Immunol. 117 : 304 - 9、1976に記載されている方法により測定することができる。

#### 【0248】

補体阻害に対するzacrp5ポリペプチド、フラグメント、融合物、アゴニストまたはアンタゴニストの衝撃は、この分野において知られている方法により評価することができる。C1q結合活性に対するzacrp5ポリペプチド、フラグメント、融合物、アゴニストまたはアンタゴニストの衝撃は、この分野において知られている方法により評価することができる。

#### 【0249】

コラーゲン仲介血小板の接着、活性化および凝集に対するzacrp5ポリペプチド、フラグメント、融合物、アゴニストまたはアンタゴニストの衝撃は、本明細書に開示するか、あるいはこの分野において知られている方法、例えば、血小板凝集アッセイ (Chiang他、Thrombosis Res. 37 : 605 - 12、1985) および血小板接着アッセイ (PeerschkeおよびGhebrehiwet、J. Immunol. 144 : 221 - 5、1990) により評価することができる。コラーゲンに対する血小板の接着およびコラーゲン誘導血小板凝集の阻害についてのアッセイは、下記の文献に記載されている方法により測定することができる : Keller他、J. Biol. Chem. 268 : 5450

- 6、1993 ; WaxmanおよびConnolly、J. Biol. Chem. 268 : 5445 - 9、1993 ; Noeske - Jungblut他、J. Biol. Chem. 269 : 5050 - 3、1994またはDeckmyn他、Blood 85 : 712 - 9、1995。

#### 【0250】

大動脈環の血管拡張に対するzacrp5ポリペプチド、フラグメント、融合物、アゴニストまたはアンタゴニストの衝撃は、Dainty他、J. Pharmacol. 100 : 767、1990およびRhee他、Neurotox. 16 : 179、1995の方法に従い測定することができる。

#### 【0251】

虚血および再灌流の損傷に対するzacrp5ポリペプチド、フラグメント、融合タンパク質、抗体、アゴニストまたはアンタゴニストの作用を評価するために、種々のin vitroおよびin vivoモデルが入手可能である。例えば、下記の文献を参照のこと : Shandelya他、Circulation 88 : 2812 - 26、1993 ; Weisman他、Science 249 : 146 - 151、1991 ; Buerke他、Circulation 91 : 393 - 402、1995 ; Horstick他、Circulation 95 : 701 - 5、1997およびBurke他、J. Phar. Exp. Therap. 286 : 429 - 38、1998。

#### 【0252】

ex vivoハムスター血小板凝集アッセイは、Deckmyn他、前掲に記載されている。Deckmyn他、前掲に記載されているモデルを使用して、zacrp5ポリペプチドの注射後、ハムスターおよびヒヒにおける出血時間を測定することができる。Deckmyn他、前掲により提供されるハムスター大腿静脈血栓モデルを使用して、本発明のタンパク質の投与にตอบสนองした血栓形成を測定することができる。zacrp5投与後における流れ条件下の血小板接着の変化は、Harsfalvi他、Blood 85 : 705 - 11、1995に記載されている方法により測定することができる。

#### 【0253】

補体の阻害および創傷の治癒について、zacrp5ポリペプチド、フラグメント、融合タンパク質、抗体、アゴニストまたはアンタゴニストを単独で、あるいはコラーゲン誘導血小板活性化および凝集の他の既知インヒビター、例えば、パルジピン、モウバチンまたはカリンと組合わせて評価することができる。

## 【0254】

本明細書に開示するか、あるいはこの分野において知られている方法、例えば、ブタにおける皮膚層の治癒 (Lynch他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 7696 - 700、1987) および遺伝的に糖尿病のマウスにおける全厚さの皮膚の創傷 (Greenhalgh他、Am. J. Pathol. 136 : 1235 - 46、1990) を使用して、zac rp5ポリペプチド、フラグメント、融合タンパク質、抗体、アゴニストまたはアンタゴニストを評価することができる。本発明のポリペプチドを単独で、あるいは前述した他の既知の補体インヒビターと組合わせてアッセイすることができる。

## 【0255】

放射性ハイブリッドマッピングは、哺乳動物の染色体の高い分解能の、隣接する地図を構築するために開発された、幹細胞の遺伝的技術である (Cox他、Science 250 : 245 - 50、1990)。遺伝子の配列の部分的または完全な知識は、染色体の放射性ハイブリッドマッピングパネルとともに使用するために適当なPCRプライマーの設計を可能とする。全体のヒトゲノムをカバーする、放射性ハイブリッドマッピングパネル、例えば、Stanford G3 PanelおよびGeneBridge 4 RH Panel (Research Genetics, Inc.、アラバマ州ハンツヴィレ) は商業的に入手可能である。

## 【0256】

これらのパネルは、急速な、PCRをベースとする染色体の局在化および遺伝子、配列標識化部位 (STS)、および問題の領域内の他の非多形性および多形性マーカーの順序決定を可能とする。これは、問題の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の、直接的に比例する物理的距離の確立を包含する。

## 【0257】

遺伝子の位置の正確な知識は、下記の目的を包含する、多数の目的に有用である：1) 配列が存在するcontigの一部であるかどうかを決定し、そして追加の取り囲む遺伝的配列を種々の形態、例えば、YAC -、BAC - またはcDNAクローンで得ること；2) 同一染色体領域に対する連鎖を示す、遺伝性疾患の可能な候補の

遺伝子を準備すること；および3) 特定の遺伝子がどんな機能を有することができるかの決定を促進することができる、交差参照モデルの生物、例えば、マウス。放射線ハイブリッドマッピングを使用して、ヒト染色体16に対するzacrp5の局在化を確証した。

#### 【0258】

本発明は、また、診断的用途に使用される試薬を提供する。例えば、zacrp5遺伝子、zacrp5のDNAまたはRNAを含んでなるプローブ、またはそのサブ配列を使用して、zacrp5遺伝子が染色体4上に存在するかどうか、または突然変異が起こったかどうかを決定することができる。zacrp5遺伝子の遺伝子座における検出可能な染色体異常は下記のを包含するが、これらに限定されない：異数性、遺伝子コピー数の変化、挿入、欠失、制限部位の変化および再配列。これらの異常は、上流のプロモーターおよび調節領域を包含する、コーディング配列内、イントロン内、またはフランキング配列内で起こることがあり、そしてコーディング配列内の物理的変更または遺伝子発現レベルの変化として発現されることがある。

#### 【0259】

一般に、これらの診断法は下記の工程からなる：(a) 患者から遺伝的試料を採取し、(b) 遺伝的試料を前述のポリヌクレオチドのプローブまたはプロモーターと、ポリヌクレオチドが相補的ポリヌクレオチド配列に対してハイブリダイゼーションする条件下に、インキュベートして、第1反応生成物を生成し、そして(iii) 第1反応生成物を対照反応生成物と比較する。第1反応生成物と対照反応生成物との間の差は、患者における遺伝的異常性を示す。本発明において使用する遺伝的試料は、ゲノムDNA、cDNA、およびRNAを包含する。ポリヌクレオチドのプローブまたはプライマーはRNAまたはDNAであることができ、そして配列番号1の一部分、配列番号1の補体、またはそれらのRNA同等物を含むであろう。

#### 【0260】

これに関して適当なアッセイ法は、この分野において知られている分子遺伝的技術、例えば、制限フラグメントの長さ多形性(RFLP)の分析、PCR技術を使用する短い直列反復(STR)の分析、結合鎖反応(Barany, PCR Methods and Applications 1:1-15, 1991)、リボヌクレアーゼ保護アッセイ、およびこの分

野において知られている他の遺伝的結合分析技術を包含する（Sambrook他、前掲；Ausubel他、前掲；Marian；Chest 108：255 - 65、1995）。

#### 【0261】

リボヌクレアーゼ保護アッセイ（例えば、Ausubel他、前掲、ch. 4参照）は、RNAプローブを患者のRNA試料に対してハイブリダイゼーションさせ、次いで反応生成物（RNA - RNAハイブリッド）をRNアーゼに対して暴露することからなる。RNAのハイブリダイゼーションした領域を消化から保護する。PCRアッセイにおいて、患者の遺伝的試料を1対のポリヌクレオチドのプライマーとインキュベートし、プライマー間の領域を増幅し、回収する。回収された生成物の大きさおよび量の変化は患者における突然変異を示す。使用することができる他のPCRをベースとする技術は、一本鎖コンフォメーション多形性（SSCP）分析である（Hayashi、PCR Methods and Applications 1：34 - 8、1991）。

#### 【0262】

本発明は、また、zacrp5遺伝子の発現についての診断アッセイを実行するか、あるいはzacrp5遺伝子座を検査するためのキットを意図する。このようなキットは、核酸プローブ、例えば、配列番号1のヌクレオチド配列またはその一部分を含んでなる二本鎖核酸分子、ならびに配列番号1のヌクレオチド配列の補体またはその一部分を有する一本鎖核酸分子を含んでなる。プローブ分子はDNA、RNA、オリゴヌクレオチド、およびその他であることができる。キットはPCRを実行するために核酸プライマーを含んでなることができる。

#### 【0263】

このようなキットは、前述の核酸診断アッセイを実行するためのすべての必要な因子を含有することができる。キットはzacrp5プローブまたはプライマー対応する少なくとも1つの容器を含む。また、キットはzacrp5配列の存在を示すことができる1またはそれ以上の試薬を含む第2容器を含んでなることができる。このようなインジケータの例は、検出可能標識、例えば、放射性標識、蛍光色素、化学発光因子、およびその他を包含する。また、キットは、zacrp5プローブおよびプライマーを使用してzacrp5遺伝子の発現を検出することをユーザーに伝える手段を含むことができる。

## 【0264】

例えば、zacrp5をコードする核酸分子を検出するか、あるいはzacrp5エンコーディングヌクレオチド配列に対して相補的であるヌクレオチド配列を有する核酸分子を検出するために、同封された核酸分子を使用できることを、書かれた使用説明書により示すことができる。書かれた材料は容器に直接的に適用するか、あるいはパッケージの挿入物として提供することができる。

## 【0265】

また、(a) zacrp5核酸プローブをハイブリダイゼーション条件下に(i) 生物学的試料から単離された被験RNA分子、または(ii) 単離されたRNA分子から合成された核酸分子と接触させ、ここでプローブは本明細書において記載する核酸分子のヌクレオチド配列の一部を含んでなるヌクレオチド配列、またはその補体から成り；そして(b) 核酸プローブと被験RNA分子または合成された核酸分子とのハイブリッドの形成を検出する；ことを含み、ここでハイブリッドの存在は生物学的試料中のzacrp5 RNAの存在を示す、生物学的試料中のzacrp5遺伝子の発現の存在を検出する方法が提供される。

## 【0266】

さらに、(a) 生物学的試料を本明細書において記載する抗体、または抗体フラグメントと接触させ、ここで生物学的試料に対する抗体または抗体フラグメントの結合を可能とする条件下に接触を実施し；そして(b) 結合した抗体または結合した抗体フラグメントを検出する；ことを含む、生物学的試料中のzacrp5の存在を検出する方法が提供される。

## 【0267】

zacrp5ポリペプチドは、哺乳動物のエネルギー収支の分析において使用することができる。血清または組織の試料の中に見出されるzacrp5ポリペプチドは、食物を貯蔵する哺乳動物の能力を示し、いっそう高度に効率よい哺乳動物は肥満に向かう傾向がある。さらに詳しくは、本発明は下記の工程からなるzacrp5ポリペプチドを検出する方法を包含する：

## 【0268】

zacrp5ポリペプチドを含有する可能性がある試料を固体の支持体に結合させた

抗体に暴露し、ここで前記抗体はzacrp5ポリペプチドのエピトープに結合し；  
前記固定化された抗体 - ポリペプチドを洗浄して、非結合汚染物質を除去し；  
前記固定化された抗体 - ポリペプチドをzacrp5ポリペプチドの第2エピトープ  
に対して向けられた第2抗体に暴露し；ここで第2抗体は検出可能な標識とアソシ  
エートし；そして

検出可能な標識を検出する。被験試料中のzacrp5ポリペプチドの濃度は哺乳動物のエネルギー効率を示すように思われる。この情報は哺乳動物の栄養の分析を促進する。潜在的に、この情報はエネルギー欠乏組織の同定および/またはターゲティングにおいて有用であろう。

#### 【0269】

本発明のそれ以上の面は、インスリンを研究する方法を提供する。本発明のこのような方法は、zacrp5ポリペプチド、そのモノクローナル抗体、アゴニストまたはアンタゴニストとインスリンを含んでなる培地中で脂肪細胞インキュベートし、そして脂肪細胞のタンパク質の分泌または分化の変化を観測することからなる。

#### 【0270】

抗微生物保護因子は、直接的に作用性または間接的に作用性であることができる。このような因子は、膜のアソシエーションまたは孔の形成メカニズムを介して働き、攻撃性微生物に直接的に結合する。抗微生物因子は、また、酵素的メカニズムを介して作用して、微生物保護物質または微生物の細胞壁/膜を破壊することができる。微生物の増殖または作用を阻害するか、あるいは前述のいずれかのメカニズムにより微生物の完全性を崩壊することができる、抗微生物因子は、抗微生物活性に対して感受性である微生物による、細胞培養における汚染を防止する方法において有用である。このような技術は、有効量の前記zacrp5ポリペプチドまたはそのアゴニストまたはアンタゴニストの存在下に、細胞を培養することを含む。

#### 【0271】

また、zacrp5ポリペプチドまたはそのアゴニストを、外因的微生物の感染、例えば、細菌、ウイルスまたは菌類の感染のin vitro研究において、細胞培養試

薬として使用することができる。このような成分は、また、感染のin vivo動物モデルとして使用することができる。

本発明は、また、哺乳動物細胞の代謝を研究する方法を提供する。本発明のこのような方法は、研究すべき細胞、例えば、ヒト導管内皮細胞、 $\pm$ zacrp5ポリペプチド、そのモノクローナル抗体、アゴニストまたはアンタゴニストをインキュベートし、そして脂肪生成、グルコース新生、グリコーゲン分解、脂質生成、グルコース吸収、またはその他の変化を観測することからなる。

#### 【0272】

本発明のzacrp5ポリペプチド、フラグメント、融合タンパク質、抗体、アゴニストまたはアンタゴニストは、接着し、活性化される血小板の数および血小板凝集の大きさを減少することによって、哺乳動物の血管構造内の血流を促進する方法において使用することができる。このような目的のために、zacrp5は哺乳動物における血管の急性損傷の前、間または後に投与することができる。血管損傷は、血管の再構築のためであることができ、このような再構築は下記のを包含するが、これらに限定されない：血管形成術、冠状動脈バイパス移植、微小血管修復または血管移植片の吻口。また、外傷、卒中および動脈瘤のための血管損傷が考えられる。

#### 【0273】

他の好ましい方法において、血管損傷はプラーク破裂、血管構造の劣化、糖尿病に関連する合併症およびアテローム性動脈硬化症のためである。冠状動脈におけるプラーク破裂は心臓発作を誘導し、そして脳動脈におけるプラーク破裂は卒中を誘導する。このような方法におけるzacrp5ポリペプチド、フラグメント、融合タンパク質、抗体、アゴニストまたはアンタゴニストの使用は、また、免疫系に関連する血管構造の全系統の疾患、例えば、内転移した血管内凝固(DIC)およびSIDを改善するために有効である。

#### 【0274】

さらに、補体阻害活性は、非血管構造の免疫疾患、例えば、アテローム性動脈硬化症の治療に有効であろう。所望ならば、これに関するzacrp5ポリペプチド、フラグメント、融合タンパク質、アゴニスト、アンタゴニストまたは抗体の性能

をこれに関して機能することが知られているタンパク質、例えば、zsig37またはその他と比較することができる。さらに、zacrp5ポリペプチド、フラグメント、融合タンパク質、抗体、アゴニストまたはアンタゴニストを1またはそれ以上の血小板凝集または活性化阻害因子と組み合わせて評価して、相乗作用を同定することができる。

#### 【0275】

また、ポリペプチド、フラグメント、融合物、アゴニスト、アンタゴニストまたは抗体は急性脈管損傷の治療に有効である。急性脈管損傷は、寿命にわたって発生する慢性脈管損傷（例えば、アテローム性動脈硬化症）と対照的に、急速に（すなわち、数日～数カ月にわたって）起こる損傷である。急性脈管損傷は血管形成、動脈血管内膜切除、縮小血管切除、血管内ステントリング、血管内レーザー切除、血管移植片の吻合術またはその他を使用する外科的手順、例えば、脈管再構築からしばしば生ずる。また、例えば、血管移植または器官移植の使用に対する応答において遅延した応答として、過形成が起こることがある。

#### 【0276】

局在化虚血性心筋中のC1qの存在と冠状動脈閉塞および再灌流後の白血球の蓄積との間の相関が見出された。組織損傷後の細胞成分の解放は補体の活性化を誘発し、これにより心筋損傷の主要な原因であることがある、毒性酸素産物を生ずる（Rossen他、*Circ. Res.* 62:572-84、1998およびTenner、前掲）。補体経路のブロックは、再灌流損傷から虚血性心筋を保護することが見出された（Buerke他、*J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286:429-38、1998）。補体阻害およびC1q結合活性を有するタンパク質は、このような目的に有用であろう。

#### 【0277】

脂肪細胞補体関係タンパク質同族体、例えば、zacrp5のコラーゲンおよびC1q結合能力は、損傷したコラーゲン組織を落ち着かせ、血小板の接着、活性化または凝集、および毒性酸素生成物の解放に導く炎症プロセスの活性化を防止するために有効であろう。暴露された組織を補体活性、血栓活性および免疫活性化のようなプロセスに対して不活性とすることによって、虚血および再灌流の損傷作用を減少させる。特に、このような損傷は、外傷損傷虚血、腸窒息、および血流の

確立前および後に関連する損傷を包含するであろう。このようなポリペプチドは、心肺バイパス虚血およびリセシテーション (recesitation)、心筋梗塞および外傷後の血管痙攣、例えば、発作または経皮的経管血管形成ならびに偶発的または外科的に誘導された血管外傷の治療において有効であろう。

#### 【0278】

さらに、このようなコラーゲンおよびC1q結合性ポリペプチドは、人工生物材料および外科的装置を落ち着かせて、材料の表面を補体活性化、血栓活性または免疫活性化に対して不活性とするために有効であろう。このような材料は下記のものを含むが、これらに限定されない：コラーゲンまたはコラーゲンフラグメント被覆生物材料、ゼラチン被覆生物材料、フィブリン被覆生物材料、フィブロネクチン被覆生物材料、ヘパリン被覆生物材料、コラーゲンおよびゲル被覆ステント、動脈移植片、合成心臓弁、人工的器官または $1 \times 10^8$ より大においてzacr p5に結合する血液に暴露された人工材料の応用。このような材料の被覆はこの分野において知られている方法を使用して実施することができる、例えば、Rubens、米国特許第5,272,074号参照。

#### 【0279】

補体およびC1qは炎症においてある役割を演ずる。補体活性化はC1qを免疫グロブリンに結合することによって開始される (Johnston, *Pediatr. Infect. Dis. J.* 12 : 933 - 41, 1993 ; WardおよびGhetie, *Therap. Immunol.* 2 : 77 - 94, 1995)。C1qおよび補体のインヒビターは抗炎症剤として有効であろう。このような応用は感染を防止することができる。さらに、補体活性化およびC1qに対する免疫複合体の結合により仲介される炎症を患う個体に、このようなインヒビターを投与することができる。C1qおよび補体のインヒビターは、創傷修復を仲介し、障害された創傷治癒を克服することによって創傷治癒の進行を増強する方法において有効であろう。創傷治癒の進行は、例えば、炎症の減少、繊維芽細胞のリクルートメント、創傷の退縮および感染の減少のような要素を含む。

#### 【0280】

コラーゲンに結合する腫瘍細胞の能力は腫瘍の転移に寄与することがある。コラーゲン結合のインヒビターは、また、腫瘍の接着性相互作用および転移拡大を

仲介するために有効である (Noeske - Jungbult 他、米国特許第5,723,312号)。

#### 【0281】

さらに、zacrp5ポリペプチド、それらのフラグメント、融合物、アゴニストまたはアンタゴニストは抗菌応用のために療法上有効であろう。例えば、補体成分C1qは感染因子、例えば、細菌およびウイルスに対する宿主の防御においてある役割を演ずる。C1qはいくつかの特殊化した機能を示すことが知られている。例えば、C1qは結合した抗体またはC反応性タンパク質 (CRP) との相互作用を介して補体のカスケードを誘発する。

#### 【0282】

また、C1qはある種の細菌、RNAウイルス、マイコプラズマ、尿酸結晶、細菌のエンドトキシンの脂肪A成分およびある種の細胞内オルガネラの膜と直接的に相互作用する。C1qレセプターに対するC1qの結合は、食作用を促進すると考えられる。また、C1qは宿主防御系の抗体形成の面を増強ように思われる。例えば、下記の文献を参照のこと：Johnston, *Pediatr. Infect. Dis. J.* 12(11) : 933 - 41, 1993。こうして、可溶性C1q様分子は抗菌剤として感染因子の溶解または食作用を促進するために有効であろう。

#### 【0283】

C1qおよびマクロファージ掃去剤レセプターの正に帯電した、細胞外、三重らせんの、コラーゲンドメインはリガンドの結合においてある役割を演ずることが決定され、ポリアニオンに対して広い結合特異性を有することが示された (Acton 他、*J. Biol. Chem.* 268 : 3530 - 37, 1993)。リゾホスホリピッド成長因子 (リゾホスファチジン酸、LPA) および他のマイトジェンアニオンは損傷した組織の部位に局在化し、創傷修復を促進する。LPAは血小板の活性化およびマトリックスアセンブリーのアップレギュレーションを包含する、多数の生物学的作用を発揮する。LPAは他の血液凝固因子と相乗し、創傷治癒を仲介すると考えられる。

#### 【0284】

タンパク質、例えば、C1qおよびマクロファージ掃去剤レセプターのコラーゲンドメインは、酸性リン脂質、例えば、LPAに結合することが知られている。zac

rp5のコラーゲン反復の9マー領域、配列番号2のアミノ酸残基98~106はClqおよびマクロファージスキャベンジャーレセプター上に見出されるコラーゲンドメインと配列の相同体を共有する。zacrp5ポリペプチド、フラグメント、融合物、アゴニストまたはアンタゴニストとマイトジェンアニオン、例えば、LPAとの相互作用は、この分野において知られているアッセイを使用して測定することができる、例えば、Acton他、前掲参照。本発明のポリペプチドおよび抗体の炎症プロセスの阻害は、創傷部位における感染を予防するとき有効である。

#### 【0285】

薬学的に使用するために、本発明のタンパク質は、慣用法に従い、非経口的、経口的、経鼻的、経直腸的、局所的、経皮的投与またはその他のための薬学上許容される担体を使用して処方することができる。本発明の好ましい態様において、投与は脈管損傷部位にまたはその付近において実施される。一般に、医薬処方物はzacrp5タンパク質と、薬学上許容されるビヒクル、例えば、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、水中の5%デキストロースまたはその他との組み合わせを含むであろう。処方物は、さらに、1または2以上の賦形剤、保存剤、可溶化剤、緩衝化剤、バイアル表面上のタンパク質の損失を防止するためのアルブミン、およびその他を含むことができる。

#### 【0286】

処方法はこの分野においてよく知られており、そして、例えば、下記の文献に開示されている：The Science and Practice of Pharmacy、Gennaro、編、Mack Publishing Company、ペンシルベニア州イーストン、第19版、1995。治療的投与量は一般に承認された標準に従い、治療すべき症状の特質および重症度、患者の体質、およびその他を考慮して、臨床医により決定される。投与量の決定は当業者のレベルの範囲内である。

#### 【0287】

本明細書において使用するとき、zacrp5ポリペプチド、フラグメント、融合タンパク質、アゴニストまたはアンタゴニストの「薬学的に有効量」は所望の生物学的結果を誘導するために十分な量である。この結果は疾患の徴候、症候、または原因の軽減、あるいは生物学的系の任意の他の所望の変更であることができる

。例えば、zacrp5ポリペプチドの有効量は、臨床医または他の適格とされた観察者により認められた症候の主観的軽減または客観的同定可能な改善を提供する量である。このような有効量のzacrp5ポリペプチドは、例えば、C1qを包含する、コラーゲン活性化血小板活性化および補体経路の阻害、患者の脈管内の局在化血流の増加および虚血および再灌流の損傷的作用の減少を提供するであろう。

#### 【0288】

関節炎に関連する炎症のモジュレーションは炎症の減少および疼痛または剛直性の軽減を包含し、動物モデルにおいて、指示は関節の巨視的検査および後足の腫脹の変化から誘導される。zacrp5ポリペプチドの有効量は、治療すべき疾患または症候に依存して広く変化させることができる。投与すべきポリペプチドの量および処方物中のその濃度は、選択したベヒクル、投与経路、特定のポリペプチドの効力、患者の臨床的症状、処方物中の化合物の副作用および安定性に依存する。

#### 【0289】

したがって、臨床医は、問題の患者または同様な患者を使用する臨床的経験に依存して、処方物の中に適当な濃度を含有する適当な調製物、ならびに処方物の投与量を使用するであろう。このような量は、一部分、治療すべき特定の症状、患者の年齢、体重、および一般的健康、および当業者にとって明らかな他の因子に依存するであろう。典型的には、投与量は0.01 ~ 100mg / 被検体kgの範囲であろう。

#### 【0290】

バルーンカテーテルのような応用において、典型的な投与量の範囲は0.05 ~ 5mg / 被検体kgであろう。特定の化合物の投与量は、実験動物についての研究と組合わせたin vitroまたはex vivo研究から決定することができる。in vitroまたはex vivoにおいて有効であることが見出された化合物の濃度は動物の研究のために手引きを提供し、ここで投与量は作用部位において同様な濃度を提供するように計算される。

#### 【0291】

zacrp5ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、zacrp5活性を増加させ

るか、あるいは阻害する遺伝子治療において有用である。哺乳動物が突然変異したzacrp5遺伝子をもつか、あるいはzacrp5遺伝子をもたない場合、zacrp5遺伝子を哺乳動物の細胞の中に導入することができる。1つの態様において、zacrp5ポリペプチドをコードする遺伝子をin vivoにおいてウイルスのベクターの中に導入する。このようなベクターは、弱毒化または欠陥DNAウイルス、例えば、単純ヘルペスウイルス(HSV)、肺炎ウイルス、EBウイルス(EBV)、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス(AAV)、およびその他を包含するが、これらに限定されない。欠陥ウイルスは、ウイルス遺伝子を完全にまたはほとんど完全に欠如し、このようなウイルスは好ましい。

#### 【0292】

欠陥ウイルスは、細胞の中に導入された後、感染性ではない。欠陥ウイルスのベクターを使用すると、ベクターが他の細胞を感染することができるということを見逃して、特定の局在化区域における細胞への投与が可能となる。特定のベクターの例は下記のものを含むが、これらに限定されない：欠陥単純ヘルペスウイルス1(HSV1)のベクター(Kaplitt et al., *Molec. Cell. Neurosci.*

2:320-30, 1991)；弱毒化アデノウイルス、例えば、Stratford-Perricaud et al., *J. Clin. Invest.* 90:626-30, 1992、に記載されているベクター；および欠陥アデノ関連ウイルスのベクター(Samulski et al., *J. Virol.* 61:3096-101, 1987；Samulski et al., *J. Virol.* 63:3822-8, 1989)。

#### 【0293】

他の態様において、zacrp5遺伝子を、例えば、下記の文献に記載されているように、レトロウイルスのベクターの中に導入することができる：Anderson et al., 米国特許第5,399,346号；Mann et al., *Cell* 33:153, 1983；Temin et al., 米国特許第4,650,764号；Temin et al., 米国特許第4,980,289号；Markowitz et al., *J. Virol.* 62:1120, 1988；Temin et al., 米国特許第5,124,263号；Dougherty et al., WIPO公開No. W095/07358号；およびKuo et al., *Blood* 82:845, 1993。あるいは、ベクターはリポソームを使用するin vivoにおけるリポフェクションにより導入することができる。

## 【0294】

合成カチオン性脂質を使用して、マーカーをコードする遺伝子バンクの *in vivo* トランスフェクションのためのリポソームを調製する (Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7, 1987; Mackey et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8027-31, 1988)。外因的遺伝子を特定の器官の中に *in vivo* において導入するリポフェクションを使用すると、ある種の実際の利点を得られる。特定の細胞に対するリポソームの分子のターゲティングは、1つの範囲の利益を表す。

## 【0295】

さらに詳しくは、トランスフェクションを特定の細胞に向けることは、1つの範囲の利益を表す。例えば、特定の細胞型にトランスフェクションを向けることは、細胞の異種性を有する組織、例えば、脾臓、肝臓、腎臓、および脳において特に好都合である。脂質をターゲティングの目的で他の分子に化学的にカップリングさせることができる。ターゲッテッドペプチド (例えば、ホルモンまたは神経伝達物質)、タンパク質、例えば、抗体、または非ペプチド分子をリポソームの化学的にカップリングさせることができる。

## 【0296】

標的細胞を体から取出し、裸のDNAプラスミドとしてベクターを導入し、次いで形質転換された細胞を体の中に再移植することができる。遺伝子治療のための裸のDNAベクターを、この分野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降法、遺伝子ガンの使用またはDNAベクターのトランスポーターの使用により、所望の宿主細胞の中に導入することができる。例えば、下記の文献を参照のこと: Wu et al., J. Biol. Chem. 267:963-7, 1992; Wu et al., J. Biol. Chem. 263:14621-4, 1988。

## 【0297】

アンチセンスの方法を使用して、*zacr5* 遺伝子の転写を阻害すること、例えば、*in vivo* において細胞の増殖を阻害することができる。*zacr5* をコードするmR

NAに結合しかつこのようなmRNAの翻訳を阻害するように、zacrp5をコードするポリヌクレオチド（例えば、配列番号1に記載するポリヌクレオチド）のセグメントに対して相補的であるポリヌクレオチドを設計する。細胞培養において、または被検者において、zacrp5ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を阻害するために、このようなアンチセンスのポリヌクレオチドを使用する。

#### 【0298】

zacrp5遺伝子を発現するように操作されたトランスジェニックマウス、およびzacrp5遺伝子機能の完全な非存在を示すマウス、「ノックアウトマウス」と呼ぶ（Snouwaert et al., Science, 257:1083, 1992）を発生させることもできる（Lowell et al., Nature 366:740-42, 1993）。これらのマウスを使用して、in vivo系においてzacrp5遺伝子およびそれによりコードされるタンパク質を研究することができる。

下記の非限定的実施例により、本発明をさらに例示する。

#### 【0299】

##### 実施例1. zacrp5配列の同定

本発明の新規なzacrp5ポリペプチドエンコーディングポリヌクレオチドは、脂肪細胞補体関係タンパク質、zsig37（WO 99/04000）の相同体について検索する間に、仕上げられていないゲノム配列において最初に同定され、シグナル配列、コラーゲン様ドメインおよびC1qドメインにより特性決定された。ゲノム配列は、染色体16に由来する遺伝子座HS349E11上に位置する。配列番号7は、開始コドンにおいて開始するzacrp5の同定されたエクソン1、ヌクレオチド1~208、イントロン1、ヌクレオチド209~870および停止コドンで終わるエクソン2、ヌクレオチド871~1421を提供する。生ずる1169bpの配列を配列番号1に開示する。

#### 【0300】

種々の組織から配列番号1のポリヌクレオチドを単離するために、配列番号1および配列番号7からプローブおよび/またはプライマーを設計する。zacrp5を発現する組織をハイブリダイゼーション（ノザンプロット）または逆転写酵素（RT）PCRにより同定することができた。次いでzacrp5の発現を示すように思われる組織からライブラリーを発生させる。次いで本明細書において記載するようにプ

ローブを使用するハイブリダイゼーションおよび/またはプライマーを使用するPCRにより、このようなライブラリーから単一クローンを同定する。本明細書において提供される配列を使用して、zacrp5 cDNA配列のコンフォメーションを確認することができる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> ZymoGenetics, Inc.  
 <120> ADIPOCYTE COMPLEMENT RELATED PROTEIN HOMOLOG ZACRP5  
 <130> 99-10  
 <150> 09/321,372  
 <151> 1999-05-27  
 <160> 12  
 <170> FastSEQ for Windows Version 3.0  
 <210> 1  
 <211> 759  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(759)  
 <400> 1  
 atg gca gcc ccc gcc ctg ctg ctc cta gca ctg ctg ctg ccc gtg ggg 48  
 Met Ala Ala Pro Ala Leu Leu Leu Leu Ala Leu Leu Leu Pro Val Gly  
 1 5 10 15  
 gcc tgg ccc ggg ctg ccc agg agg ccc tgt gtg cac tgc tgc cgc ccg 96  
 Ala Trp Pro Gly Leu Pro Arg Arg Pro Cys Val His Cys Cys Arg Pro  
 20 25 30  
 gcc tgg ccc cct gga ccc tat gcc cgg gtg agt gac agg gac ctg tgg 144  
 Ala Trp Pro Pro Gly Pro Tyr Ala Arg Val Ser Asp Arg Asp Leu Trp  
 35 40 45  
 agg ggg gac ctg tgg agg ggg ctg cct cga gta cgg ccc act ata aac 192  
 Arg Gly Asp Leu Trp Arg Gly Leu Pro Arg Val Arg Pro Thr Ile Asn  
 50 55 60  
 atc gaa atc ctc aaa ggt gag aag ggt gag gcc ggc gtc cga ggt cgg 240  
 Ile Glu Ile Leu Lys Gly Glu Lys Gly Glu Ala Gly Val Arg Gly Arg  
 65 70 75 80

gcc ggc agg agc ggg aaa gag ggg ccg cca ggc gcc cgg ggc ctg cag Ala Gly Arg Ser Gly Lys Glu Gly Pro Pro Gly Ala Arg Gly Leu Gln 85 90 95	288
ggc cgc aga ggc cag aag ggg cag gtg ggg ccg ccg ggc gcc gcg tgc Gly Arg Arg Gly Gln Lys Gly Gln Val Gly Pro Pro Gly Ala Ala Cys 100 105 110	336
cga cgt gcc tac gcc gcc ttc tcc gtg ggc cgg cgc gag ggc ctg cac Arg Arg Ala Tyr Ala Ala Phe Ser Val Gly Arg Arg Glu Gly Leu His 115 120 125	384
agc tcc gac cac ttc cag gcg gtg ccc ttc gac acg gag ctg gtg aac Ser Ser Asp His Phe Gln Ala Val Pro Phe Asp Thr Glu Leu Val Asn 130 135 140	432
ctg gac ggc gcc ttc gac ctg gcc gcg ggc cgc ttc ctc tgc acg gtg Leu Asp Gly Ala Phe Asp Leu Ala Ala Gly Arg Phe Leu Cys Thr Val 145 150 155 160	480
ccc ggc gtc tac ttc ctc agc ctc aac gtg cac acc tgg aac tac aag Pro Gly Val Tyr Phe Leu Ser Leu Asn Val His Thr Trp Asn Tyr Lys 165 170 175	528
gag acc tac ctg cac atc atg ctg aac cgg cgg ccc gcg gcc gtg ctc Glu Thr Tyr Leu His Ile Met Leu Asn Arg Arg Pro Ala Ala Val Leu 180 185 190	576
tac gcg cag ccc agc gag cgc agc gtc atg cag gcc cag agc ctg atg Tyr Ala Gln Pro Ser Glu Arg Ser Val Met Gln Ala Gln Ser Leu Met 195 200 205	624
ctg ctg ctg gcg gcg ggc gac gcc gtc tgg gtg cgc atg ttc cag cgc Leu Leu Leu Ala Ala Gly Asp Ala Val Trp Val Arg Met Phe Gln Arg 210 215 220	672
gac cgg gac aac gcc atc tac ggc gag cac gga gac ctc tac atc acc Asp Arg Asp Asn Ala Ile Tyr Gly Glu His Gly Asp Leu Tyr Ile Thr 225 230 235 240	720
ttc agc ggc cac ctg gtc aag ccg gcc gcc gag ctg tag Phe Ser Gly His Leu Val Lys Pro Ala Ala Glu Leu * 245 250	759

<210> 2  
 <211> 252  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

```

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

```

<210> 3  
 <211> 281  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

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

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 244

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

Met Leu Leu Leu Gly Ala Val Leu Leu Leu Leu Ala Leu Pro Gly His





100 105 110  
 Arg Tyr Lys Gln Lys Phe Gln Ser Val Phe Thr Val Thr Arg Gln Thr  
 115 120 125  
 His Gln Pro Pro Ala Pro Asn Ser Leu Ile Arg Phe Asn Ala Val Leu  
 130 135 140  
 Thr Asn Pro Gln Gly Asp Tyr Asp Thr Ser Thr Gly Lys Phe Thr Cys  
 145 150 155 160  
 Lys Val Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Val Tyr His Ala Ser His Thr Ala  
 165 170 175  
 Asn Leu Cys Val Leu Leu Tyr Arg Ser Gly Val Lys Val Val Thr Phe  
 180 185 190  
 Cys Gly His Thr Ser Lys Thr Asn Gln Val Asn Ser Gly Gly Val Leu  
 195 200 205  
 Leu Arg Leu Gln Val Gly Glu Glu Val Trp Leu Ala Val Asn Asp Tyr  
 210 215 220  
 Tyr Asp Met Val Gly Ile Gln Gly Ser Asp Ser Val Phe Ser Gly Phe  
 225 230 235 240  
 Leu Leu Phe Pro Asp  
 245

<210> 7  
 <211> 1421  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> exon  
 <222> (1)...(208)  
 <223> Zacrp5 exon 1

<221> intron  
 <222> (209)...(870)  
 <223> Zacrp5 intron 1

<221> exon  
 <222> (871)...(1421)  
 <223> Zacrp5 exon 2

<400> 7

atggcagccc cgcacctgt gctcctagca ctgctgctgc ccgtgggggc ctggcccggg 60  
 ctgcccagga ggccctgtgt gcaactgctgc cgcccggcct ggccccctgg accctatgcc 120  
 cgggtgagtg acaggacct gtggaggggg gacctgtgga gggggctgcc tcgagtacgg 180  
 cccactataa acatcgaat cctcaaagg gaggccctg ggtgctgcct gcatgctccc 240  
 ccaccaggac ccaacagccc acagggagtg gggagcacct ggggcttggg aggaggggcg 300  
 ggaggggcac tctgagcacc agtgtctgcc ctggcagcgc tccctgcaca gggaccctg 360

```

ggctccccc gcaagcagga agaagcctgg cttggggagg gacccatgaa ccaaagtggg 420
gtgctgagga tcttggggaa gggggccagg gttcctgaga tccccaaagt agcagcccct 480
tgggaaggga gcctgggcag cccgcttgct ctgagacccc ttgacacggc tgcgctgtcc 540
cgaagctgta ctaaggtag gcttgggtag gaccttccca gccttctcat tctttaacac 600
ccaacgcaga ccgtagctgg cctgaccac ccatgtcccc accctctcgg tggggacggc 660
cttgccacag gccttggctc agccacacct ttggagaacg gcttctcccc atcttacaga 720
cgtggacgcg gagactggga gaggggccgt cacttgcaaa gagtgtgtcc ttacagtgac 780
cctttagccc cagcccctgg cctgggtgct ggaatggggg aggcctgccc agcccggccc 840
cgacccgtgg ctttcgtttg tcccctgcag gtgagaaggg tgaggccggc gtccgaggtc 900
gggccggcag gagcgggaaa gaggggcccg caggcccccg gggcctgcag ggcgcagag 960
gccagaaggg gcaggtgggg ccgcccggcg ccgctgtccg acgtgctac gccgccttct 1020
ccgtgggccc gcgcgagggc ctgcacagct ccgaccactt ccaggcgggtg cccttcgaca 1080
cggagctggt gaacctggac ggcgccttcg acctggcccg gggccgcttc ctctgcacgg 1140
tgcccggcgt ctacttctc agcctcaacg tgcacacctg gaactacaag gagacctacc 1200
tgcacatcat gctgaaccgg cggcccggcg ccgtgctcta cgcgcagccc agcgcagcga 1260
gcgtcatgca ggcccagagc ctgatgctgc tgetggcggc gggcgaagccc gtctgggtgc 1320
gcatgttcca gcgcgaccgg gacaacgcca tctacggcga gcacggagac ctctacatca 1380
ccttcagcgg ccacctggtc aagccggccc ccgagctgta g 1421

```

<210> 8

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> C1q aromatic motif

<221> VARIANT

<222> (2)...(6)

<223> Each Xaa is independently any amino acid residue

<221> VARIANT

<222> (7)...(7)

<223> Xaa is asparagine or aspartic acid

<221> VARIANT

<222> (8)...(11)

<223> Each Xaa is independently any amino acid residue

<221> VARIANT

<222> (12)...(12)

<223> Xaa is phenylalanine, tyrosine, tryptophan or  
leucine

<221> VARIANT

<222> (13)...(18)

<223> Each Xaa is independently any amino acid residue

<221> VARIANT

<222> (20)...(24)

<223> Each Xaa is independently any amino acid residue

<221> VARIANT

<222> (26)...(26)

<223> Xaa is any amino acid residue

<221> VARIANT

<222> (28)...(28)

<223> Xaa is any amino acid residue

<221> VARIANT

<222> (30)...(30)

<223> Xaa is any amino acid residue

<221> VARIANT

<222> (31)...(31)

<223> Xaa is phenylalanine or tyrosine

<400> 8

Phe	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1			5					10					15		
Xaa	Xaa	Phe	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Gly	Xaa	Tyr	Xaa	Phe	Xaa	Xaa	
		20						25					30		

<210> 9

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Degenerate oligonucleotide primer

<221> variation

<222> (1)...(17)

<223> Each N is independently A, T, G or C

<400> 9

msggnntnt aytwytt

17

<210> 10

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

<220>  
 <223> Degenerate oligonucleotide sequence

<221> variation  
 <222> (1)...(17)  
 <223> Each N is independently A, T, G or C

<400> 10  
 srnganvvng tntggbt 17

<210> 11  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Degenerate oligonucleotide primer

<221> variation  
 <222> (1)...(17)  
 <223> Each N is independently A, T, G or C

<400> 11  
 rynttywsng gnywyyt 17

<210> 12  
 <211> 756  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Degenerate nucleotide sequence encoding the  
 polypeptide of SEQ ID NO:2

<221> variation  
 <222> (1)...(756)  
 <223> Each N is independently T, A, G or C

<400> 12  
 atggcngcnc cngcnytnyt nytnyngcn ytnytnytc cngtnggngc ntggccnggn 60  
 ytnccnmgnm gncntgygt ncaytytgy mgncngcnt ggccnccngg nccntaygcn 120

mgngt.nwsng	aymgngayyt	ntggmgnggn	gayytnrggm	gnggnytncc	nmngntnmgn	180
ccnacnatha	ayathgarat	hytnaarggn	garaarggng	argcngnggt	nmngngnmgn	240
gcnggnmgw	snggnaarga	rgnccnccn	ggngcnmgng	gnytnargg	nmgnmgnggn	300
caraarggnc	argtnggnc	nccngngcn	gcntgymgnm	gngcntaygc	ngcnttywsn	360
gtnggnmgm	gngarggnyt	ncaywsnwsn	gaycayttyc	argcngtncc	nttygayacn	420
garytngtna	ayytngaygg	ngcnttygay	ytngcngcng	gmgnttyyt	ntgyacngtn	480
ccngngtnt	ayttytnws	nytnaaygtn	cayacntgga	aytayaarga	racntayyt	540
cayathatgy	tnaaymgng	nccngcngcn	gtnyntayg	cncarccrws	ngarmgnwsn	600
gtnatgcarg	cncarwsnyt	natgytnyt	ytngcngcng	gngaycngt	ntgggtnmgn	660
atgttycarm	gngaymgnga	yaaygcnath	tayggngarc	ayggngayyt	ntayathacn	720
ttywsnggnc	ayytngtnaa	rccngcngcn	garytn			756

## 【図面の簡単な説明】

### 【図1】

この図面は、本発明のzacrp5ポリペプチドおよび脂肪細胞補体関係タンパク質相同体zsig37（配列番号3、WO 99/04000）、ヒトACRP30（ACR3\_\_HUMAN）（配列番号4、Maeda他、Biochem. Biophys. Res. Commun. 221:286-9、1996）、脂肪細胞補体関係タンパク質相同体zsig39（配列番号3、WO 99/10492）およびヒトClq C（配列番号6、Sellar他、Biochem. J. 274:481-90、1991およびReid、Biochem. J. 179:361-71、1979）の多重整列を図解する。デフォルト設定を有するClustalx多重整列ツールを使用して、多重整列を実行した：プロサムエクステンションマトリックス、ギャップオープニングペナルティー：10.0、ギャップエクステンションペナルティー：0.05。同一性百分率を計算する前に、多重整列をさらに手で同調させた。

## 【図1】

```

HUZSIG37  MGSRGQGLLLAYCLLLAFASG-----LVL SRVPHVQGEQQEWEGT ; 40
zacrp5     MAAPALLLLALLLPVGA-----WPGLPRRP----- ; 25
ACR3_HUMAN MLLLGAVLLLLALP-----GHDQETTTQGGVLLPLPK ; 33
HUZSIG39   MRPLLVL LLLGLAAG-----SPPLDDNKIPSLCP----- ; 29
C1QC_HUMAN MDVGPSSLPHLGLKLLLLLLLLLALRGQA---NTGCY----- ; 33

HUZSIG37   EELPSPPDHAERAEEQHEKYRPSQDQGLPASRCLRCCDPGTSMPATAV- ; 89
zacrp5     -----CVHCCRPAPWPPGPYARVS ; 43
ACR3_HUMAN GACTGWMA----- ; 41
HUZSIG39   ----- ; 29
C1QC_HUMAN ----- ; 33

HUZSIG37   -----PQINITILK----- ; 98
zacrp5     DRDLWRGDLWRGLPRVRPTINIEILK----- ; 69
ACR3_HUMAN -----GIPGHPGHN ; 50
HUZSIG39   -----GHPGLPGTPGHH ; 41
C1QC_HUMAN -----GIPGMPGLPGAPGKGDYDGLPGPK ; 57

HUZSIG37   -----GEKDRGDRGLOGKYGKTGSAGARGHTGPKGQKGS ; 133
zacrp5     -----GEKGEAGVRGRAGRSKGEPPGARGLQGRRGQKQKQ ; 104
ACR3_HUMAN GAPGRDGRDGTPEKGEKGDPLIGPKGDIGETGVPGAEGPRGFPGIQGR ; 100
HUZSIG39   GSQGLPGRDGRDGRDGPAPGAPGKGEGRPGPLPGPRGDPGPRGEAGPAGP ; 91
C1QC_HUMAN GEPGIPAIPGIRGPKGQKGEPLGHPGKNGPMGPPGMPGVPGMGIPE ; 107

HUZSIG37   MGAPGERCKSHYAAFSVGRKKPMHNSHYYQTVIFDTEFVNLYDHFNMFTG ; 183
zacrp5     VGPPGAACRRAYAASFVGRREGLHSSDHFQAVPFDELVNLDGAFDLAAG ; 154
ACR3_HUMAN KGEPGEGAYVYRSAFVS--LETYVTIPNMPIRFTKIFYNQNHYDGTG ; 148
HUZSIG39   TGPAGECSVPPRSAFSAKRSESRVPPSPDAPLPFDRVLVNEQGHYDAVTG ; 141
C1QC_HUMAN PGEEGRYKQKQFSVFTVTR-QTHQPPAPNSLIRFNAVL TNPQGDYDTSTG ; 156

HUZSIG37   KFYCYVPGLYFFSLNVHTWNQKETYLHIMKNEEEVVILFAQVG--DRSIM ; 231
zacrp5     RFLCTVPGVYFSLNVHTWNKETYLHIMLNRRPAAVLYAQPS--ERSVM ; 202
ACR3_HUMAN KFHCNIPGLYFYFAYHITVY-MKDVKVSFLKDKAMLFTYDQYQ--ENNVD ; 195
HUZSIG39   KFTCQVPGVYFVAVHATVY-RASLQFDLVKNGESIASFFQFFGGWPKPAS ; 190
C1QC_HUMAN KFTCKVPGLYFYFVHASHT--ANLCVLLYRSGVKVVTFCGHTS--KTNQV ; 202

HUZSIG37   QSQ-SLMLELREQDQVWRLYK-GERENAI FSEELDTYITFSGYLVKHAT ; 279
zacrp5     QAQ-SLMLLAAGDAVWVRMFQ-RDRDNAIYGEHGDLYITFSGHLVKPAA ; 250
ACR3_HUMAN QASGSVLLHLEVGDQVWLQVYGEGER-NGLYADN-DNDSTFTGFLLYHDT ; 243
HUZSIG39   LSG-GAMVRLPEPDQVWVQGV-GDY-IGIYASI-KTDSTFSGFLVYSDW ; 236
C1QC_HUMAN NSG-GVLLRLQVGEEVWLAVNDYYDM-VGIQGS-----SVFSGFLLPD- ; 245

HUZSIG37   EP----- ; 281
zacrp5     EL----- ; 252
ACR3_HUMAN N----- ; 244
HUZSIG39   HSSPVFA ; 243
C1QC_HUMAN ----- ; 245

```

FIG. 1

## 【國際調查報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		National Application No PCT/US 00/13608	
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>			
IPC 7	C12N15/12 A61K38/17	C07K14/47 G01N33/68	C12N15/62 C07K16/18 C12Q1/68
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC			
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>			
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K			
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched			
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, STRAND, BIOSIS			
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>			
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages		Relevant to claim No.
X	C. BAGGULEY ET AL: "CpG island; HTG; somatostatin receptor; SSTR5 " EMBL DATABASE ENTRY HS349E11, ACCESSION NUMBER AL031713, 23 September 1998 (1998-09-23), XP002144671 abstract "100% identity in 553 nt overlap with seq ID no.1"		37
A	WO 99 04000 A (ZYMOGENETICS INC) 28 January 1999 (1999-01-28) cited in the application The whole document especially Sequence ID no.2 and sequence ID no.23 page 10, the claims.		1-58
<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 doubts 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. *&* document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search  11 August 2000		Date of mailing of the international search report  23/08/2000	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5918 Patentsaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Le Cornec, N	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 00/13608

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 39429 A (WHITEHEAD BIOMEDICAL INST ;SCHERER PHILIPP E (US); LODISH HARVEY F) 12 December 1996 (1996-12-12) cited in the application claims; figures 1,2 ---	1-58
A	MAEDA K ET AL: "cDNA CLONING AND EXPRESSION OF A NOVEL ADIPOSE SPECIFIC COLLAGEN- LIKE FACTOR, APM1 (ADIPOSE MOST ABUNDANT GENE TRANSCRIPT)" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS,US,ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, vol. 221, 1 April 1996 (1996-04-01), pages 286-289, XP000612064 ISSN: 0006-291X cited in the application the whole document ---	1-58
X,P	DOE JOINT GENOME INSTITUTE: "Sequencing of human chromosome 16" EMBL DATABASE ENTRY AC009041, ACCESSION NUMBER AC009041, 4 August 1999 (1999-08-04), XP002144672 abstract -----	37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/US 00/13608

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9904000 A	28-01-1999	AU 8411398 A EP 1002075 A NO 20000215 A	10-02-1999 24-05-2000 17-03-2000
WO 9639429 A	12-12-1996	US 5869330 A	09-02-1999



Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 BA80 CA02  
CA04 CA09 DA05 DA06 DA12  
EA02 GA05 GA11 HA04 HA08  
HA12

4B063 QA00 QA01 QA13 QA19 QQ02  
QQ43 QQ79 QR08 QR14 QR24  
QR31 QR32 QR33 QR40 QR42  
QR50 QR55 QR56 QR58 QR59  
QR62 QR66 QR72 QS25 QS34  
QX02

4B064 AG01 AG26 AG27 CA02 CA06  
CA10 CA19 CC24 DA03 DA13

4B065 AA77X AA80X AA90X AA93Y  
AB01 CA23 CA24 CA25 CA44  
CA46

4C084 AA02 AA06 AA07 BA02 BA22  
CA18 CA36 CA53 DC50 NA14  
ZA362 ZA452 ZC352

4C085 AA13 AA14 BB11 CC03 CC05  
DD22 DD33

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10  
BA41 BA54 CA40 DA76 EA20  
EA28 FA72 FA74

专利名称(译)	脂肪细胞补体相关蛋白同源物zacr p 5		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003501027A</a>	公开(公告)日	2003-01-14
申请号	JP2001500756	申请日	2000-05-18
[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	ピディントンクリストファーエス シェパードポールオー		
发明人	ピディントン, クリストファー エス. シェパード, ポール オー.		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/395 A61P3/10 A61P9/00 A61P9/10 C07K14/47 C07K14/78 C07K16/18 C07K16/42 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/02 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/566		
CPC分类号	C07K14/47 A61K38/00 C07K2319/00 C12N2799/026		
FI分类号	A61K39/395.D A61K39/395.N A61P3/10 A61P9/00 A61P9/10 A61P9/10.101 C07K14/78 C07K16/18 C07K16/42 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12P21/08 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.C C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/EA02 4B024/GA05 4B024/GA11 4B024/HA04 4B024/HA08 4B024/HA12 4B063/QA00 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ43 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR14 4B063/QR24 4B063/QR31 4B063/QR32 4B063/QR33 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063/QR56 4B063/QR58 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QR72 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA03 4B064/DA13 4B065/AA77X 4B065/AA80X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/CA23 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/BA02 4C084/BA22 4C084/CA18 4C084/CA36 4C084/CA53 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA362 4C084/ZA452 4C084/ZC352 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC03 4C085/CC05 4C085/DD22 4C085/DD33 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/BA54 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA28 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	09/321372 1999-05-27 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及zacr p5的多核苷酸和多肽分子, zacr p5是支持胶原样和Clq结构域的蛋白质家族的新成员。多肽和编码它们的多核苷酸已经涉及均一和异源三聚或寡聚, 可用于它们的研究。本发明还包括针对zacr p5多肽的抗体。

	zsig37	zacrps5	zacrps0	zsig39	Clq C
zsig37	100.0	48.0	27.9	24.7	20.0
zacrps5	48.0	100.0	25.0	25.5	21.2
zacrps0	27.9	25.0	100.0	35.4	33.2
zsig39	24.7	25.5	35.4	100.0	32.9
Clq C	20.0	21.2	33.2	32.9	100.0