

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3842647号
(P3842647)

(45) 発行日 平成18年11月8日(2006.11.8)

(24) 登録日 平成18年8月18日(2006.8.18)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	
A 6 1 K 31/711 (2006.01)	A 6 1 K 31/711	
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
請求項の数 39 (全 113 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2001-543599 (P2001-543599)	(73) 特許権者	500203709
(86) (22) 出願日	平成12年12月4日(2000.12.4)		アムジェン インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2003-518371 (P2003-518371A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 913
(43) 公表日	平成15年6月10日(2003.6.10)		20, サウザンド オークス, ワン
(86) 国際出願番号	PCT/US2000/032940		アムジェン センター ドライブ
(87) 国際公開番号	W02001/042304	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成13年6月14日(2001.6.14)		弁理士 山本 秀策
審査請求日	平成14年6月6日(2002.6.6)	(74) 代理人	100062409
(31) 優先権主張番号	60/170,191		弁理士 安村 高明
(32) 優先日	平成11年12月10日(1999.12.10)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国(US)		弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	60/188,053	(72) 発明者	サリス, クリスティアーン エム.
(32) 優先日	平成12年3月9日(2000.3.9)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 913
(33) 優先権主張国	米国(US)		20, ニューベリー パーク, コロネ
			ット プレイス 4027
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インターロイキン-1レセプターアンタゴニスト関連分子およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

単離された核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号35のいずれかに示されるヌクレオチド配列；

(b) A T C C 受託番号 P T A-1423 中の D N A インサートのヌクレオチド配列；

(c) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

(d) (a)～(c)のいずれかの相補体に、中程度または高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、該ヌクレオチド配列は(a)～(c)のいずれかのヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドの機能を有するポリペプチドをコードし、該機能は、サイトカイン含量および／または応答を調節することである、ヌクレオチド配列；および

(e) (a)～(c)のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、
からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項2】

請求項1に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項3】

請求項2に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項4】

真核生物細胞である、請求項 3 に記載の宿主細胞。

【請求項 5】

原核生物細胞である、請求項 3 に記載の宿主細胞。

【請求項 6】

I L - 1 r a - R ポリペプチドを産生するためのプロセスであって、該ポリペプチドを発現するために適切な条件下で請求項 3 に記載の宿主細胞を培養する工程、および必要に応じて、該培養物から該ポリペプチドを単離する工程を包含する、プロセス。

【請求項 7】

請求項 6 に記載のプロセスによって産生される、ポリペプチド。

【請求項 8】

請求項 6 に記載のプロセスであって、ここで、前記核酸分子が、I L - 1 r a - R ポリペプチドをコードする DNA に作動可能に連結された、ネイティブな I L - 1 r a - R ポリペプチドに対するプロモーター DNA 以外のプロモーター DNA を含む、プロセス。

【請求項 9】

化合物が I L - 1 r a - R ポリペプチド活性または I L - 1 r a - R ポリペプチド産生を阻害するか否かを決定するためのプロセスであって、請求項 3、請求項 4 または請求項 5 のいずれかに記載の細胞を該化合物に曝露する工程、および該細胞における I L - 1 r a - R ポリペプチド活性または I L - 1 r a - R ポリペプチド産生を測定する工程を包含する、プロセス。

【請求項 10】

単離されたポリペプチドであって、以下：

(a) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、または配列番号 36 のいずれかに示されるアミノ酸配列；および

(b) A T C C 受託番号 P T A - 1 4 2 3 中の DNA インサートによってコードされるアミノ酸配列、
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 11】

請求項 1 に記載の核酸分子によってコードされる単離されたポリペプチドであって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、または配列番号 36 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、単離されたポリペプチド。

【請求項 12】

請求項 10 に記載のポリペプチドに特異的に結合する、抗体またはそのフラグメント。

【請求項 13】

配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、または配列番号 36 のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはそのフラグメントに特異的に結合する、請求項 12 に記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項 14】

ヒト化抗体である、請求項 12 に記載の抗体。

【請求項 15】

ヒト抗体またはそのフラグメントである、請求項 12 に記載の抗体。

【請求項 16】

ポリクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項 12 に記載の抗体。

【請求項 17】

モノクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項 12 に記載の抗体。

【請求項 18】

キメラ抗体またはそのフラグメントである、請求項 12 に記載の抗体。

【請求項 19】

C D R 移植抗体またはそのフラグメントである、請求項 12 に記載の抗体。

【請求項 20】

抗イディオタイプ抗体またはそのフラグメントである、請求項 12 に記載の抗体。

10

20

30

40

50

【請求項 2 1】

可変領域フラグメントである、請求項 1 2 に記載の抗体。

【請求項 2 2】

前記可変領域フラグメントが F a b フラグメントまたは F a b ' フラグメントである、請求項 2 1 に記載の抗体。

【請求項 2 3】

配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、または配列番号 3 6 のいずれかのアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異性を有する少なくとも 1 つの相補性決定領域を含む、抗体またはそのフラグメント。

【請求項 2 4】

検出可能標識に結合される、請求項 1 2 に記載の抗体。

10

【請求項 2 5】

I L - 1 r a - R ポリペプチドの生物学的活性を拮抗する、請求項 1 2 に記載の抗体。

【請求項 2 6】

配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、または配列番号 3 6 のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドで非ヒト動物を免疫することによって産生される、抗体。

【請求項 2 7】

請求項 1 に記載のポリペプチドを結合し得る抗体を産生する、ハイブリドーマ。

【請求項 2 8】

請求項 1 2 に記載の抗 I L - 1 r a - R 抗体またはフラグメントを用いて、I L - 1 r a - R ポリペプチドの量を検出または定量する方法。

20

【請求項 2 9】

請求項 1 0 に記載のポリペプチドの誘導体を含む、ポリペプチドであって、該ポリペプチドは、水溶性ポリマーを用いて共有結合により改変されている、ポリペプチド。

【請求項 3 0】

請求項 2 9 に記載のポリペプチドであって、ここで、前記水溶性ポリマーが、ポリエチレングリコール、モノメトキシポリエチレングリコール、デキストラン、セルロース、ポリ（N-ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール、およびポリビニルアルコールからなる群より選択される、ポリペプチド。

30

【請求項 3 1】

請求項 1 に記載の核酸分子を含む、ウイルスベクター。

【請求項 3 2】

異種アミノ酸配列に融合された、請求項 1 0 に記載のポリペプチドを含む、融合ポリペプチド。

【請求項 3 3】

前記異種アミノ酸配列が、I g G 定常ドメインまたはそのフラグメントである、請求項 3 2 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 3 4】

被験体における病的状態または病的状態に対する感受性に関して、I L - 1 r a - R ポリペプチドを検出するキットであって、該キットは、以下：

40

(a) サンプル中の、請求項 1 0 に記載のポリペプチド、または請求項 1 に記載の核酸によってコードされるポリペプチドに結合する I L - 1 r a - R ポリペプチド選択的結合因子；および

(b) 使用方法を示す指示書、
を備える、キット。

【請求項 3 5】

デバイスであって、以下：

(a) 移植に適した膜；および

(b) 該膜内にカプセル化された細胞であって、該細胞は、請求項 1 0 に記載のタンパ

50

ク質を分泌する、細胞；
を備え、

該膜は、該タンパク質に対して透過性であり、そして該細胞に有害な物質に対して不透過性である、デバイス。

【請求項 36】

IL-1ra-Rポリペプチドに結合する化合物を同定する方法であって、以下：

(a) 請求項 10 に記載のポリペプチドを、化合物と接触させる工程；および

(b) 該化合物に対する該 IL-1ra-R ポリペプチドの結合の程度を決定する工程

、

を包含する、方法。

10

【請求項 37】

前記化合物に結合した場合に、前記ポリペプチドの活性を決定する工程をさらに包含する、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

請求項 1 に記載の核酸分子を含む、トランスジェニック非ヒト哺乳動物であって、該トランスジェニック非ヒト哺乳動物は、マウス、ラット、ウサギ、ヤギおよびヒツジからなる群より選択される、トランスジェニック非ヒト哺乳動物。

【請求項 39】

化合物が IL-1ra-R ポリペプチド活性または IL-1ra-R ポリペプチド産生を阻害するか否かを決定するためのプロセスであって、請求項 38 に記載のトランスジェニック哺乳動物を該化合物に曝露する工程、および該哺乳動物における IL-1ra-R ポリペプチド活性または IL-1ra-R ポリペプチド産生を測定する工程を包含する、プロセス。

20

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、新規インターロイキン-1レセプターアンタゴニスト関連 (IL-1ra-R) ポリペプチドおよびこれをコードする核酸分子に関する。本発明はまた、IL-1ra-R ポリペプチドを産生するための、選択的結合因子、ベクター、宿主細胞および方法に関する。本発明はさらに、IL-1ra-R ポリペプチドと関連する疾患、障害、および状態の、診断、処置、改善、および／または予防のための薬学的組成物および方法に関する。

30

【0002】

(発明の背景)

核酸分子の同定、クローニング、発現、および操作における技術進歩ならびにヒトゲノムの解読は、新規治療因子の発見を大きく加速した。現在、高速核酸配列決定技術は、前例のない速度で配列情報を作製し得、そしてコンピュータ分析と結合されて、ゲノムの一部および全体への重複配列の集合ならびにポリペプチドコード領域の同定を可能にする。既知アミノ酸配列のデータベース編集物に対する推定アミノ酸配列の比較は、以前に同定された配列および／または構造の目印に対して相同性の程度を決定することを可能にする。核酸分子のポリペプチドコード領域のクローニングおよび発現は、構造分析および機能分析のためのポリペプチド産物を提供する。核酸分子およびコードされるポリペプチドの操作は、治療剤としての使用に関して生成物に対して有利な特性を与え得る。

40

【0003】

過去 10 年間にわたるゲノム研究における有意な技術進歩にも関わらず、ヒトゲノムに基づく新規治療剤の開発に対する可能性は、未だ広く理解されていない。潜在的に有利なポリペプチド治療剤をコードする多くの遺伝子またはこれらがコードするポリペプチド（これらは、治療分子に対して「標的」としてはたらき得る）は、未だ同定されていない。

【0004】

従って、診断的な利点または治療的な利点を有する、新規ポリペプチドおよびこれらをコ

50

ードする核酸分子を同定することが、本発明の目的である。

【0005】

これまでに発見された最も強力な炎症性サイトカインのうちの1つは、インターロイキン-1 (IL-1) である。IL-1 は、多くの疾患および医学状態に関与すると考えられている。IL-1 は、マクロファージ/単球系統の細胞によって (排他的にはないが) 産生され、そして2つの形態: IL-1 アルファ (IL-1 α) および IL-1 ベータ (IL-1 β) で産生され得る。インターロイキン-1 レセプターアンタゴニスト (IL-1 r a) は、インターロイキン-1 の天然のインヒビターとして作用するヒトタンパク質である。

【0006】

(発明の要旨)

本発明は、新規 IL-1 r a-R の核酸分子およびコードされるポリペプチドに関する。

【0007】

本発明は、単離された核酸分子であって、以下:

(a) 配列番号 (SEQ ID NO:) 1、配列番号3、配列番号5、または配列番号35のいずれかに示されるヌクレオチド配列;

(b) ATCC 受託番号 PTA-1423 中の DNA インサートのヌクレオチド配列;

(c) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列;

(d) (a) ~ (c) のいずれかの相補体に、中程度または高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列; および

(e) (a) ~ (c) のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、

からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子を提供する。

【0008】

本発明はまた、単離された核酸分子であって、以下:

(a) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに示されるポリペプチドに少なくとも約70%同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、上記コードされたポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列;

(b) 配列番号1、配列番号3、配列番号5、もしくは配列番号35のいずれかに示されるヌクレオチド配列、ATCC 受託番号 PTA-1423 中の DNA インサートのヌクレオチド配列、または (a) の、対立遺伝子改変体またはスプライス改変体をコードするヌクレオチド配列;

(c) 少なくとも約25アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号1、配列番号3、配列番号5、もしくは配列番号35のいずれかのヌクレオチド配列、ATCC 受託番号 PTA-1423 中の DNA インサート、(a) または (b) の領域であって、ここで、上記ポリペプチドフラグメントは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、もしくは配列番号36のいずれかに示されるコードされたポリペプチドの活性を有するか、または抗原性である、領域;

(d) 少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む、配列番号1、配列番号3、配列番号5、もしくは配列番号35のいずれかのヌクレオチド配列、ATCC 受託番号 PTA-1423 中の DNA インサート、または (a) ~ (c) のいずれかの領域;

(e) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で、(a) ~ (d) のいずれかの相補体にハイブリダイズする、ヌクレオチド配列; ならびに

(f) (a) ~ (d) のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、

からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子を提供する。

【0009】

本発明はさらに、単離された核酸分子であって、以下:

(a) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号2、配列番号4、配列番号

10

20

30

40

50

6、または配列番号36のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、上記コードされたポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、上記コードされたポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、上記コードされたポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

10

(d) C末端短縮および／またはN末端短縮を有する配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、上記コードされたポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮、およびN末端短縮からなる群より選択される少なくとも1つの改変を有する配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、上記コードされたポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

20

(f) 少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む(a)～(e)のいずれかのヌクレオチド配列；

(g) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で、(a)～(f)のいずれかの相補体にハイブリダイズする、ヌクレオチド配列；ならびに

(h) (a)～(e)のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、
からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子を提供する。

30

【0010】

本発明は、単離されたポリペプチドであって、以下：

(a) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに示されるアミノ酸配列；および

(b) ATCC受託番号PTA-1423中のDNAインサートによってコードされるアミノ酸配列、

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドを提供する。

【0011】

本発明はまた、単離されたポリペプチドであって、以下：

40

(a) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかのオルソログ(ortholog)に対するアミノ酸配列；

(b) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかのアミノ酸配列に少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列であって、ここで、上記ポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 少なくとも約25アミノ酸残基を含む配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに示されるアミノ酸配列のフラグメントであって、ここで、上記フラグメントは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有するか、または抗原性である、フラグメント；なら

50

びに

(d) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、もしくは配列番号 36 のいずれかに示されるアミノ酸配列、A T C C 受託番号 P T A - 1 4 2 3 中の D N A インサートによってコードされるアミノ酸配列、(a)、または (b) の、対立遺伝子改変体またはスプライス改変体のアミノ酸配列、

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドを提供する。

【0012】

本発明はさらに、単離されたポリペプチドであって、以下：

(a) 少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、または配列番号 36 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、上記ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、または配列番号 36 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

10

(b) 少なくとも 1 つのアミノ酸挿入を有する配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、または配列番号 36 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、上記ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、または配列番号 36 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 少なくとも 1 つのアミノ酸欠失を有する配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、または配列番号 36 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、上記ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、または配列番号 36 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

20

(d) C 末端短縮および／または N 末端短縮を有する配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、または配列番号 36 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、上記ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、または配列番号 36 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；ならびに

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C 末端短縮、および N 末端短縮からなる群より選択される少なくとも 1 つの改変を有する配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、または配列番号 36 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、上記ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、または配列番号 36 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列、

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドを提供する。

30

【0013】

本発明はなおさらに、単離されたポリペプチドであって、以下：

2 位のアルギニン；3 位のアラニン、リジン、またはアルギニン；7 位のセリン；8 位のリジン；9 位のアラニン、システイン、リジン、トレオニン、またはセリン；10 位のシステインまたはフェニルアラニン；13 位のアルギニンまたはトリプトファン；15 位のセリン；18 位のアルギニン；19 位のセリンまたはトレオニン；21 位のトレオニン；23 位のセリン；34 位のアルギニン；37 位のチロシン、セリン、またはアルギニン；38 位のリジン、アルギニン、トレオニン、またはセリン；41 位のトレオニン；43 位のセリン、フェニルアラニン、またはアラニン；44 位のアラニン；48 位のセリンまたはリジン；52 位のアラニン、トレオニン、またはフェニルアラニン；53 位のセリン；54 位のセリン；58 位のアラニンまたはチロシン；65 位のリジン；66 位のフェニルアラニン；67 位のチロシン；69 位のセリン、チロシン、またはフェニルアラニン；73 位のリジンまたはセリン；78 位のトレオニンまたはアルギニン；90 位のセリンまたはアラニン；91 位のアラニン；96 位のセリン；97 位のリジンまたはアルギニン；98 位のリジンまたはセリン；100 位のアラニン；102 位のチロシン；104 位のアルギニンまたはアラニン；105 位のリジン；106 位のトレオニン；108 位のアルギニン；109 位のリジン、トレオニン、またはトリプトファン；110 位のトレオニンまたはセリン；111 位のセリン；114 位のセリン；116 位のセリン；117 位のフェニルアラニン、システイン、またはチロシン；121 位のチロシン；123 位のセリンまたはアラニン；126 位のシステイン、セリン、またはトレオニン；136 位のセリン；1

40

50

38位のフェニルアラニンまたはアルギニン；141位のトレオニン、アルギニン、またはアラニン；142位のリジンまたはチロシン；143位のトリプトファンまたはトレオニン；145位のアラニン；147位のトレオニンまたはセリン；151位のシステイン；および152位のセリン、システイン、またはフェニルアラニンからなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸置換を有する配列番号1または配列番号3のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドであって、ここで、上記ポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、単離されたポリペプチドを提供する。

【0014】

本発明はなおさらに、単離されたポリペプチドであって、以下：

21位のアルギニン；22位のアラニン、リジン、またはアルギニン；26位のセリン；27位のリジン；28位のアラニン、システイン、リジン、トレオニン、またはセリン；29位のシステインまたはフェニルアラニン；32位のアルギニンまたはトリプトファン；34位のセリン；37位のアルギニン；38位のセリンまたはトレオニン；40位のトレオニン；42位のセリン；53位のアルギニン；56位のチロシン、セリン、またはアルギニン；57位のリジン、アルギニン、トレオニン、またはセリン；60位のトレオニン；62位のセリン、フェニルアラニン、またはアラニン；63位のアラニン；67位のセリンまたはリジン；71位のアラニン、トレオニン、またはフェニルアラニン；72位のセリン；73位のセリン；77位のアラニンまたはチロシン；84位のリジン；85位のフェニルアラニン；86位のチロシン；88位のセリン、チロシン、またはフェニルアラニン；92位のリジンまたはセリン；97位のトレオニンまたはアルギニン；109位のセリンまたはアラニン；110位のアラニン；115位のセリン；116位のリジンまたはアルギニン；117位のリジンまたはセリン；119位のアラニン；121位のチロシン；123位のアルギニンまたはアラニン；124位のリジン；125位のトレオニン；127位のアルギニン；128位のリジン、トレオニン、またはトリプトファン；129位のトレオニンまたはセリン；130位のセリン；133位のセリン；135位のセリン；136位のフェニルアラニン、システイン、またはチロシン；140位のチロシン；142位のセリンまたはアラニン；145位のシステイン、セリン、またはトレオニン；155位のセリン；157位のフェニルアラニンまたはアルギニン；160位のトレオニン、アルギニン、またはアラニン；161位のリジンまたはチロシン；162位のトリプトファンまたはトレオニン；164位のアラニン；166位のトレオニンまたはセリン；170位のシステイン；および171位のセリン、システイン、またはフェニルアラニンからなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸置換を有する配列番号5に示されるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドであって、ここで、上記ポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、単離されたポリペプチドを提供する。

【0015】

IL-1ra-Rアミノ酸配列を含む融合ポリペプチドがまた、提供される。

【0016】

本発明はまた、本明細書中に示されるような単離された核酸分子を含む発現ベクター、本明細書中に示されるような組換え核酸分子を含む組換え宿主細胞、およびIL-1ra-Rポリペプチドを産生する方法を提供し、この方法は、この宿主細胞を培養する工程、必要に応じてそのように産生されたポリペプチドを単離する工程を包含する。

【0017】

IL-1ra-Rポリペプチドをコードする核酸分子を含むトランスジェニック非ヒト動物がまた、本発明に含まれる。IL-1ra-R核酸分子は、IL-1ra-Rポリペプチドの発現およびIL-1ra-Rポリペプチドの増加したレベル（これは、増加した循環レベルを含み得る）を可能にする様式で、動物中に導入される。あるいは、IL-1ra-R核酸分子は、内因性IL-1ra-Rポリペプチドの発現を阻害する様式で動物に導入される（すなわち、IL-1ra-Rポリペプチド遺伝子ノックアウトを保有するト

10

20

30

40

50

ランスジェニック動物を作製する)。トランスジェニック非ヒト動物は、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくはげっ歯類(例えば、ラットまたはマウス)である。

【0018】

本発明のIL-1ra-Rポリペプチドの誘導体がまた、提供される。

【0019】

本発明のIL-1ra-Rポリペプチドに特異的に結合し得る選択的結合因子(例えば、抗体およびペプチド)が、さらに提供される。このような抗体およびペプチドは、アゴニストのものであってもアンタゴニストのものであってもよい。

【0020】

本発明のヌクレオチド、ポリペプチド、もしくは選択的結合因子ならびに1つ以上の薬学的に受容可能な処方剤を含む薬学的組成物がまた、本発明によって含まれる。薬学的組成物は、治療有効量の本発明のヌクレオチドまたはポリペプチドを提供するために使用される。本発明はまた、このポリペプチド、核酸分子、および選択的結合因子を使用する方法に関する。

10

【0021】

本発明のIL-1ra-RポリペプチドおよびIL-1ra-R核酸分子は、疾患および障害(本明細書中に列挙されるものを含む)を処置、予防、改善、および/または検出するための使用され得る。

【0022】

本発明はまた、IL-1ra-Rポリペプチドに結合する試験分子を同定するために、試験分子をアッセイする方法を提供する。この方法は、IL-1ra-Rポリペプチドを試験分子と接触させて、この試験分子のこのポリペプチドに対する結合の程度を決定する工程を包含する。この方法はさらに、このような試験分子が、IL-1ra-Rポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストであるか否かを決定する工程を包含する。本発明はさらに、IL-1ra-Rポリペプチドの発現またはIL-1ra-Rポリペプチドの活性に対する分子の影響を試験する方法を提供する。

20

【0023】

IL-1ra-Rポリペプチドの発現を調整する方法およびIL-1ra-Rポリペプチドのレベルを調節する(すなわち、レベルを増加するか、またはレベルを減少する)方法がまた、本発明によって含まれる。1つの方法は、IL-1ra-Rポリペプチドをコードする核酸分子を動物に投与する工程を包含する。別の方法において、IL-1ra-Rポリペプチドの発現を調整または調節するエレメントを含む核酸分子が、投与され得る。これらの方法の例としては、本明細書中にさらに記載されるように、遺伝子治療、細胞治療、およびアンチセンス治療が挙げられる。

30

【0024】

本発明の別の局面において、IL-1ra-Rポリペプチドは、そのレセプター(「IL-1ra-Rポリペプチドレセプター」)を同定するために使用され得る。種々の形態の「発現クローニング」は、タンパク質リガンドに対するレセプターをクローン化するために広範囲に使用されている。例えば、SimonsenおよびLodish、1994、Trends Pharmacol. Sci. 15:437-41ならびにTartagliaら、1995、Cell 83:1263-71を参照のこと。IL-1ra-Rポリペプチドレセプターの単離は、IL-1ra-Rポリペプチドシグナル伝達経路の新規アゴニストおよびアンタゴニストの同定または開発に有用である。このようなアゴニストおよびアンタゴニストとしては、可溶性IL-1ra-Rポリペプチドレセプター、抗IL-1ra-Rポリペプチドレセプター-選択的結合因子(例えば、抗体およびその誘導体)、小分子、およびアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられ、これらのうちのいずれかは、1つ以上の疾患または障害(本明細書中に開示されるものを含む)の処置に有用であり得る。

40

【0025】

(発明の詳細な説明)

50

本明細書中で使用される節の表題は、構成の目的のみのためであり、そして記載される内容を限定するようには解釈されるべきではない。本願において引用される全ての参考文献は、明確に本明細書中に参考として援用される。

【0026】

(定義)

用語「IL-1ra-R遺伝子」または「IL-1ra-R核酸分子」あるいは「IL-1ra-Rポリヌクレオチド」とは、配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号35のいずれかに示されるヌクレオチド配列、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、ATCC受託番号PTA-1423におけるDNAインサートのヌクレオチド配列、および本明細書中で定義される核酸分子を含むか、またはこれらからなる核酸分子をいう。

10

【0027】

用語「IL-1ra-Rポリペプチド対立遺伝子改変体」とは、生物体または生物体の集団の染色体の所定の遺伝子座を占める遺伝子の、天然に存在する可能ないくつかの代替的な形態のうちの1つをいう。

【0028】

用語「IL-1ra-Rポリペプチドスプライス改変体」とは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに示されるIL-1ra-Rポリペプチドアミノ酸配列のRNA転写物中のイントロン配列の選択的プロセッシングによって生成される、核酸分子（通常はRNA）をいう。

20

【0029】

用語「単離された核酸分子」とは、(1) 総核酸が供給源細胞から単離される場合に、これが天然で一緒に見出されるタンパク質、脂質、炭水化物、または他の物質のうち少なくとも約50パーセントから分離された本発明の核酸分子か、(2) 「単離された核酸分子」が天然で連結しているポリヌクレオチドの全てまたは一部に連結していない本発明の核酸分子か、(3) 天然では連結しないポリヌクレオチドに作動可能に連結した本発明の核酸分子か、あるいは(4) より大きなポリヌクレオチド配列の一部として天然には存在しない、本発明の核酸分子をいう。好ましくは、本発明の単離された核酸分子は、任意の他の混入核酸分子、または天然の環境において見出される他の混入物（これらは、ポリペプチド産生における使用、または治療的使用、診断的使用、予防的使用、または研究的使用を妨げる）を実質的に含まない。

30

【0030】

用語「核酸配列」または「核酸分子」は、DNAまたはRNA配列をいう。この用語は、DNAおよびRNAの公知の塩基アナログのいずれかから形成される分子を含み、例えば、以下であるがこれらに限定されない：4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシー-N6-メチルアデノシン、アジリジニル-シトシン、プソイドイソシトシン (pseudoisocytosine)、5-(カルボキシヒドロキシルメチル) ウラシル、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルアデニン、1-メチルプソイドウラシル、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2, 2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノ-メチル-2-チオウラシル、β-D-マンノシルキューオシン、5'-メトキシカルボニル-メチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、オキシブトキソシン、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、N-ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、および2, 6-ジアミノプリン。

40

50

【0031】

用語「ベクター」は、宿主細胞にコード情報を移すために使用される任意の分子（例えば、核酸、プラスミド、またはウイルス）をいうように使用される。

【0032】

用語「発現ベクター」は、宿主細胞の形質転換に適切であり、そして挿入された異種核酸配列の発現を、指向および／または制御する核酸配列を含むベクターをいう。発現としては、転写、翻訳、およびRNAスプライシング（イントロンが存在する場合）のようなプロセスが挙げられるがこれらに限定されない。

【0033】

用語「作動可能に連結された」は、本明細書中で、隣接配列の配置をいうように使用され、ここで、このように記載される隣接配列は、その通常の機能を行うように配置またはアセンブルされる。従って、コード配列に作動可能に連結した隣接配列は、このコード配列の複製、転写および／または翻訳を行うことが可能であり得る。例えば、コード配列は、このプロモーターがコード配列の転写を指向し得る場合に、プロモーターに作動可能に連結されている。隣接配列は、これが正確に機能する限り、コード配列と連続する必要はない。したがって、例えば、介在する、翻訳されないが、なお転写される配列が、プロモーター配列とコード配列との間に存在し得、そしてこのプロモーター配列は、依然としてこのコード配列に「作動可能に連結」されているとみなされ得る。

10

【0034】

用語「宿主細胞」は、核酸配列で形質転換されたか、または形質転換され得、次いで目的の選択された遺伝子を発現し得る細胞をいうように使用される。この用語には、選択された遺伝子が存在する限り、子孫が形態学または遺伝子構造において本来の親と同一であろうとなかろうと、親細胞の子孫を含む。

20

【0035】

用語「IL-1ra-Rポリペプチド」とは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド、および関連するポリペプチドをいう。関連ポリペプチドとしては、IL-1ra-Rポリペプチドフラグメント、IL-1ra-Rポリペプチドオルソログ、IL-1ra-Rポリペプチド改変体、およびIL-1ra-Rポリペプチド誘導体が挙げられ、これらは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに示されるポリペプチドの少なくとも1つの活性を保有する。IL-1ra-Rポリペプチドは、本明細書中で定義される成熟ポリペプチドであり得、そしてこれらが調製される方法に依存して、アミノ末端メチオニン残基を有しても有さなくてもよい。

30

【0036】

用語「IL-1ra-Rポリペプチドフラグメント」とは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに示されるポリペプチドの、アミノ末端（リーダー配列を有するかまたは有さない）での短縮化および／またはカルボキシ末端での短縮化を含むポリペプチドをいう。用語「IL-1ra-Rポリペプチドフラグメント」はまた、IL-1ra-Rポリペプチドオルソログ、IL-1ra-Rポリペプチド誘導体、またはIL-1ra-Rポリペプチド改変体のアミノ末端および／またはカルボキシ末端短縮化、あるいはIL-1ra-Rポリペプチド対立遺伝子改変体またはIL-1ra-Rポリペプチドスプライス改変体によってコードされるポリペプチドのアミノ末端および／またはカルボキシ末端短縮化をいう。IL-1ra-Rポリペプチドフラグメントは、選択的RNAスプライシング、またはインビボプロテアーゼ活性から生じ得る。IL-1ra-Rポリペプチドの膜結合形態もまた、本発明によって意図される。好ましい実施形態において、短縮化および／または欠失は、約10アミノ酸、または約20アミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約100より多くのアミノ酸を含む。このように生成されるポリペプチドフラグメントは、約25個連続したアミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約125アミノ酸を含む。このようなIL-1ra-Rポリペプチドフラ

40

50

グメントは、必要に応じて、アミノ末端メチオニン残基を含み得る。このようなフラグメントは、例えば、IL-1ra-Rポリペプチドに対する抗体を生成するために使用され得ることが理解される。

【0037】

用語「IL-1ra-Rポリペプチドオルソログ」は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに示されるIL-1ra-Rポリペプチドアミノ酸配列に対応する、別の種由来のポリペプチドをいう。例えば、マウスおよびヒトのIL-1ra-Rポリペプチドは、互いにオルソログであるとみなされる。

【0038】

用語「IL-1ra-Rポリペプチド改変」は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに示されるIL-1ra-Rポリペプチドアミノ酸配列（リーダー配列を有するかまたは有さない）と比較して、1つ以上のアミノ酸配列の置換、欠失（例えば、内部欠失および／またはIL-1ra-Rポリペプチドフラグメント）、および／または付加（例えば、内部付加および／またはIL-1ra-R融合ポリペプチド）を有するアミノ酸配列を含むIL-1ra-Rポリペプチドをいう。改変体は、天然に存在する（例えば、IL-1ra-Rポリペプチド対立遺伝子改変体、IL-1ra-Rポリペプチドオルソログ、およびIL-1ra-Rポリペプチドスプライス改変体）か、または、人工的に構築され得る。このようなIL-1ra-Rポリペプチド改変体は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号35のいずれかに示されるDNA配列から変化するDNA配列を有する、対応する核酸分子から調製され得る。好ましい実施形態において、この改変体は、1～3、または1～5、または1～10、または1～15、または1～20、または1～25、または1～50、または1～75、または1～100、または100より多くのアミノ酸の置換、挿入、付加、および／または欠失を有し、ここで、この置換は、保存的、または非保存的、あるいはその任意の組み合わせであり得る。

【0039】

用語「IL-1ra-Rポリペプチド誘導体」は、本明細書中で定義されるような、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに示されるポリペプチド、IL-1ra-Rポリペプチドフラグメント、IL-1ra-Rポリペプチドオルソログ、またはIL-1ra-Rポリペプチド改変体をいい、これらは、化学的に改変されている。用語「IL-1ra-Rポリペプチド誘導体」はまた、本明細書中で定義されるようなIL-1ra-Rポリペプチド対立遺伝子改変体またはIL-1ra-Rポリペプチドスプライス改変体によってコードされるポリペプチドをいい、これは化学的に改変されている。

【0040】

用語「成熟IL-1ra-Rポリペプチド」は、リーダー配列を欠失したIL-1ra-Rポリペプチドをいう。成熟IL-1ra-Rポリペプチドはまた、他の改変（例えば、アミノ末端（リーダー配列を有するかまたは有さない）および／またはカルボキシ末端のタンパク質分解性プロセッシング、より大きな前駆体からのより小さなポリペプチドの切断、N連結および／またはO連結グリコシル化など）を含み得る。

【0041】

用語「IL-1ra-R融合ポリペプチド」は、本明細書中で定義されるような、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに示されるポリペプチド、IL-1ra-Rポリペプチドフラグメント、IL-1ra-Rポリペプチドオルソログ、IL-1ra-Rポリペプチド改変体、またはIL-1ra-R誘導体のアミノ末端またはカルボキシ末端での、1つ以上のアミノ酸の融合（例えば、異種タンパク質またはペプチド）をいう。用語「IL-1ra-R融合ポリペプチド」はまた、本明細書中で定義されるようなIL-1ra-Rポリペプチド対立遺伝子改変体またはIL-1ra-Rポリペプチドスプライス改変体によってコードされるポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端での、1つ以上のアミノ酸の融合をいう。

【0042】

用語「生物学的に活性な I L - 1 r a - R ポリペプチド」とは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、または配列番号 36 のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドの、少なくとも 1 つの活性特徴を有する I L - 1 r a - R ポリペプチドをいう。さらに、I L - 1 r a - R ポリペプチドは、免疫原としての活性を有し得る；すなわち、この I L - 1 r a - R ポリペプチドは、抗体が惹起され得る少なくとも 1 つのエピトープを含む。

【0043】

用語「単離されたポリペプチド」とは、(1) 供給源細胞から単離される場合に、天然と一緒に見出されるポリペプチド、脂質、炭水化物、または他の物質の少なくとも約 50 % から分離された本発明のポリペプチド、(2) 「単離されたポリペプチド」が天然で連結するポリペプチドの全てまたは一部に（共有結合的または非共有結合的相互作用によって）連結しない、本発明のポリペプチド、(3) 天然には連結しないポリペプチドに作動可能に（共有結合的または非共有結合的相互作用によって）連結する、本発明のポリペプチド、または(4) 天然には存在しない本発明のポリペプチドをいう。好ましくは、この単離されたポリペプチドは、任意の他の混入ポリペプチドまたは天然の環境において見出される他の混入物（これは、その治療的使用、診断的使用、予防的使用、または研究的使用に干渉する）を実質的に含まない。

【0044】

用語「同一性」とは、当該分野で公知のように、配列の比較によって決定される、2 つ以上のポリペプチド分子または 2 つ以上の核酸分子の配列間の関係をいう。当該分野において、「同一性」はまた、場合に応じて、2 つ以上のヌクレオチドまたは 2 つ以上のアミノ酸配列文字列の間の一致によって決定されるように、核酸分子の間またはポリペプチドの間の配列関連性の程度を意味する。「同一性」は、2 つ以上の配列のうち小さなものと、特定の数理的モデルまたはコンピュータプログラム（すなわち、「アルゴリズム」）によって焦点をあてられたギャップ整列（存在する場合）との間の一致の同一パーセントを評価する。

【0045】

用語「類似性」は、概念に関するが、「同一性」とは対照的に、「類似性」は、同一的一致および保存的置換の一致の両方を含む関連性の基準をいう。2 つのポリペプチド配列が、例えば 10 / 20 個同一のアミノ酸を有し、そして残りが全て非保存的置換である場合、同一性パーセントおよび類似性は、どちらも 50 % である。同じ例において、保存的置換であるさらに 5 つの位置が存在する場合、同一性パーセントは 50 % のままであるが、類似性パーセントは 75 % (15 / 20) である。したがって、保存的置換が存在する場合、2 つのポリペプチド間の類似性パーセントは、これらの 2 つのポリペプチド間の同一性パーセントよりも高い。

【0046】

用語「天然に存在する」または「ネイティブの」は、核酸分子、ポリペプチド、宿主細胞などのような生物学的材料と関連して使用される場合、天然において見出され、そしてヒトによって操作されていない材料をいう。同様に、「天然に存在しない」または「ネイティブではない」は、本明細書中で使用される場合、天然で見出されないか、またはヒトによって構造的に改変もしくは合成された材料をいう。

【0047】

用語「有効量」および「治療有効量」は、各々、本明細書中に示される I L - 1 r a - R ポリペプチドの 1 つ以上の生物学的活性の観察可能なレベルを支持するために使用される I L - 1 r a - R ポリペプチドまたは I L - 1 r a - R 核酸分子の量をいう。

【0048】

用語「薬学的に受容可能なキャリア」または「生理学的に受容可能なキャリア」は、本明細書中で使用される場合、薬学的組成物としての I L - 1 r a - R ポリペプチド、I L - 1 r a - R 核酸分子、または I L - 1 r a - R 選択的結合因子の送達の達成または増強に適切な 1 つ以上の処方材料をいう。

10

20

30

40

50

【0049】

用語「抗原」とは、選択的結合因子（例えば、抗体）により結合され得、そしてさらに動物において使用されて、その抗原のエピトープに結合し得る抗体を産生し得る分子または分子の一部をいう。抗原は、1つ以上のエピトープを有し得る。

【0050】

用語「選択的結合因子」とは、IL-1 α -Rポリペプチドに特異性を有する分子（単数または複数）をいう。本明細書中で使用される場合、用語「特異的」および「特異性」とは、選択的結合因子が、ヒトIL-1 α -Rポリペプチドに結合し、かつ非ヒトIL-1 α -Rポリペプチドに結合しない能力をいう。しかし、選択的結合因子がまた、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに記載されるようなポリペプチドのオルソログ（すなわち、その種間変形（例えば、マウスIL-1 α -RポリペプチドおよびラットIL-1 α -Rポリペプチド））に結合し得ることが、理解される。

10

【0051】

用語「形質導入」を用いて、通常はファージによる1つの細菌から別の細菌への遺伝子の伝達をいう。「形質導入」はまた、レトロウイルスによる真核生物細胞配列の獲得および伝達をいう。

【0052】

用語「トランスフェクション」は、細胞による異種または外因性DNAの取り込みをいうために使用され、そして細胞は、外因性DNAが細胞膜内に導入された場合には「トランスフェクトされ」ている。多数のトランスフェクション技術が、当該分野で周知であり、そして本明細書中に開示される。例えば、Grahamら、1973, *Virology* 52:456; Sambrookら、*Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratories, 1989); Davisら、*Basic Methods in Molecular Biology* (Elsevier, 1986); and Chuら、1981, *Gene* 13:197を参照のこと。このような技術を使用して、1つ以上の外因性DNA部分を適切な宿主細胞に導入し得る。

20

【0053】

本明細書中で使用される場合、用語「形質転換」とは、細胞の遺伝的特徴における変化をいい、そして細胞は、新しいDNAを含有するように改変された場合に形質転換されている。例えば、細胞は、それがそのネイティブな状態から遺伝的に改変される場合に形質転換される。トランスフェクションまたは形質導入に続いて、DNAの形質転換は、物理的に細胞の染色体に組み込むことにより細胞のDNAと組換わり得るか、複製されることなしにエピソードエレメントとして一時的に維持され得るか、またはプラスミドとして独立的に複製され得る。DNAが細胞分裂と共に複製される場合に、細胞は、安定に形質転換されたものとみなされる。

30

【0054】

（核酸分子および／またはポリペプチドの関連性）

関連した核酸分子が、配列番号1、配列番号3、配列番号5または配列番号35のいずれかの核酸分子の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体を包含すること、および上記のヌクレオチド配列のいずれかに相補的である配列を包含することが理解される。関連した核酸分子はまた、配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号36のいずれかにおけるポリペプチドと比較して1以上のアミノ酸残基の置換、改変、付加および／または欠失を含むかまたは本質的にこれらなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を包含する。このような関連したIL-1 α -Rポリペプチドは、例えば、1以上のN結合型もしくはO結合型のグリコシル化部位の付加および／もしくは欠失、または1以上のシステイン残基の付加および／もしくは欠失を含み得る。

40

【0055】

関連した核酸分子はまた、配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号36のい

50

ずれかの I L - 1 r a - R ポリペプチドの少なくとも約 25 個連続したアミノ酸、または少なくとも約 50 個のアミノ酸、または少なくとも約 75 個のアミノ酸、または少なくとも約 100 個のアミノ酸、または少なくとも約 125 個のアミノ酸、または 125 個より多くのアミノ酸残基のポリペプチドをコードする、I L - 1 r a - R 核酸分子のフラグメントを包含する。

【0056】

さらに、関連した I L - 1 r a - R 核酸分子はまた、本明細書中で定義したとおりの中程度または高度にストリンジェントな条件下で、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5 もしくは配列番号 35 のいずれかの I L - 1 r a - R 核酸分子またはポリペプチドをコードする分子の十分に相補的な配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む分子を包含し、このポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6 もしくは配列番号 36、または本明細書中に定義したとおりの核酸フラグメント、または本明細書中に定義したとおりのポリペプチドをコードする核酸フラグメントのいずれかに示されるアミノ酸配列を含む。ハイブリダイゼーションプローブは、本明細書中に提供される I L - 1 r a - R 配列を用いて c D N A、ゲノム D N A ライブラリーまたは合成 D N A ライブラリーに関連した配列についてスクリーニングして調製され得る。I L - 1 r a - R ポリペプチドの D N A 配列および／またはアミノ酸配列のうちの、既知配列に対して顕著な同一性を示す領域は、本明細書中に記載されるとおりの配列アラインメントアルゴリズムを用いて容易に決定され、そしてこれらの領域を用いて、スクリーニングのためのプローブを設計し得る。

【0057】

用語「高度にストリンジェントな条件」とは、配列が非常に相補的である D N A 鎖のハイブリダイゼーションを許容し、かつ顕著に不一致の D N A のハイブリダイゼーションを排除するように設計された条件をいう。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、温度、イオン強度および変性剤（例えば、ホルムアミド）の濃度によって主に決定される。ハイブリダイゼーションおよび洗浄についての「高度にストリンジェントな条件」の例は、65～68℃での 0.015M 塩化ナトリウム、0.0015M クエン酸ナトリウムまたは 42℃での 0.015M 塩化ナトリウム、0.0015M クエン酸ナトリウムおよび 50% ホルムアミドである。Sambrook, Fritsch および Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989); Anderson ら, Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach 第 4 章 (IRL Press Limited) を参照のこと。

【0058】

よりストリンジェントな条件（例えば、より高い温度、より低いイオン強度、より高いホルムアミドまたは他の変性剤）もまた用いられ得るが、ハイブリダイゼーションの速度が影響される。他の薬剤は、非特異的および／またはバックグラウンドのハイブリダイゼーションを減少させる目的のために、ハイブリダイゼーションおよび洗浄の緩衝液中に含まれ得る。例は、0.1% ウシ血清アルブミン、0.1% ポリビニルピロリドン、0.1% ピロリン酸ナトリウム、0.1% ドデシル硫酸ナトリウム、NaDodSO₄、(SDS)、ficoll、デンハルト溶液、超音波処理サケ精子 D N A（または別の非相補的 D N A）および硫酸デキストランであるが、他の適切な薬剤もまた用いられ得る。これらの添加剤の濃度および種類は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに実質的に影響を与えることなく変更され得る。ハイブリダイゼーション実験は通常、pH 6.8～7.4 で実施される；しかし、代表的なイオン強度の条件では、ハイブリダイゼーションの速度は、pH からほぼ独立する。Anderson ら, Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach 第 4 章 (IRL Press Limited) を参照のこと。

【0059】

D N A 二重鎖の安定性に影響を与える因子としては、塩基組成、長さおよび塩基対の不一

10

20

30

40

50

致程度が挙げられる。ハイブリダイゼーション条件は、これらの変動要因を適応させ、そして異なる配列関連性のDNAがハイブリッドを形成するのを可能にするために当業者によって調整され得る。完全に一致したDNA二重鎖の融解温度は、以下の方程式によって評価され得る：

$$T_m (\text{°C}) = 81.5 + 16.6 (\log [Na^+]) + 0.41 (G+C\%) - 600 / N - 0.72 (\% \text{ホルムアミド})$$

ここで、Nは、形成される二重鎖の長さであり、 $[Na^+]$ は、ハイブリダイゼーション溶液または洗浄溶液中でのナトリウムイオンのモル濃度であり、 $G+C\%$ は、ハイブリッド中での（グアニン＋シトシン）塩基の百分率である。不完全に一致したハイブリッドについては、融解温度は、1%の不一致毎に約1℃下げられる。

10

【0060】

用語「中程度にストリンジェントな条件」とは、「高度にストリンジェントな条件」下で生じ得るよりも高い程度の塩基対不一致を有するDNA二重鎖が形成され得る条件をいう。代表的な「中程度にストリンジェントな条件」の例は、50～65℃での0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウムまたは37～50℃での0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウムおよび20%ホルムアミドである。例示として、0.015Mナトリウムイオン中での50℃という「中程度にストリンジェントな条件」は、約21%の不一致を可能にする。

【0061】

「高度にストリンジェントな条件」と「中程度にストリンジェントな条件」との間に絶対的な区別が存在しないことが当業者によって認識される。例えば、0.015Mナトリウムイオン（ホルムアミドなし）では、完全に一致した長さのDNAの融解温度は、約71℃である。65℃で（同じイオン強度で）の洗浄を用いると、約6%の不一致が可能になる。より関連性の遠い配列を捕獲するために、当業者は、単純に、温度を低くし得るかまたはイオン強度を高くし得る。

20

【0062】

約20ntまでのオリゴヌクレオチドプローブについての1M NaCl^{*} 中での融解温度の良好な評価は、以下によって与えられる：

$$T_m = A-T \text{ 塩基対あたり } 2^\circ\text{C} + G-C \text{ 塩基対あたり } 4^\circ\text{C}$$

^{*} 6×塩クエン酸ナトリウム（SSC）中でのナトリウムイオン濃度は、1Mである。Suggsら, Developmental Biology Using Purified Genes 683（BrownおよびFox編, 1981）を参照のこと。

30

【0063】

オリゴヌクレオチドについての高度ストリンジェンシー洗浄条件は通常、6×SSC、0.1% SDS中でのそのオリゴヌクレオチドの T_m よりも0℃～5℃低い温度においてである。

【0064】

別の実施形態では、関連した核酸分子は、配列番号1、配列番号3、配列番号5もしくは配列番号35のいずれかに示されるとおりのヌクレオチド配列に対して少なくとも約70パーセント同一であるヌクレオチド配列を含むかもしくはこれからなるか、または配列番号2、配列番号4、配列番号6もしくは配列番号36のいずれかに示すとおりのポリペプチドに対して少なくとも約70パーセント同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかもしくは本質的にこれからなる。好ましい実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、もしくは配列番号35のいずれかに示されるとおりのヌクレオチド配列に対して約75パーセント、もしくは約80パーセント、もしくは約85パーセント、もしくは約90パーセント、もしくは約95、96、97、98、もしくは99パーセント同一であるか、またはヌクレオチド配列は、配列番号2、配列番号4、配列番号6もしくは配列番号36のいずれかに示されるとおりのポリペプチド配列に対して約75パーセント、もしくは約80パーセント、もしくは約85パーセント、もしくは約90パーセント、もしくは約95、96、97、98、もしくは99パー

40

50

セント同一であるポリペプチドをコードする。関連した核酸分子は、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6 または配列番号 36 のいずれかに示されるポリペプチドの少なくとも 1 つの活性を保有するポリペプチドをコードする。

【0065】

核酸配列における相違は、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6 または配列番号 36 のいずれかのアミノ酸配列と比較して、アミノ酸配列の保存的改変および／または非保存的改変をもたらし得る。

【0066】

配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6 または配列番号 36 のいずれかのアミノ酸配列に対する保存的改変（およびコードするヌクレオチドに対する、対応する改変）は、I L-1 r a-R ポリペプチドの機能的特徴および化学的特徴と類似の機能的特徴および化学的特徴を有するポリペプチドを生じる。対照的に、I L-1 r a-R ポリペプチドの機能的特徴および／または化学的特徴における実質的な改変は、以下を維持することに対するその影響が顕著に異なる、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6 または配列番号 36 のいずれかのアミノ酸配列における置換を選択することによって達成され得る：（a）例えば、シートコンホメーションもしくはヘリックスコンホメーションのような、置換領域における分子骨格の構造、（b）標的部位での分子の電荷もしくは疎水性、または（c）側鎖のかさ。

【0067】

例えば、「保存的アミノ酸置換」は、その位置でのアミノ酸残基の極性にも電荷にもほとんど影響がないかまたは全く影響がないような、非ネイティブ残基によるネイティブなアミノ酸残基の置換を含み得る。さらに、ポリペプチド中の任意のネイティブな残基はまた、「アラニンスキャニング変異誘発」について以前に記載されたように、アラニンによって置換され得る。

【0068】

保存的アミノ酸置換はまた、生物学的系における合成によるよりむしろ、化学的なペプチド合成によって代表的に組み込まれる、天然には存在しないアミノ酸残基を含む。これらとしては、ペプチド模倣物、およびアミノ酸部分の他の逆転形態または反転形態が挙げられる。

【0069】

天然に存在する残基は、共通の側鎖特性に基づいて、複数のクラスに分割され得る：

- 1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- 2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr；
- 3) 酸性：Asp、Glu；
- 4) 塩基性：Asn、Gln、His、Lys、Arg；
- 5) 鎖の配向に影響を与える残基：Gly、Pro；および
- 6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

【0070】

例えば、非保存的置換は、これらのクラスのうちの 1 つのメンバーの、別のクラス由来のメンバーに対する交換を包含し得る。このような置換された残基は、非ヒト I L-1 r a-R ポリペプチドと相同なヒト I L-1 r a-R ポリペプチドの領域またはこの分子の非相同領域に導入され得る。

【0071】

このような変化を行う際に、アミノ酸のヒドロパシー指数が考慮され得る。各アミノ酸は、その疎水性特性および電荷特性に基づいて、ヒドロパシー指数を割り当てられている。ヒドロパシー指数は、以下である：イソロイシン（+4.5）；バリン（+4.2）；ロイシン（+3.8）；フェニルアラニン（+2.8）；システイン／シスチン（+2.5）；メチオニン（+1.9）；アラニン（+1.8）；グリシン（-0.4）；スレオニン（-0.7）；セリン（-0.8）；トリプトファン（-0.9）；チロシン（-1.3）；プロリン（-1.6）；ヒスチジン（-3.2）；グルタミン酸（-3.5）；グ

10

20

30

40

50

ルタミン（－３．５）；アスパラギン酸（－３．５）；アスパラギン（－３．５）；リジン（－３．９）；およびアルギニン（－４．５）。

【００７２】

タンパク質に対する相互作用的な生物学的機能を確認する際の、ヒドロパシーアミノ酸指数の重要性は、当該分野において一般的に理解されている（K y t eら、１９８２，J．M o l．B i o l．１５７：１０５－３１）。特定のアミノ酸が、類似のヒドロパシー指数またはスコアを有する他のアミノ酸に代えて置換され得、そして依然として類似の生物学的活性を維持し得ることが、公知である。ヒドロパシー指数に基づいて変化を起こす際に、ヒドロパシー指数が±２以内であるアミノ酸の置換が好ましく、±１以内であるものが特に好ましく、そして±０．５以内であるものが、なおより特に好ましい。

10

【００７３】

類似のアミノ酸の置換が親水性に基づいて効果的になされ得る（特に、これによって作製された生物学的機能的に等価なタンパク質またはペプチドが、この場合においてと同様に、免疫学的実施形態における使用に関して考慮される場合）こともまた、当該分野において理解されている。タンパク質の最も大きな局所的平均親水性は、その隣接するアミノ酸の親水性によって支配される場合に、その免疫原性および抗原性、すなわち、そのタンパク質の生物学的特性に相関する。

【００７４】

以下の親水性の値が、これらのアミノ酸残基に割り当てられた：アルギニン（＋３．０）；リジン（＋３．０）；アスパラギン酸（＋３．０±１）；グルタミン酸（＋３．０±１）；セリン（＋０．３）；アスパラギン（＋０．２）；グルタミン（＋０．２）；グリシン（０）；スレオニン（－０．４）；プロリン（－０．５±１）；アラニン（－０．５）；ヒスチジン（－０．５）；システイン（－１．０）；メチオニン（－１．３）；バリン（－１．５）；ロイシン（－１．８）；イソロイシン（－１．８）；チロシン（－２．３）；フェニルアラニン（－２．５）；およびトリプトファン（－３．４）。類似の親水性の値に基づいて変化を行う際に、親水性値が±２以内であるアミノ酸の置換が好ましく、±１以内であるものが特に好ましく、そして±０．５以内であるものが、なおより特に好ましい。一次アミノ酸配列から、エピトープをまた、親水性に基づいて同定し得る。これらの領域はまた、「エピトープコア領域」と呼ばれる。

20

【００７５】

所望のアミノ酸置換（保存的であれ非保存的であれ）は、当業者によって、このような置換が所望される時点で決定され得る。例えば、アミノ酸置換を使用して、I L－l r a－R ポリペプチドの重要な残基を同定し得るか、または本明細書中に記載される I L－l r a－R ポリペプチドの親和性を増加もしくは減少させ得る。例示的なアミノ酸置換は、表 I に記載される。

30

【００７６】

【表１】

表 I
アミノ酸置換

もとの残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu	Norleucine, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 ジアミノ酸、 Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu

当業者は、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、または配列番号 36 のいずれかに記載のポリペプチドの適切な改変体を、周知の技術を使用して、決定し得る。生物学的活性を破壊することなく変化され得る分子の適切な領域を同定するために、当業者は、活性のために重要であるとは考えられない領域を標的化し得る。例えば、同じ種由来かまたは他の種由来の、類似の活性を有する類似のポリペプチドが既知である場合には、当業者は、IL-1ra-R ポリペプチドのアミノ酸配列を、このような類似のポリペプチドと比較し得る。このような比較を用いて、類似のポリペプチド間で保存される分子の残基および部分を同定し得る。このような類似のポリペプチドに対して保存されていない、IL-1ra-R 分子の領域における変化が、IL-1ra-R ポリペプチドの生物学的活性および／または構造にさほど不利に影響を与えるようではないことが、理解される。当業者には

また、比較的保存された領域においてさえ、化学的に類似のアミノ酸を、活性を維持しながら天然に存在する残基に代わって置換し得ることが公知である（保存的アミノ酸残基置換）。従って、生物学的活性または構造のために重要であり得る領域でさえ、生物学的活性を破壊することなく、またはポリペプチド構造に不利に影響を与えることなく、保存的アミノ酸置換に供され得る。

【0077】

さらに、当業者は、活性または構造のために重要である、類似のポリペプチドにおける残基を同定する、構造－機能研究を再調査し得る。このような比較の観点において、類似のポリペプチドにおける活性または構造のために重要なアミノ酸残基に対応する I L－1 r a－R ポリペプチドにおける、アミノ酸残基の重要性を予測し得る。当業者は、I L－1 r a－R ポリペプチドのこのような予測された重要なアミノ酸残基に代わる化学的に類似のアミノ酸置換を、選択し得る。

10

【0078】

当業者はまた、類似のポリペプチドにおける三次元構造およびその構造に関連するアミノ酸配列を分析し得る。このような情報の観点において、当業者は、I L－1 r a－R ポリペプチドのアミノ酸残基のアライメントを、その三次元構造に関して予測し得る。当業者は、そのタンパク質の表面上に存在すると予測されるアミノ酸残基に対する急激な変化を起こさないように、選択し得る。なぜなら、このような残基は、他の分子との重要な相互作用に関与し得るからである。さらに、当業者は、単一のアミノ酸置換を各アミノ酸残基に含む、試験改変体を生成し得る。これらの改変体は、当業者に公知の活性アッセイを使用して、スクリーニングされ得る。このような改変体は、適切な改変体に関する情報を集めるために使用され得る。例えば、特定のアミノ酸残基に対する変化が、破壊された活性、望ましくなく減少した活性、または適切でない活性を生じたことを発見した場合には、このような変化を有する改変体は、回避される。換言すれば、このような慣用的な実験から集めた情報に基づいて、当業者は、さらなる置換が、単独でかまたは他の変異と組み合わせてかのいずれかで回避されるべきであるアミノ酸を、容易に決定し得る。

20

【0079】

多数の科学刊行物が、二次構造の推定に充てられてきた。Moult, 1996, Curr. Opin. Biotechnol. 7: 422-27; Chouら、1974, Biochemistry 13: 222-45; Chouら、1974, Biochemistry 113: 211-22; Chouら、1978, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 47: 45-48; Chouら、1978, Ann. Rev. Biochem. 47: 251-276; および Chouら、1979, Biophys. J. 26: 367-84を参照のこと。さらに、コンピュータプログラムが、二次構造の推定を補助するために、現在利用可能である。二次構造を推定する1つの方法は、相同性モデリングに基づく。例えば、30%より大きな配列同一性または40%より大きな類似性を有する、2つのポリペプチドまたはタンパク質は、しばしば、類似の構造トポロジーを有する。タンパク質構造データベース（PDB）の近年の成長は、二次構造（ポリペプチドまたはタンパク質の構造における可能な折り畳みの数を含む）の増強された予測性を提供してきた。Holmら、1999, Nucleic Acids Res. 27: 244-47を参照のこと。所定のポリペプチドまたはタンパク質において制限された数の折り畳みが存在すること、および一旦、臨界数の構造が解明されると、構造推定は劇的により正確となることが、示唆されてきた（Brennerら、1997, Curr. Opin. Struct. Biol. 7: 369-76）。

30

40

【0080】

二次構造を推定するさらなる方法としては、「スレッディング（threading）」（Jones, 1997, Curr. Opin. Struct. Biol. 7: 377-87; Sipplら、1996, Structure 4: 15-19）、「プロフィール分析」（Bowieら、1991, Science, 253: 164-70; Gribnikovら、1990, Methods Enzymol. 183: 146-59; Gr

50

i b s k o v ら、1987, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 84 : 4355-58)、および「進化学的連鎖」(Holmら、前出、およびBrennerら、前出を参照のこと)が挙げられる。

【0081】

好ましいIL-1ra-Rポリペプチド改変体としては、グリコシル化部位の数および／または型が、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに記載のアミノ酸配列と比較して変化している、グリコシル化改変体が挙げられる。1つの実施形態において、IL-1ra-Rポリペプチド改変体は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに記載のアミノ酸配列より多いかまたはより少ない数のN結合型グリコシル化部位を含む。N結合型グリコシル化部位は、配列Asn-X-SerまたはAsn-X-Thrによって特徴付けられ、ここで、Xと印されるアミノ酸残基は、プロリン以外の任意のアミノ酸残基であり得る。この配列を作製するためのアミノ酸残基の置換は、N結合型糖鎖の付加のための潜在的な新たな部位を提供する。あるいは、この配列を排除する置換は、存在するN結合型糖鎖を除去する。1つ以上のN連結グリコシル化部位(代表的に、天然に存在するグリコシル化部位)が排除され、そして1つ以上の新たなN結合部位が作製される、N結合型糖鎖の再配列もまた、提供される。さらなる好ましいIL-1ra-R改変体としては、1つ以上のシステイン残基が、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに記載のアミノ酸配列と比較して欠失しているか、または別のアミノ酸(例えば、セリン)で置換されている、システイン改変体が挙げられる。システイン改変体は、IL-1ra-Rポリペプチドが、例えば不溶性の封入体の単離の後に、生物学的に活性な立体構造へとリフォールディングされなければならない場合に、有用である。システイン改変体は、一般に、ネイティブタンパク質より少ないシステイン残基を有し、そして代表的には同数のシステイン残基を有し、対合していないシステインから生じる相互作用を最小にする。

【0082】

別の実施形態において、関連する核酸分子は、少なくとも1つのアミノ酸挿入を有しかつポリペプチドが配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかもしくはこの配列からなるか、あるいは少なくとも1つのアミノ酸欠失を有しかつポリペプチドが配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかもしくはこの配列からなる。関連する核酸分子はまた、ポリペプチドがカルボキシル末端および／またはアミノ末端の短縮を有しかつさらにこのポリペプチドが、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を、含むかまたはこの配列からなる。関連する核酸分子はまた、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、カルボキシル末端短縮、およびアミノ末端短縮からなる群より選択される少なくとも1つの改変を含み、そしてここで、ポリペプチドが配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかに記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を、含むかまたはこの配列からなる。

【0083】

さらに、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号36のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドあるいは他のIL-1ra-Rポリペプチドは、同種ポリペプチドに融合してホモダイマーを形成し得るか、あるいは異種ポリペプチドに融合してヘテロダイマーを形成し得る。異種のペプチドおよびポリペプチドとしては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：IL-1ra-R融合ポリペプチドの検出および／または

単離を可能にするエピトープ；膜貫通レセプタータンパク質またはその部分（例えば、細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン）；膜貫通レセプタータンパク質に結合する、リガンドまたはその部分；触媒的に活性である、酵素またはその部分；オリゴマー化を促進するポリペプチドまたはペプチド（例えば、ロイシンジッパードメイン）；安定性を増加させるポリペプチドまたはペプチド（例えば、免疫グロブリン定常領域）；ならびに配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、または配列番号 36 のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドあるいは別の IL-1ra-Rポリペプチドとは異なる治療性を有する、ポリペプチド。

【0084】

融合は、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、または配列番号 36 のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいは他の IL-1ra-R ポリペプチドの、アミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかにおいて、なされ得る。融合は、リンカーもアダプター分子も用いずに直接であっても、リンカーもしくはアダプター分子を介してであってもよい。リンカーまたはアダプター分子は、1つ以上のアミノ酸残基であり得、代表的に、約 20～約 50 アミノ酸残基である。DNA 制限エンドヌクレアーゼまたはプロテアーゼに対する切断部位を有するリンカーまたはアダプター分子がまた、設計されて、融合した部分の分離を可能にし得る。一旦構築されると、誘合ポリペプチドは、本明細書中に記載の方法に従って誘導体化され得ることが、理解される。

10

【0085】

本発明のさらなる実施形態において、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、または配列番号 36 のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいは他の IL-1ra-R ポリペプチドは、ヒト IgG の Fc 領域の 1つ以上のドメインに融合する。抗体は、以下の 2つの機能的に独立した部分を含む；抗原を結合する「Fab」として公知の可変ドメイン、ならびに相補的活性化および食作用細胞による攻撃のようなエフェクター機能に關与する、「Fc」として公知の定常ドメイン。Fc は、長い血清半減期を有し、一方で Fab は、短寿命である。Caponら、1989, Nature 337:525-31。治療タンパク質と一緒に構築される場合には、Fc ドメインは、より長い半減期を提供し得るか、または Fc レセプター結合、プロテイン A 結合、補体結合、および恐らく、胎盤移入のような機能を組み込み得る。同書。表 II は、当該分野において公知の特定の Fc 融合物の使用を要約する。

20

【0086】

【表 2】

30

表 II
治療タンパク質との Fc 融合物

Fc の形態	融合パートナー	治療の影響	参考文献
IgG1	CD30-L の N 末端	ホジキン病; 未分化リンパ腫; T 細胞白血病	U.S. Patent No. 5,480,981
マウス Fcγ2a	IL-10	抗炎症; 移植片拒絶	Zheng <i>et al.</i> , 1995, <i>J. Immunol.</i> 154:5590-600
IgG1	TNF レセプター	敗血症性ショック	Fisher <i>et al.</i> , 1996, <i>N. Engl. J. Med.</i> 334:1697-1702; Van Zee <i>et al.</i> , 1996, <i>J. Immunol.</i> 156:2221-30
IgG, IgA, IgM, または IgE (最初のドメインを除く)	TNF レセプター	炎症; 自己免疫障害	U.S. Patent No. 5,808,029
IgG1	CD4 レセプター	AIDS	Capon <i>et al.</i> , 1989, <i>Nature</i> 337: 525-31
IgG1, IgG3	IL-2 の N 末端	抗癌、抗ウイルス	Harvill <i>et al.</i> , 1995, <i>Immunotech.</i> 1:95-105
IgG1	OPG の C 末端	変形性関節症; 骨密度	WO 97/23614
IgG1	レプチンの N 末端	抗肥満	PCT/US 97/23183, filed December 11, 1997
ヒト IgGγ1	CTLA-4	自己免疫障害	Linsley, 1991, <i>J. Exp. Med.</i> , 174:561-69

一例において、ヒト IgG のヒンジ領域、CH2 領域、および CH3 領域は、当業者に公知の方法を使用して、IL-1ra-R ポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかにおいて、融合し得る。別の例において、ヒト IgG のヒンジ領域、CH2 領域、および CH3 領域は、IL-1ra-R ポリペプチドフラグメント（例えば、IL-1ra-R ポリペプチドの推定細胞外部分）のアミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかにおいて、融合し得る。

【0087】

得られる IL-1ra-R 融合ポリペプチドは、プロテイン A アフィニティーカラムの使用によって、精製され得る。Fc 領域に融合したペプチドおよびタンパク質は、融合していない対応物より実質的に長いインビボでの半減期を示すことが見出された。また、Fc 領域への融合は、融合ポリペプチドの二量化/多量体化を可能にする。Fc 領域は、天然に存在する Fc 領域であり得るか、または治療品質、循環時間、もしくは減少した凝集のような特定の品質を改善するよう変更され得る。

【0088】

関連する核酸分子およびポリペプチドの同一性および類似性は、公知の方法によって容易に計算され得る。このような方法としては、Computational Molecular Biology (A. M. Lesk 編、Oxford University Press 1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects (D. W. Smith 編、Academic Press 1993); Computer Analysis of Sequence Data (Part 1, A. M. Griffin および H. G. Griffin 編、Humana Press 1994); G. von Heinle, Sequence Analysis in Molecular Biology (Academic Press 1987); Sequence Analysis Primer (M. Gribskov および J. Devereux 編、M. Stockton Press 1991); ならびに Carillo ら、1988, SIAM J. Applied Math., 48:1073 に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0089】

同一性および／または類似性を決定するための好ましい方法は、試験される配列間での最大の適合を与えるために、設計される。同一性および類似性を決定するための方法は、公共に利用可能なコンピュータプログラムにおいて記載されている。2つの配列間の同一性および類似性を決定するための、好ましいコンピュータプログラム方法としては、GCGプログラムパッケージ（GAP（Devereuxら、1984, Nucleic Acids Res. 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI）、BLASTP、BLASTN、およびFASTA（Altschulら、1990, J. Mol. Biol. 215:403-10）を含む）が挙げられるが、これらに限定されない。BLASTXプログラムは、National Center for Biotechnology Information (NCBI) および他の供給源（Altschulら、BLAST Manual (NCB NLM NIH, Bethesda, MD); Altschulら、1990、前出）から公共に利用可能である。周知のSmith Watermanアルゴリズムもまた、同一性を決定するために使用され得る。

10

【0090】

2つのアミノ酸配列を整列させるための特定のアライメントスキームは、これら2つの配列の短い領域のみの適合を生じ得、そしてこの小さな整列領域は、2つの全長配列間に有意な関連がない場合でさえも、非常に高い配列同一性を有し得る。従って、好ましい実施形態において、選択された整列方法（GAPプログラム）は、特許請求されるポリペプチドの少なくとも50の連続するアミノ酸にわたる整列を生じる。

20

【0091】

例えば、コンピュータアルゴリズムGAP（Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI）を使用して、配列同一性の百分率が決定されるべき2つのポリペプチドが、それらのそれぞれのアミノ酸の最適な適合（アルゴリズムによって決定される「適合したスパン」）のために、整列される。ギャップオープニングペナルティー（gap opening penalty）（これは、平均対角の3倍として計算される：「平均対角」とは、使用される比較行列（comparison matrix）の対角の平均である；「対角」とは、特定の比較行列によって各完全なアミノ酸適合に対して割り当てられたスコアまたは数である）およびギャップエクステンションペナルティー（gap extension penalty）（これは通常、キャップオープニングペナルティーの0.1倍である）、ならびにPAM 250またはBLOSUM 62のような比較行列が、このアルゴリズムと組み合わせて使用される。標準的な比較行列もまた、このアルゴリズムによって使用される（Dayhoffら、5 Atlas of Protein Sequence and Structure（補遺3 1978）（PAM250比較行列）；Henikoffら、1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-19（BLOSUM 62比較行列）を参照のこと）。

30

【0092】

ポリペプチド配列比較のための好ましいパラメータは、以下を含む：

40

Algorithm: Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443-53;

Comparison matrix: BLOSUM 62 (Henikoffら、前出) ;

Gap Penalty: 12

Gap Length Penalty: 4

Threshold of Similarity: 0

このGAPプログラムは、上記パラメータを用いて有用である。上記パラメータは、GAPアルゴリズムを用いるポリペプチド比較（末端ギャップに対してはペナルティーがないこととともに）のためのデフォルトパラメータである。

50

【0093】

核酸分子配列比較のための好ましいパラメータは、以下を含む：

Algorithm: Needleman and Wunsch, 前出；

Comparison matrix: matches = +10, mismatch = 0

Gap Penalty: 50

Gap Length Penalty: 3

このGAPプログラムはまた、上記パラメータを用いて有用である。上記パラメータは、核酸分子比較のためのデフォルトパラメータである。

【0094】

Program Manual, Wisconsin Package, Version 9, September, 1997に記載されるものを含む、他の例示的なalgorithm、gap opening penalty、gap extension penalty、comparison matrix、およびthreshold of similarityが使用され得る。なされるべき特定の選択は、当業者に明らかであり、そしてなされるべき特定の比較（例えば、DNA対DNA、タンパク質対タンパク質、タンパク質対DNA）；ならびにさらに、その比較が所定の対の配列間（この場合には、GAPまたはBest Fitが一般的に好ましい）であるか、1つの配列と大きなデータベースの配列との間（この場合には、FASTAまたはBLASTAが好ましい）であるかに依存する。

【0095】

（核酸分子）

IL-lra-Rポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子は、種々の様式（化学合成、cDNAもしくはゲノムのライブラリーのスクリーニング、発現ライブラリースクリーニング、および／またはcDNAのPCR増幅が挙げられるが、これらに限定されない）で容易に得られ得る。

【0096】

本明細書中において使用される組換えDNA法は、一般に、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) および／またはCurrent Protocols in Molecular Biology (Ausubelら編、Green Publishers Inc. およびWiley and Sons 1994) に記載されている。本発明は、本明細書中に記載され得るような核酸分子、およびこのような分子を得るための方法を提供する。

【0097】

IL-lra-Rポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子が1つの種から同定された場合には、この遺伝子の全てまたは一部を、同じ種由来のオーソログまたは関連する遺伝子を同定するためのプローブとして使用し得る。このプローブまたはプライマーを使用して、IL-lra-Rポリペプチドを発現すると考えられる種々の組織供給源由来のcDNAをスクリーニングし得る。さらに、配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号35のいずれかに記載されるような配列を有する核酸分子の部分または全てを使用して、ゲノムライブラリーをスクリーニングし、IL-lra-Rポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子を同定および単離し得る。代表的に、中程度または高いストリンジェンシーの条件が、スクリーニングのために使用されて、このスクリーニングから得られる誤った陽性の数を最小にする。

【0098】

IL-lra-Rポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子もまた、発現されたタンパク質の特性に基づいて陽性クローンの検出を使用する発現クローニングによって、同定され得る。代表的に、核酸ライブラリーは、抗体または他の結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）を、宿主細胞表面において発現および提示されたクローンタンパク質に結合させることによって、スクリーニングされる。抗体または結合パートナ

ーは、所望のクローンを発現する細胞を同定するために、検出可能な標識で改変される。

【0099】

以下に記載される説明に従って実施される組換え発現技術に従って、これらのポリヌクレオチドを産生し得、そしてコードされたポリペプチドを発現し得る。例えば、IL-1ra-Rポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸配列を適切なベクターに挿入することによって、当業者は、多量の所望のヌクレオチド配列を容易に生成し得る。次いで、これらの配列を使用して、検出プローブまたは増幅プライマーを生成し得る。あるいは、IL-1ra-Rポリペプチドのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを、発現ベクターに挿入し得る。発現ベクターを適切な宿主に導入することによって、コードされたIL-1ra-Rポリペプチドが、多量に産生され得る。

10

【0100】

適切な核酸配列を得るための別の方法は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）である。この方法において、cDNAは、酵素逆転写酵素を使用して、poly(A)+RNAまたは全RNAから調製される。次いで、2つのプライマー（代表的には、IL-1ra-Rポリペプチドのアミノ酸配列をコードするcDNAの2つの別個の領域に対して相補的である）が、TaqポリメラーゼのようなポリメラーゼとともにこのcDNAに付加され、そしてこのポリメラーゼが、このcDNAのこれら2つのプライマー間の領域を増幅する。

【0101】

IL-1ra-Rポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を調製する別の手段は、Engelsら、1989, Angew. Chem. Intl. Ed. 28:716-34によって記載されるもののような、当業者に周知の方法を使用する、化学合成である。これらの方法としては、とりわけ、核酸合成のためのリン酸トリエステル、ホスホルアミダイト、およびH-ホスホネート方法が挙げられる。このような化学合成のために好ましい方法は、標準的なホスホルアミダイト化学を使用する、ポリマーにより支持される合成である。代表的に、IL-1ra-Rポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAは、数百ヌクレオチド長である。約100ヌクレオチドより長い核酸は、これらの方法を使用して、いくつかのフラグメントとして合成され得る。次いで、これらのフラグメントと一緒に連結されて、IL-1ra-R遺伝子の全長ヌクレオチド配列を形成し得る。通常、このポリペプチドのアミノ末端をコードするDNAフラグメントは、ATGを有し、これは、メチオニン残基をコードする。このメチオニンは、宿主細胞において産生されたポリペプチドがその細胞から分泌されるよう設計されるか否かに依存して、IL-1ra-Rポリペプチドの成熟形態で存在してもそうでなくてもよい。当業者に公知の他の方法が、同様に使用され得る。

20

30

【0102】

特定の実施形態において、核酸改変体は、所定の宿主細胞におけるIL-1ra-Rポリペプチドの最適な発現のために変更されたコドンを含む。特定のコドン変更は、発現のために選択される宿主細胞およびIL-1ra-Rポリペプチドに依存する。このような「コドン最適化」は、種々の方法によって（例えば、所定の宿主細胞において高度に発現される遺伝子における使用に好ましいコドンを選択することによって）実施され得る。高度に発現された細菌遺伝子のコドン優先性のための「Eco_high.Cod」のようなコドン度数表を組み込むコンピュータアルゴリズムが使用され得、そしてUniversity of Wisconsin Package Version 9.0 (Genetics Computer Group, Madison, WI)によって提供される。他の有用なコドン度数表としては、「Celegans_high.cod」、「Celegans_low.cod」、「Drosophila_high.cod」、「Human_high.cod」、「Maize_high.cod」、および「Yeast_high.cod。」が挙げられる。

40

【0103】

いくつかの場合において、IL-1ra-Rポリペプチド改変体をコードする核酸分子を調製することが所望であり得る。改変体をコードする核酸分子は、プライマーが所望の点

50

変異を有する部位特異的変異誘発、PCR増幅、または他の適切な方法を使用して生成し得る（変異誘発技術の記載に関しては、Sambrookら、前出、およびAusubelら、前出を参照のこと）。Engelsら、前出によって記載される方法を使用する化学合成もまた、このような改変体を調製するために使用され得る。当業者に公知の他の方法が、同様に使用され得る。

【0104】

（ベクターおよび宿主細胞）

IL-1ra-Rポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を、標準的な連結技術を使用して適切な発現ベクターに挿入する。ベクターは、代表的に、使用される特定の宿主細胞において機能的であるように選択される（すなわち、ベクターは、遺伝子の増幅および／または遺伝子の発現が生じるように、宿主細胞機構と適合性である）。IL-1ra-Rポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子は、原核生物宿主細胞、酵母宿主細胞、昆虫（バキュロウイルス系）宿主細胞および／または真核生物宿主細胞において増幅／発現され得る。宿主細胞の選択は、IL-1ra-Rポリペプチドが翻訳後修飾（例えば、グリコシル化および／またはホスホリル化）されるか否かに一部依存する。そうである場合、酵母宿主細胞、昆虫宿主細胞、または哺乳動物宿主細胞が好ましい。発現ベクターの総説について、Meth. Enz., vol. 185 (D. V. Goeddel, ed., Academic Press 1990)を参照のこと。

【0105】

代表的に、任意の宿主細胞に使用される発現ベクターは、プラスミド維持のためならびに外来性ヌクレオチド配列のクローニングおよび発現のための配列を含む。このような配列（集合的に、「隣接配列」と呼ばれる）は、特定の実施形態において、代表的に、以下のヌクレオチド配列の1つ以上を含む：プロモーター、1つ以上のエンハンサー配列、複製起点、転写終結配列、ドナーおよびアクセプタースプライス部位を含む完全なイントロン配列、ポリペプチド分泌のためのリーダー配列をコードする配列、リボソーム結合部位、ポリアデニル化配列、発現されるポリペプチドをコードする核酸を挿入するためのポリリンカー領域、ならびに選択マーカーエレメント。これらの配列のそれぞれが、以下に議論される。

【0106】

必要に応じて、ベクターは、「タグ」コード配列（すなわち、IL-1ra-Rポリペプチドコード配列の5'末端または3'末端に配置されるオリゴヌクレオチド分子）を含み得；オリゴヌクレオチド配列は、polyHis（例えば、hexaHis）、または別の「タグ」（例えば、FLAG、HA（赤血球凝集素インフルエンザウイルス）またはmyc（これらには、市販の抗体が存在する））をコードする。このタグは、代表的には、ポリペプチドの発現の際にポリペプチドに融合され、宿主細胞からの、IL-1ra-Rポリペプチドのアフィニティー精製のための手段として役立ち得る。アフィニティー精製は、例えば、アフィニティーマトリクスとしてタグに対する抗体を使用するカラムクロマトグラフィーによって達成され得る。必要に応じて、タグは、続いて、切断のために特定のペプチダーゼを使用するような種々の手段によって、精製されたIL-1ra-Rポリペプチドから除去され得る。

【0107】

隣接配列は、同種（すなわち、宿主細胞と同じ種および／または系統由来）であり得るか、異種（すなわち、宿主細胞種または宿主細胞系統以外の種由来）であり得るか、ハイブリッド（すなわち、1つより多くの供給源由来の隣接配列の組み合わせ）であり得るか、または合成であり得るか、あるいは隣接配列は、IL-1ra-Rポリペプチド発現を調節するために正常に機能するネイティブな配列であり得る。このように、隣接配列の供給源は、任意の原核生物または真核生物、任意の脊椎生物または無脊椎生物、あるいは任意の植物であり得、但し、隣接配列は、宿主細胞の機構において機能的であり、そして宿主細胞の機構によって活性化され得る。

【0108】

本発明のベクターに有用な隣接配列は、当該分野において周知である任意のいくつかの方法によって得られ得る。代表的には、I L-1 r a-R 遺伝子隣接配列以外の、本明細書中で有用な隣接配列は、マッピングおよび／または制限エンドヌクレアーゼ消化によって以前に同定されており、従って、適切な制限エンドヌクレアーゼを使用して、適切な組織供給源から単離され得る。いくつかの場合において、隣接配列の全長ヌクレオチド配列は公知であり得る。ここで、隣接配列は、核酸合成またはクローニングのために本明細書中で記載される方法を使用して合成され得る。

【0109】

隣接配列の全てまたは一部のみが公知である場合、PCRを使用して、そして／あるいは適切なオリゴヌクレオチドならびに／または同じもしくは別の種由来の隣接配列フラグメントを用いてゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって、隣接配列は得られ得る。隣接配列が公知でない場合、隣接配列を含むDNAのフラグメントは、例えば、コード配列または別の遺伝子を含み得る大きなDNA断片から単離され得る。単離は、適切なDNAフラグメントを生成するための制限エンドヌクレアーゼ消化、続くアガロースゲル精製を使用する単離、Q i a g e n（登録商標）カラムクロマトグラフィー（C h a t s w o r t h、C A）、または当業者に公知の他の方法によって達成され得る。この目的を達成するための適切な酵素の選択は、当業者に容易に明かである。

【0110】

複製起点は、代表的に、市販から購入された原核生物発現ベクターの一部であり、この起点は、宿主細胞においてベクターの増幅に役立つ。特定のコピー数へのベクターの増幅は、いくつかの場合において、I L-1 r a-R ポリペプチドの最適な発現に重要であり得る。選択されたベクターが複製起点部位を含まない場合、公知の配列に基づいて化学的に合成され得、そしてベクターに連結され得る。例えば、プラスミドpBR322（New England Biolabs, Beverly, MA）からの複製起点は、大部分のグラム陰性細菌に適切であり、そして種々の起点（例えば、SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、水疱性口内炎ウイルス（VSV）、またはHPVもしくはBPVのようなパピローマウイルス）は、哺乳動物細胞におけるクローニングベクターのために有用である。一般的に、複製起点の成分は、哺乳動物発現ベクターに必要とされない（例えば、SV40起点は、ただそれが初期プロモーターを含むので、しばしば、使用される）。

【0111】

転写終結配列は、代表的にポリペプチドコード領域の末端の3'側に配置され、そして転写を終結させるのに役立つ。通常、原核生物細胞における転写終結配列は、G-Cリッチフラグメント、続いてポリ-T配列である。この配列はライブラリーから容易にクローン化され得るか、またはベクターの一部として市販で購入されるが、これはまた、本明細書中上記のような核酸合成のための方法を使用して容易に合成され得る。

【0112】

選択マーカー遺伝子エレメントは、選択培養培地において増殖される宿主細胞の生存および増殖に必要なタンパク質をコードする。代表的な選択マーカー遺伝子は、（a）原核生物宿主細胞に対して、抗生物質または他の毒素（例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、またはカナマイシン）に対する耐性を与えるか；（b）細胞の栄養要求性の欠損を補うか；あるいは（c）複合培地から入手可能でない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。好ましい選択マーカーは、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、およびテトラサイクリン耐性遺伝子である。ネオマイシン耐性遺伝子もまた、原核生物宿主細胞および真核生物宿主細胞における選択のために使用され得る。

【0113】

他の選択遺伝子は、発現される遺伝子を増幅するために使用され得る。増幅は、増殖に必要なタンパク質の産生により大きく要求される遺伝子が、組換え細胞の染色体の連続的な生成の内にタンデムに反復されるプロセスである。哺乳動物細胞に対する適切な選択マーカーの例としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）およびチミジンキナーゼが挙げられる。哺乳動物細胞形質転換体は、選択圧下に置かれ、ここで、形質転換体のみが、

10

20

30

40

50

ベクターに存在する選択遺伝子によって生存するように独特に適合される。選択圧は、培地中の選択因子の濃度が連続的に変化し、それによって選択遺伝子と I L - 1 r a - R ポリペプチドをコードする D N A との両方の増幅を導く条件下で、形質転換された細胞を培養することによって課される。結果として、増加した量の I L - 1 r a - R ポリペプチドが、増幅された D N A から合成される。

【0114】

リボソーム結合部位は、通常、m R N A の翻訳開始に必要であり、そして シャイン・ダルガルノ配列 (原核性物) または コザック配列 (真核生物) によって特徴付けられる。このエレメントは、代表的に、発現される I L - 1 r a - R ポリペプチドのプロモーターの 3' 側およびコード配列の 5' 側に配置される。 シャイン・ダルガルノ配列 は、可変であるが、代表的には、ポリプリン (すなわち、高い A - G 含有量) である。多くの シャイン・ダルガルノ配列 は、同定されており、それぞれが、本明細書中に記載の方法を使用して、原核生物ベクターに使用して容易に合成され得る。

10

【0115】

リーダー配列、またはシグナル配列は、宿主細胞から I L - 1 r a - R ポリペプチドを指向させるために使用され得る。代表的には、シグナル配列をコードするヌクレオチド配列は、I L - 1 r a - R 核酸分子のコード領域に位置するか、または直接 I L - 1 r a - R ポリペプチドコード領域の 5' 末端 に位置する。多くのシグナル配列が同定されており、選択された宿主細胞において機能性である 任意のシグナル配列 が、I L - 1 r a - R 核酸分子と組み合わせて使用され得る。従って、シグナル配列は、I L - 1 r a - R 核酸分子に対して同種 (天然) または異種であり得る。さらに、シグナル配列は、本明細書中に記載される方法を使用して化学的に合成され得る。大部分において、シグナルペプチドの存在を介した宿主細胞からの I L - 1 r a - R ポリペプチドの分泌は、分泌された I L - 1 r a - R ポリペプチドからのシグナルペプチドの除去を生じる。シグナル配列は、ベクターの成分であり得るか、またはベクターに挿入された I L - 1 r a - R 核酸分子の一部であり得る。

20

【0116】

I L - 1 r a - R ポリペプチドコード領域に結合されたネイティブな I L - 1 r a - R ポリペプチドシグナル配列をコードするヌクレオチド配列または I L - 1 r a - R ポリペプチドコード領域に結合された異種シグナル配列をコードするヌクレオチド配列のいずれかの使用が本発明の範囲内に含まれる。選択された異種シグナル配列は、宿主細胞によって認識され、プロセスされる (すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される) ものであるべきである。ネイティブな I L - 1 r a - R ポリペプチドシグナル配列を認識せず、プロセスしない原核生物宿主細胞について、シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、または熱安定エンテロトキシン I I リーダーのグループから選択される原核生物シグナル配列によって置換される。酵母分泌について、ネイティブな I L - 1 r a - R ポリペプチドシグナル配列は、酵母インベルターゼ、 α 因子、または酸ホスファターゼリーダーによって置換され得る。哺乳動物細胞発現において、ネイティブなシグナル配列が 十分 であるが、他の哺乳動物シグナル配列が適切であり得る。

30

【0117】

グリコシル化が真核生物宿主細胞発現系において望ましいようないくつかの場合において、グリコシル化または収量を改善するために種々の プレ配列 (p r e s e q u e n c e) が操作され得る。例えば、特定のシグナルペプチドのペプチダーゼ切断部位を変更し得るかまたはプロ配列 (p r o - s e q u e n c e) (これはまた、グリコシル化に影響し得る) を加え得る。最後のタンパク質産物は、1 位に (成熟タンパク質の最初のアミノ酸に対して)、発現に付随して 1 つ以上のさらなるアミノ酸を有し得、これは、完全に除去されないかもしれない。例えば、最終のタンパク質産物は、アミノ末端に結合される、ペプチダーゼ切断部位において見出される 1 つまたは 2 つのアミノ酸残基を有し得る。あるいは、いくつかの酵素切断部位の使用は、酵素が成熟ポリペプチド内のこのような領域を切断する場合、所望の I L - 1 r a - R ポリペプチドの少し短縮した形態を生じ得る。

40

50

【0118】

多くの場合において、核酸分子の転写は、ベクター内の1つ以上のイントロンの存在によって増加する；これは、ポリペプチドが真核生物宿主細胞（特に、哺乳動物宿主細胞）において産生される場合、特に当てはまる。使用されるイントロンは、特に使用される遺伝子が全長ゲノム配列またはそのフラグメントである場合、I L-1 r a-R 遺伝子内に天然に存在し得る。イントロンが遺伝子内に天然に存在しない（大部分のc D N Aについて）場合、イントロンは、別の供給源から得られ得る。隣接配列およびI L-1 r a-R 遺伝子に関してイントロンの位置は、イントロンが効果的に転写されなければならないので、一般的に重要である。従って、I L-1 r a-R c D N A分子が転写される場合、イントロンの好ましい位置は、転写開始部位の3'側およびポリ-A転写終止配列の5'側である。好ましくは、イントロンは、コード配列を妨害しないように、c D N Aの1つの側または他の側（すなわち、5'側または3'側）に配置される。任意の供給源（ウイルス、原核生物および真核生物（植物または動物）を含む）由来の任意のイントロンを使用して本発明を実行し得るが、但し、このイントロンは、挿入される宿主細胞に適合性である。合成イントロンもまた本明細書中に含まれる。必要に応じて、1つより多くのイントロンがベクター内で使用され得る。

10

【0119】

本発明の発現ベクターおよびクローニングベクターは、代表的には、宿主生物によって認識され、I L-1 r a-Rポリペプチドをコードする分子に作動可能に連結されたプロモーターを含む。プロモーターは、構造遺伝子の転写を制御する構造遺伝子（一般的に、約100~1000bp）の開始コドンに対して上流（すなわち、5'側）に配置される非転写配列である。プロモーターは、通常、2つのクラス（誘導プロモーターおよび構成プロモーター）の1つにグループ化される。誘導プロモーターは、培養条件におけるいくらかの変化（例えば、栄養の存在または非存在、あるいは温度の変化）にตอบสนองしてそれらの制御下で、D N Aからの増加したレベルの転写を開始する。他方、構成プロモーターは、連続的な遺伝子産物の産生を開始する；すなわち、遺伝子発現に対して遺伝子をほとんど制御しないかまたは制御しない。多数のプロモーター（種々の潜在的な宿主細胞によって認識される）が周知である。適切なプロモーターは、供給源のD N Aからプロモーターを制限酵素消化によって取り出し、そして所望のプロモーター配列をベクターに挿入することによって、I L-1 r a-RポリペプチドをコードするD N Aに作動可能に連結される。ネイティブなI L-1 r a-Rプロモーター配列は、I L-1 r a-R核酸分子の増幅および／または発現に指向させるために使用され得る。しかし、ネイティブなプロモーターと比較して大きい転写および発現タンパク質のより高い産生が可能であり、そして使用のために選択された宿主細胞系と適合性である場合、異種プロモーターが好ましい。

20

30

【0120】

原核生物宿主との使用に適切なプロモーターとしては、β-ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系；アルカリホスファターゼ；トリプトファン（t r p）プロモーター系；およびハイブリッドプロモーター（例えば、t a cプロモーター）が挙げられる。他の公知の細菌プロモーターもまた、適切である。これらの配列は、公開されており、その結果、当業者は、任意の有用な制限部位を供給するのに必要とされるリンカーまたはアダプターを使用して、所望のD N Aにそれらの配列を連結し得る。

40

【0121】

酵母宿主との使用に適切なプロモーターはまた、当該分野において周知である。酵母エンハンサーは、酵母プロモーターと共に有利に使用される。哺乳動物宿主細胞との使用に適切なプロモーターは周知であり、限定しないが、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（例えば、A d e n o v i r u s 2）、ウシパピローマウイルス、鳥類肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルスおよび最も好ましいシミアンウイルス40（S V 40）のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーターが挙げられる。他の適切な哺乳動物プロモーターとしては、異種哺乳動物プロモーター（例えば、熱ショックプロモーターおよびアクチンプロモーター）が挙げられる。

50

【0122】

IL-1 α -R遺伝子発現を制御する際に関心があり得るさらなるプロモーターとしては、限定しないが、以下が挙げられる：SV40初期プロモーター領域（Bernois and Chambon, 1981, Nature 290:304-10）；CMVプロモーター；ラウス肉腫ウイルスの3'側の長い末端反復に含まれるプロモーター（Yamamoto, et al., 1980, Cell 22:787-97）；ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター（Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78:1444-45）；メタロチオネイン遺伝子の調節配列（Brinster et al., 1982, Nature 296:39-42）； β -ラクタマーゼプロモーターのような原核生物発現ベクター（Vil la-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 75:3727-31）；またはtacプロモーター（DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 80:21-25）。組織特異性を示し、そしてトランスジェニック動物において利用されている以下の動物転写制御領域もまた関心がある：膵臓腺房細胞において活性なエラスターゼI遺伝子制御領域（Swift et al., 1984, Cell 38:639-46；Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409（1986）；MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515）；膵臓 β 細胞において活性なインシュリン遺伝子制御領域（Hanahan, 1985, Nature 315:115-22）；リンパ球において活性な免疫グロブリン遺伝子制御領域（Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-58；Adames et al., 1985, Nature 318:533-38；Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol., 7:1436-44）；精巣、乳房、リンパ球、および肥満細胞において活性なマウス乳腺癌ウイルス制御領域（Leder et al., 1986, Cell 45:485-95）；肝臓において活性なアルブミン遺伝子制御領域（Pinkert et al., 1987, Gene and Devel. 1:268-76）；肝臓において活性な α -フェトプロテイン遺伝子制御領域（Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol., 5:1639-48；Hammer et al., 1987, Science 235:53-58）；肝臓において活性な α 1-抗トリプシン遺伝子制御領域（Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161-71）；骨髄性細胞において活性な β -グロビン遺伝子制御領域（Mogram et al., 1985, Nature 315:338-40；Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94）；脳の稀突起神経膠細胞において活性なミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域（Readhead et al., 1987, Cell 48:703-12）；骨格筋において活性なミオシン軽鎖-2遺伝子制御領域（Sani, 1985, Nature 314:283-86）；ならびに視床下部において活性なゴナドトロピン放出ホルモン遺伝子制御領域（Mason et al., 1986, Science 234:1372-78）。

【0123】

エンハンサー配列は、より高等な真核生物によって本発明のIL-1 α -RポリペプチドをコードするDNAの転写を増加するように、ベクターに挿入され得る。エンハンサーは、転写を増加させるためにプロモーターに作用する、通常約10~300bpの長さのDNAのシスに作用するエレメントである。エンハンサーは、相対的な方向非依存性および位置非依存性である。これらは、転写ユニットに対して5'側および3'側に見出された。哺乳動物遺伝子から入手可能ないくつかのエンハンサー配列が公知である（例えば、グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテインおよびインシュリン）。しかし、代表的には、ウイルス由来のエンハンサーが、使用される。SV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、ポリオーマエンハンサー、およ

びアデノウイルスエンハンサーは、真核生物プロモーターの活性化について例示的に増強するエレメントである。エンハンサーは、IL-1 α -R核酸分子に対して5'位または3'位でベクターにスプライシングされ得るが、代表的には、プロモーターから5'位側に配置される。

【0124】

本発明の発現ベクターは、市販のベクターのような開始ベクターから構築され得る。このようなベクターは、全ての所望な隣接配列を含んでも良いし、含まなくても良い。本明細書中に記載される隣接配列の1つ以上がすでにベクター内にない場合、これらは、個々に得られ得、ベクターに連結され得る。隣接配列のそれぞれを得るために使用される方法は、当業者に周知である。

10

【0125】

本発明を実行するために好ましいベクターは、細菌宿主細胞、昆虫宿主細胞、および哺乳動物宿主細胞と適合性のベクターである。このようなベクターとしては、特に、pCRII、pCR3、およびpcDNA3.1 (Invitrogen, San Diego, CA)、pBSII (Stratagene, La Jolla, CA)、pET15 (Novagen, Madison, WI)、pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)、pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, CA)、pETL (BlueBacII, Invitrogen)、pDSR- α (PCT公開番号WO 90/14363) ならびにpFastBacDual (Gibco-BRL, Grand Island, NY) が挙げられる。

20

【0126】

さらなる適切なベクターとしては、限定しないが、コスミド、プラスミド、または改変ウイルスが挙げられるが、これらのベクター系は、選択された宿主細胞と適合性でなければならぬことが理解される。このようなベクターとしては、限定しないが、Bluescript (登録商標) プラスミド誘導体 (高コピー数ColE1ベースのファージミド、Stratagene Cloning Systems, La Jolla CA)、Taq増幅PCR産物をクローニングするために設計されたPCRクローニングプラスミド (例えば、TOPOTM TA Cloning (登録商標) Kit、PCR2.1 (登録商標) プラスミド誘導体、Invitrogen, Carlsbad, CA)、ならびにバキュロウイルス発現系のような哺乳動物ベクター、酵母ベクターまたはウイルスベクター (pBacPAKプラスミド誘導体、Clontech, Palo Alto, CA) のようなプラスミドが挙げられる。

30

【0127】

ベクターが構築され、そしてIL-1 α -Rポリペプチドをコードする核酸分子がベクターの適切な部位に挿入された後に、完全なベクターが増幅発現および/またはポリペプチド発現に適切な宿主細胞に挿入され得る。IL-1 α -Rポリペプチドに対する発現ベクターの選択された宿主細胞への形質転換は、トランスフェクション、感染、塩化カルシウム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクシン、DEAE-デキストラン法、または他の公知の技術のような方法を含む周知の方法によって達成され得る。選択される方法は、一部、使用される宿主細胞の種類の機能である。これらの方法および他の適切な方法は、当業者に周知であり、例えば、Sambrookら、上記に記載される。

40

【0128】

宿主細胞は、原核生物宿主細胞 (例えば、E. coli) または真核生物宿主細胞 (例えば、酵母細胞、昆虫細胞、または脊椎動物細胞) であり得る。宿主細胞は、適切な条件下で培養される場合、IL-1 α -Rポリペプチドを合成し、これは、続いて、培養培地から (宿主細胞がそのポリペプチドを培地に分泌する場合) 収集され得るか、直接そのポリペプチドを産生する宿主細胞から収集される (そのポリペプチドが分泌されない場合)。適切な宿主細胞の選択は、所望の発現レベル、活性 (例えば、グリコシル化またはホスホリル化) に望ましいかまたは必要なポリペプチド修飾、および生物学的に活性な分子に

50

折り畳まれる容易さなどの種々の因子に依存する。

【0129】

多くの適切な宿主細胞が当該分野において公知であり、多くが、American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VAから入手可能である。例としては、限定しないが、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO)、CHO DHFR (-) 細胞 (Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 4216-20)、ヒト胚性腎臓 (HEK) 293または293T細胞、あるいは3T3細胞のような哺乳動物細胞が挙げられる。適切な哺乳動物宿主細胞の選択および形質転換、培養、増幅、スクリーニング、産物生成、および精製のための方法が当該分野において公知である。他の適切な哺乳動物細胞株は、サルCOS-1およびCOS-7細胞株、およびCV-1細胞株である。さらなる例示的な哺乳動物宿主細胞としては、霊長動物細胞株およびゲッ歯類動物細胞株 (形質転換細胞株を含む) が挙げられる。正常な二倍体細胞、初代組織のインビトロ培養物から誘導される細胞菌株、ならびに初代外植片もまた適切である。候補細胞は、選択遺伝子を遺伝子型的に欠き得るか、または優先的に作用する選択遺伝子を含み得る。他の適切な哺乳動物細胞株としては、限定しないが、マウス神経芽細胞腫N2A細胞、HeLa、マウスL-929細胞、Swissから誘導された3T3株、Balb-cまたはNIHマウス、BHKまたはHakハムスター細胞株が挙げられる。これらの細胞株のそれぞれは、タンパク質発現の当業者によって公知であり入手可能である。

10

【0130】

同様に、細菌細胞が、本発明に適切な宿主細胞として有用である。例えば、E. coli (例えば、HB101、DH5 α 、DH10、およびMC1061) の種々の菌株は、生物工学の分野において宿主細胞として周知である。B. subtilis、Pseudomonas spp., 他のBacillus spp., Streptomyces spp. などの種々の菌株がまた本方法において使用され得る。

20

【0131】

当業者に公知の酵母細胞の多くの菌株はまた、本発明のポリペプチドの発現のため宿主細胞として入手可能である。好ましい酵母細胞としては、例えば、Saccharomyces cerevisiaeおよびPichia pastorisが挙げられる。

【0132】

さらに、望ましい場合、昆虫細胞系が、本発明の方法において利用され得る。このような系は、例えば、Kitts et al., 1993, Biotechniques, 14: 810-17; Lucklow, 1993, Curr. Opin. Biotechnol. 4: 564-72; およびLucklow et al., 1993, J. Virol., 67: 4566-79に記載される。好ましい昆虫細胞は、Sf-9およびHi5 (Invitrogen) である。

30

【0133】

グリコシル化IL-1 α -Rポリペプチドを発現するためにトランスジェニック動物もまた使用し得る。例えば、トランスジェニック乳産動物 (例えば、雌ウシまたはヤギ) を使用し、本発明のグリコシル化ポリペプチドを動物の乳に得ることができる。IL-1 α -Rポリペプチドを産生するために植物もまた使用し得るが、しかし、一般的に、植物において生じるグリコシル化は、哺乳動物細胞において産生されるものとは異なり、ヒト治療用途に適切ではないグリコシル化産物を生じ得る。

40

【0134】

(ポリペプチド産生)

IL-1 α -Rポリペプチド発現ベクターを含む宿主細胞は、当業者に周知の標準的な培地を使用して培養され得る。この培地は、通常、細胞の増殖および生存に必要な全ての栄養分を含む。E. coli細胞を培養するための適切な培地としては、例えば、Luria Broth (LB) および/またはTerrific Broth (TB) が挙げられる。真核生物細胞を培養するための適切な培地としては、Roswell Park

50

Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640)、Minimal Essential Medium (MEM) および／または Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) が挙げられ、これらの全ては、培養される特定の細胞株に必要な血清および／または増殖因子を補充され得る。昆虫細胞についての適切な培地は、必要に応じて、イーストレート (yeastolate)、ラクトアルブミン加水分解産物、および／または胎仔ウシ血清を補充したグレース培地である。

【0135】

代表的に、トランスフェクトされた細胞または形質転換された細胞の選択的な増殖に有用な構成物質または他の化合物が、培地に補充物質として加えられる。使用される化合物は、宿主細胞が形質転換されるプラスミドに存在する選択マーカーエレメントによって検出可能である。例えば、選択マーカーエレメントがカナマイシン耐性である場合、培養倍地に加えられる化合物は、カナマイシンである。選択的増殖のための他の化合物としては、アンピシリン、テトラサイクリン、およびネオマイシンが挙げられる。

10

【0136】

宿主細胞によって産生される IL-1 α -R ポリペプチドの量は、当該分野において公知の標準的な方法を使用して評価され得る。このような方法としては、限定しないが、ウェスタンブロット分析、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、非変性ゲル電気泳動、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分離、免疫沈降、および／または DNA 結合ゲル移動アッセイのような活性アッセイが挙げられる。

20

【0137】

IL-1 α -R ポリペプチドが宿主細胞から分泌されるように設計される場合、ポリペプチドの大部分は、細胞培養培地中に見出され得る。しかし、IL-1 α -R ポリペプチドが宿主細胞から分泌されない場合、細胞質および／または核 (真核宿主細胞について) に、あるいは、細胞質ゾル (グラム陰性細菌宿主細胞について) に存在する。

【0138】

宿主細胞細胞質および／または核 (真核生物宿主細胞について) に位置するかまたは細胞質ゾル (細菌宿主細胞について) に位置する IL-1 α -R ポリペプチドについて、細胞内物質 (グラム陰性細菌についての封入体を含む) は、当業者に公知の任意の標準的な技術を使用して宿主細胞から抽出され得る。例えば、宿主細胞は、フレンチプレス、均質化、および／または超音波処理、続く遠心分離によって、ペリプラズム／細胞質の含有量を放出するように溶解され得る。

30

【0139】

IL-1 α -R ポリペプチドが細胞質ゾル内に封入体を形成した場合、この封入体は、しばしば、内部および／または外部細胞膜に結合され得、従って、主に、遠心分離後にペレット材料において見出される。次いで、ペレット材料は、pH 極限值で処理され得るか、あるいはジチオトレイトールのような還元剤の存在下アルカリ性の pH で、またはトリスカルボキシエチルホスフィンの存在下酸性の pH で、界面活性剤、グアニジン、グアニジン誘導体、尿素、または尿素誘導体のようなカオトロピック剤で処理して、封入体を放出させ、分断させ、そして溶解させ得る。次いで、溶解された IL-1 α -R ポリペプチドは、ゲル電気泳動、免疫沈降などを使用して分析され得る。IL-1 α -R ポリペプチドを単離することが望ましい場合、単離は、本明細書中および Marston et al., 1990, Meth. Enz., 182: 264-75 に記載される方法のような標準的な方法を使用して達成され得る。

40

【0140】

いくつかの場合、IL-1 α -R ポリペプチドは、単離の際、生物学的に活性でなくても良い。「再折り畳みする」、つまり、ポリペプチドをその三次構造に変換し、ジスルフィド連結を生成するための種々の方法を使用して、生物学的活性を回復し得る。このような方法は、溶解されたポリペプチドをある pH (通常 7 より上) および特定の濃度のカオトロピック剤 (chaotrope) の存在に曝露する工程を包含する。カオトロピック

50

剤の選択は、封入体溶解に使用される選択剤に非常に類似するが、通常、カオトロピック剤は低い濃度で使用され、溶解に使用されるカオトロピック剤と必ずしも同一ではない。多くの場合、再折り畳み／酸化溶液はまた、還元剤、または特定の比の還元剤およびその酸化形態を含んで、特定の酸化還元電位を生成し、タンパク質のシステイン架橋の形成を生じるジスルフィドシャフリングを可能にする。通常使用される酸化還元対のいくつかとしては、システイン／シスタミン、グルタチオン (GSH)／ジチオビスGSH、塩化銅 (II)、ジチオトレイトール (DTT)／ジチアンDTT、および2, 2-メルカプトエタノール (bME)／ジチオ-2 (ME)が挙げられる。多くの場合において、共溶媒が使用され得るか、または再折り畳みの効率を増加するのに必要であり得、この目的のために使用されるより一般的な試薬としては、グリセロール、種々の分子量のポリエチレングリコール、アルギニンなどが挙げられる。

10

【0141】

封入体がIL-1ra-Rポリペプチドの発現において有意な程度まで形成されない場合、ポリペプチドは、主に、細胞ホモジネートの遠心分離後に上清中に見出される。ポリペプチドは、さらに、本明細書中に記載されるような方法を使用して上清から単離され得る。

【0142】

溶液からのIL-1ra-Rポリペプチドの精製は、種々の技術を使用して達成され得る。ポリペプチドが、ヘキサヒスチジン (IL-1ra-Rポリペプチド/hexaHis)のようなタグまたは他の小さなペプチド (例えば、FLAG (Eastman Kodak Co., New Haven, CT) またはmyc (Invitrogen, Carlsbad, CA))をそのカルボキシル末端またはアミノ末端のいずれかにおいて含むように合成された場合、カラムマトリクスがタグについて高い親和性を有するアフィニティーカラムに溶液を通すことによって一工程で精製され得る。

20

【0143】

例えば、ポリヒスチジンは、ニッケルに対して大きな親和性および特異性を有して結合する。従って、ニッケルのアフィニティーカラム (例えば、Qiagen (登録商標) ニッケルカラム) は、IL-1ra-Rポリペプチド/polyHisの精製のために使用され得る。例えば、Current Protocols in Molecular Biology § 10.11.8 (Ausubel et al., eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1993)を参照のこと。

30

【0144】

さらに、IL-1ra-Rポリペプチドは、IL-1ra-Rポリペプチドを特異的に認識し得、そして結合し得るモノクローナル抗体の使用によって精製され得る。

【0145】

精製のための他の適切な手段としては、限定しないが、アフィニティークロマトグラフィー、免疫親和性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、モレキュラーシーブクロマトグラフィー、HPLC、電気泳動 (ネイティブな電気泳動を含む)、続くゲル溶出、および分取用等電集束法 (「Isoprime」machine/technique, Hoefer Scientific, San Francisco, CA)が挙げられる。いくつかの場合において、2つ以上の精製技術を、増加した純度を達成するために組み合わせられ得る。

40

【0146】

IL-1ra-Rポリペプチドはまた、Merrifield et al., 1963, J. Am. Chem. Soc. 85:2149; Houghten et al., 1985, Proc Natl Acad. Sci. USA 82:5132; およびStewart and Young, Solid Phase Peptide Synthesis (Pierce Chemical Co. 1984)に記載されるような当該分野で公知の技術を使用する、化学合成法 (例えば、固相ペプチド合成)によって調製

50

され得る。このようなポリペプチドは、アミノ末端にメチオニンを有するかまたは有さないで合成され得る。化学的に合成された I L - 1 r a - R ポリペプチドは、これらの参考文献に記載される方法を使用して酸化され得て、ジスルフィド結合を形成し得る。化学的に合成された I L - 1 r a - R ポリペプチドは、組換え的に産生されるかまたは天然の供給源から精製される対応する I L - 1 r a - R ポリペプチドに匹敵する生物学的活性を有すると期待され、従って、組換えまたは天然の I L - 1 r a - R ポリペプチドと相互交換可能に使用され得る。

【0147】

I L - 1 r a - R ポリペプチドを得る別の手段は、I L - 1 r a - R ポリペプチドが天然に見出される供給源の組織および／または流体のような生物学的サンプルからの精製による。このような精製は、本明細書中に記載されるようなタンパク質精製のための方法を使用して行われ得る。精製の間、I L - 1 r a - R ポリペプチドの存在が、例えば、組換え的に産生された I L - 1 r a - R ポリペプチドまたはそのペプチドフラグメントに対して調製される抗体を使用してモニターされ得る。

10

【0148】

核酸およびポリペプチドを産生するための多くのさらなる方法は、当該分野において公知であり、この方法は、I L - 1 r a - R ポリペプチドに対して特異性を有するポリペプチドを産生するために使用され得る。例えば、Robertson et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94: 12297-303を参照のこと。これは、mRNAとそのコードされるペプチドとの間の融合タンパク質の産生を記載する。Robertson, 1999, Curr. Opin. Chem. Biol. 3: 268-73もまた参照のこと。さらに、米国特許第5, 824, 469号は、特定の生物学的機能を実行し得るオリゴヌクレオチドを得るための方法を記載する。この手順は、異種プールのオリゴヌクレオチドを生成する工程を包含し、それぞれが、5'ランダム化配列、中心予備選択配列、および3'ランダム化配列を有する。得られる異種プールは、所望の生物学的機能を示さない細胞の集団に導入される。次いで、細胞の亜集団を、所定の生物学的機能を示すものについてスクリーニングする。その亜集団から、所望の生物学的機能を実行し得るオリゴヌクレオチドが単離される。

20

【0149】

米国特許第5, 763, 192号；同第5, 814, 476号；同第5, 723, 323号；および同第5, 817, 483号は、ペプチドまたはポリペプチドを産生するためのプロセスを記載する。これは、確率論的遺伝子またはそのフラグメントを産生し、次いで、確率論的遺伝子によってコードされた1以上のタンパク質を産生する宿主細胞にこれらの遺伝子を導入することによって達成される。次いで、この宿主は、所望の活性を有するペプチドまたはポリペプチドを産生する、これらのクローンを同定するためにスクリーニングされる。

30

【0150】

ペプチドまたはポリペプチドの産生するための別の方法は、Athersys, Inc.によって出願されたPCT/US98/20094 (WO99/15650) (「Random Activation of Gene Expression for Gene Discovery」(RAGE-GD)として知られている)に記載されており、このプロセスは、インサイチュ組換え方法によって、内因性遺伝子の発現または遺伝子の過剰発現の活性化を含む。例えば、内因性遺伝子の発現は、非相同性組換えまたは異常な組換えによって、遺伝子の発現を活性化し得る標的細胞中に、調節配列を組み込むことによって、活性化または増加される。この標的DNAは、まず、放射線に供せられ、そして遺伝子プロモーターが挿入される。このプロモーターは、遺伝子の前方の分岐点に最終的に配置され、遺伝子の転写を開始する。これは、所望のペプチドまたはポリペプチドの発現より生じる。

40

【0151】

これらの方法はまた、包括的なI L - 1 r a - R ポリペプチド発現ライブラリーを作製す

50

るために使用され得、これは、続いて、種々のアッセイ（例えば、生化学的アッセイ、細胞アッセイおよび全生物アッセイ（例えば、植物、マウスなど））において、高スループット表現型スクリーニングのために使用され得ることが理解される。

【0152】

（合成）

本明細書中に記載される核酸およびポリペプチド分子が、組換えおよび他の手段によって産生され得ることは、当業者によって理解される。

【0153】

（選択的結合因子）

用語「選択的結合因子」は、1以上のIL-1ra-Rポリペプチドに対して特異性を有する分子を言及する。適切な選択的結合因子としては、抗体およびその誘導体、ポリペプチド、ならびに小分子が挙げられるが、これらに限定されない。適切な選択的結合因子は、当該分野で公知の方法を使用して調製され得る。本発明の例示的なIL-1RA-Rポリペプチド選択的結合因子は、IL-1RA-Rポリペプチドの特定の部分を結合し得、これにより、ポリペプチドのIL-1ra-Rポリペプチドレセプターへの結合を阻害する。

【0154】

IL-1ra-Rポリペプチドと結合する抗体および抗体フラグメントのような選択的結合因子は、本発明の範囲内である。この抗体は、単一特異的なポリクローナルを含むポリクローナル；モノクローナル（MAb）；組換え；キメラ；ヒト化（例えば、CDR移植化）；ヒト；単鎖；および／または二重特異的；ならびにそれらのフラグメント；改変体；または誘導体であり得る。抗体フラグメントとしては、IL-1RA-Rポリペプチド上のエピトープに結合する抗体の一部を含む。このようなフラグメントの例としては、全長抗体の酵素学的切断によって産生されたFabおよびF(ab')フラグメントが挙げられる。他の結合フラグメントとしては、組換えDNA技術（例えば、抗体可変領域をコードする核酸配列を含む、組換えプラスミドの発現）によって産生されたフラグメントが挙げられる。

【0155】

IL-1ra-Rポリペプチドに対するポリクローナル抗体は、一般に、IL-1ra-Rポリペプチドおよびアジュバンドの複数回の皮下注射または腹腔内注射によって動物（例えば、ウサギまたはマウス）において産生される。IL-1ra-Rポリペプチドをキャリアタンパク質に結合させることは、有用であり得、このタンパク質は、キーホールリンベットヘモシアニン、血清、アルブミン、ウシサイログロブリン、またはダイズトリプシンインヒビターのように、免疫化される種において免疫原性である。また、ミョウバンのような凝集剤は、免疫応答を増強させるために使用される。免疫化後、この動物は採血され、そして血清を、抗IL-1ra-R抗体力価についてアッセイする。

【0156】

IL-1ra-Rポリペプチドに対するモノクローナル抗体は、培地中の連続的細胞株によって抗体分子を産生するために提供される、任意の方法を使用して産生される。モノクローナル抗体を調製するために適切な方法の例は、Kohlerら、1975、Nature 256:495-97のハイブリドーマ法、およびヒトB細胞ハイブリドーマ法（Kozbor、1984、J. Immunol. 133:3001；Brodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications 51-63（Marcel Dekker, Inc., 1987））が挙げられる。IL-1ra-Rポリペプチドと反応する、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株がまた、本発明によって提供される。

【0157】

本発明のモノクローナル抗体は、治療剤として使用するために、改変され得る。1実施形態は、「キメラ」抗体であり、この重鎖（H）および／または軽鎖（L）の一部が、特定の種から誘導されるか、または別の抗体のクラスもしくはサブクラスの属する抗体中の対

10

20

30

40

50

応する配列と同一であるか、または相同性である一方で、この鎖の残りは、別の種から誘導されるか、または特定の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるか、または相同性である。抗体のフラグメントが所望の生物学的活性を示す限り、これらの抗体のフラグメントも含まれる。米国特許第4, 816, 567号; Morrisonら、1985、Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 6851-55を参照のこと。

【0158】

別の実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は、「ヒト化」抗体である。非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該分野で周知である。米国特許第5, 585, 089号および5, 693, 762号を参照のこと。一般に、ヒト化した抗体は、非ヒトである供給源から導入された1以上のアミノ酸残基有する。ヒト化は、例えば、当該分野（Jonesら、1986、Nature 321: 522-25; Riechmannら、1998、Nature 332: 323-27; Verhoevenら、1988、Science 239: 1534-36）で記載される方法を使用して、げっ歯類相補的決定領域（CDR）の少なくとも一部をヒトの抗体の対応する領域と置換することによって、実施され得る。

【0159】

IL-1ra-Rポリペプチドと結合するヒト抗体がまた、本発明によって包含される。内因性の免疫グロブリンの産物の非存在下で、ヒト抗体のレパートリーを産生し得る、トランスジェニック動物（例えば、マウス）を使用して、このような抗体は、IL-1ra-Rポリペプチド抗原（すなわち、少なくとも6連続するアミノ酸を有する）を用いて免疫化することによって産生され、必要に応じて、キャリアに結合される。例えば、Jakobovitsら、1993、Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 2551-55; Jakobovitsら、1993、Nature 362: 255-58; Bruggemannら、1993、Year in Immunol. 7: 33を参照のこと。1つの方法において、このようなトランスジェニック動物は、本明細書中の重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードする内因性遺伝子座を無能にし、そしてヒトの重鎖および軽鎖タンパク質をコードする遺伝子座をそのゲノムに挿入することによって産生される。次いで、部分的に改変された動物（この動物は、完全に相補性ではない改変を有する）は、所望の免疫系の改変の全てを有する動物を得るために交雑される。免疫原が投与される場合、これらのトランスジェニック動物が、ヒト（例えば、マウスではない）アミノ酸配列（このアミノ酸配列は、これらの抗原に対して免疫特異性である可変領域を含む）を有する抗体を産生する。例えば、PCT出願番号PCT/US96/05928およびPCT/US93/06926を参照のこと。さらなる方法は、米国特許第5, 545, 807、PCT出願番号PCT/US91/245およびPCT/GB89/01207、ならびに欧州特許第546073B1および546073A1に記載される。ヒト抗体はまた、宿主細胞中の組換えDNAの発現または本明細書中に記載されるようなハイブリドーマ細胞中での発現によって産生され得る。

【0160】

代替の実施形態において、ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリから産生され得る（Hoogenboomら、1991、J. Mol. Biol. 227: 381; Marksら、1991、J. Mol. Biol. 222: 581）。これらにより、糸状のバクテリオファージの表面上の抗体レパートリーの提示を介した模倣免疫選択、および選択した抗原への結合によるファージの続く選択を処理する。1つのこのような技術は、PCT出願番号PCT/US98/17364に記載されており、これには、このようなアプローチを使用して、MPL-およびmsk-レポーターについて、高い親和性および機能的なアンタゴニスト抗体の単離が記載される。

【0161】

キメラ抗体、CDR移植化抗体、およびヒト化抗体は、代表的に組換え方法によって産生される。抗体をコードする核酸は、宿主細胞中に導入され、そして本明細書中に記載され

10

20

30

40

50

る材料および手順を使用して発現される。好ましい実施形態において、この抗体は、哺乳動物宿主細胞（例えば、CHO細胞）中で産生される。モノクローナル（例えば、ヒト）抗体は、本明細書中に記載されるように、宿主細胞中での組換えDNAの発現またはハイブリドーマ細胞中での発現によって産生され得る。

【0162】

本発明の抗-IL-1ra-R抗体は、IL-1ra-Rポリペプチドの検出および定量のために、任意の公知のアッセイ方法（例えば、競合結合アッセイ、直接的および間接的サンドイッチアッセイ、および免疫沈降アッセイ）において使用され得る（Sola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)）。この抗体は、
10

【0163】

診断適用のために、特定の実施形態において、抗-IL-1ra-R抗体は、検出可能な部分で標識され得る。この検出可能な部分は、直接的または間接的のいずれかで、検出可能なシグナルを産生し得る任意の部分であり得る。例えば、検出可能な部分は、放射性同位体（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、または ^{67}Ga ）；蛍光化合物または化学的蛍光化合物（フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、もしくはルシフェリン）；または酵素（アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、もしくは西洋ワサビペルオキシダーゼ）であり得る（Bayerら、1
20

【0164】

競合結合アッセイは、標識した標準物質（例えば、IL-1ra-Rポリペプチド、またはその免疫学的に反応性な部分）の能力に依存し、限定された量の抗-IL-1ra-R抗体との結合に関して、試験サンプル検体（IL-1ra-Rペプチド）と競合する。試験サンプル中のIL-1ra-Rポリペプチドの量は、抗体と結合する標準物質の量と反比例する。結合する標準物質の量を決定するのを容易にするために、この抗体は、競合前または後に、代表的に不溶化され、その結果この抗体と結合する標準物質および検体は、結合しないままの標準物質および検体から好都合に分離され得る。

【0165】

サンドイッチアッセイは、2つの抗体の使用を代表的にを含み、各々は、決定および／または定量されるタンパク質の異なる免疫部分またはエピトープに結合し得る。サンドイッチアッセイにおいて、この試験サンプル検体は、固体支持体上に固定化される第1抗体によって代表的に結合され、その後、第2抗体が、この検体に結合され、従って不溶の3部の複合体を形成する。例えば、米国特許第4,376,110を参照のこと。第2抗体自体は、検出可能な部分で標識されるか（直接的なサンドイッチアッセイ）、または検出可能な部分で標識される抗-免疫グロブリン抗体を使用して測定され得る（間接的なサンドイッチアッセイ）。例えば、サンドイッチアッセイの1つの型は、酵素結合イムノソルベント検定法（ELISA）（この場合、検出可能な部分は、酵素である）である。
30

【0166】

抗-IL-1ra-R抗体を含む、選択的結合因子はまた、インビボイメージングのために有用である。検出可能な部分で標識した抗体は、動物に、好ましくは、血流に投与され得、宿主中で標識した抗体の存在および位置がアッセイされる。この抗体は、核磁気共鳴、放射線学、または当該分野で公知の他の検出手段のいずれかによって、動物中で検出可能である任意の部分で標識され得る。

【0167】

抗体を含む、本発明の選択的結合因子は、治療剤として使用され得る。これらの治療剤は、一般に、アゴニストまたはアンタゴニストであり、これらは、IL-1ra-Rポリペプチドの少なくとも1つの生物学的活性を、それぞれ増強または減少させるかのいずれかである。1実施形態中で、本発明のアンタゴニスト抗体は、IL-1ra-Rポリペプチ
50

ドに特異的に結合し得、そしてインビボまたはインビトロで I L-1 r a-R ポリペプチドの機能活性を阻害または排除し得る、抗体またはその結合フラグメントである。好ましい実施形態において、選択的結合因子（例えば、アンタゴニスト抗体）は、少なくとも約 50%、および好ましくは、少なくとも約 80%、I L-1 r a-R ポリペプチドの機能活性を阻害する。別の実施形態において、選択的結合アッセイは、I L-1 r a-R ポリペプチド結合パートナー（リガンドまたはレセプター）と相互作用し得る抗-I L-1 r a-R ポリペプチド 抗体であり得、これにより、インビトロまたはインビボにおいて I L-1 r a-R ポリペプチド活性を阻害または排除する。アゴニストおよびアンタゴニスト抗体-I L-1 r a-R ポリペプチド抗体を含む、選択的結合因子は、当該分野で周知であるスクリーニングアッセイによって同定される。

10

【0168】

本発明はまた、I L-1 r a-R 選択的結合因子（例えば、抗体）を含むキットおよび生物学的サンプル中で I L-1 r a-R ポリペプチドレベルを検出するために有用である他の 試薬に関する。このような 試薬は、検出可能な標識、ブロッキングの血清、ポジティブおよびネガティブコントロールサンプル、および検出試薬を含み得る。

【0169】

（マイクロアレイ）

DNA マイクロアレイ技術は、本発明に従って利用され得る ことが理解される。DNA マイクロアレイは、固体支持体（例えば、ガラス）上に配置された核酸の小型高密度アレイである。このアレイ内の各細胞またはエレメントは、相補的核酸配列（例えば、mRNA）とハイブリダイゼーションするための標識として作用する、単一の核酸種の複数のコピーを含む。DNA マイクロアレイ技術を使用する発現プロファイリングにおいて、mRNAは、細胞 サンプルまたは組織 サンプルから まず抽出され、次いで、酵素標識された cDNA を蛍光標識された cDNA に変換する。この材料は、マイクロアレイにハイブリダイズされ、そして未結合の cDNA は、洗浄により除去される。次いで、このアレイ上に示された個々の遺伝子の発現は、各 標的核酸分子に特異的に結合される、標識された cDNA の量を定量することによって視覚化される。この方法において、数千の遺伝子の発現が、生物学的材料の単一サンプルから、高スループットの並行様式で定量され得る。

20

【0170】

この 高スループット発現プロファイリングは、本発明の I L-1 r a-R 分子に関連して 広範の適用を有し、これには、以下が挙げられるが、これに限定されない：治療のための 標的として、I L-1 r a-R 疾患関連遺伝子の同定および確認；関連する I L-1 r a-R 分子およびそのインヒビターの分子毒性；臨床試験のための 代替マーカーの集団および産生の階層化；および 高スループットスクリーニングにおいて、選択化合物の同定を援助することによって、関連する I L-1 r a-R ポリペプチド小分子 薬物探索を増強すること。

30

【0171】

（化学的誘導体）

I L-1 r a-R ポリペプチドの化学的に改変された誘導体は、この開示が、本明細書中に記載され ると、当業者によって調製され得る。I L-1 r a-R ポリペプチド誘導体は、このポリペプチドに天然で結合した分子の型または位置のいずれかで、異なる様式で改変される。誘導体は、1 以上の天然で結合した化学的な基の除去によって形成される分子を含み得る。配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、もしくは配列番号 36、または他の I L-1 r a-R ポリペプチドのいずれかの アミノ酸配列を含むポリペプチドは、1 以上のポリマーの共有結合によって改変され得る。例えば、選択されたポリマーは、代表的に水溶性であり、その結果、結合するタンパク質は、水環境（例えば、生理学的な環境）下で沈殿しない。ポリマーの混合物が、適切なポリマーの範囲内に含まれる。好ましくは、最終生成物の 調製物の治療学的使用のために、このポリマーは、薬学的に受容可能である。

40

【0172】

50

このポリマーの各々は、任意の分子量を有し得、そして分枝または非分枝であり得る。このポリマーの各々は、代表的に、約2 kDaと約100 kDaとの間の平均分子量を有する（この用語「約（およそ）」は、水溶性ポリマーの調製の際に、幾つかの分子が、上記の分子量より多い、いくらか少ない重量を有することを示す）。各ポリマーの平均分子量は、好ましくは、約5 kDaと約50 kDaの間、より好ましくは、約12 kDaと約40 kDaとの間、そして最も好ましくは、約20 kDaと約35 kDaとの間である。

【0173】

適切な水溶性ポリマーまたはその混合物としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：N-連結またはO-連結炭水化物、糖、リン酸、ポリエチレン、グリコール（PEG）（これは、モノー（ C_1-C_{10} ）、アルコキシ、またはアリアルオキシポリエチレングリコールを含む、タンパク質を誘導するために使用されたPEGの形態を含む）、モノメトキシポリエチレングリコール、デキストラン（例えば、低分子量（例えば、約6 kDaのデキストラン））、セルロース、または他の炭水化物ベースのポリマー、ポリ（N-ビニルピロリジン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセロール）、およびポリビニルアルコール。共有結合したIL-Rポリペプチドマルチマーを調製するために使用され得る、二官能性架橋分子もまた、本発明に含まれる。

【0174】

一般に、化学的誘導体化は、活性化したポリマー分子とタンパク質を反応させるために使用される任意の適切な条件下で、実施され得る。ポリペプチドの化学的誘導体を調製するための方法は、以下の工程を包含する：（a）配列番号2、配列番号4、配列番号6、もしくは配列番号36、または他のIL-Rポリペプチドのいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドが、1以上のポリマー分子に結合する条件下で、活性化したポリマー分子（例えば、ポリマー分子の反応性エステルまたはアルデヒド誘導体）とポリペプチドを反応させる工程、ならびに（b）反応生成物を得る工程。最適の反応条件は、既知のパラメータおよび所望の結果に基づいて決定される。例えば、ポリマー分子のタンパク質に対する比が大きくなるほど、結合したポリマー分子の割合も大きくなる。1実施形態において、IL-Rポリペプチド誘導体は、アミノ末端の単一ポリマー分子部分を有する。例えば、米国特許第5,234,784号を参照のこと。

【0175】

ポリペプチドのペギル化（pegylation）は、当該分野で公知の任意のペギル化反応を使用して特異的に実施され得る。このような反応は、例えば、以下の参考文献に記載されている：Francisら, 1992, Focus on Growth Factors 3:4-10；欧州特許第0154316号および0401384号；ならびに米国特許第4,179,337号。例えば、ペギル化は、本明細書中に記載されるように、反応性ポリエチレングリコール分子（または、類似の反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実施され得る。アシル化反応のために、選択されたポリマーは、単一の反応性エステル基を有する。還元的アルキル化について、選択されたポリマーは、単一の反応性アルデヒド基を有する。例えば、反応性アルデヒドは、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドであり、これは、水安定性、またはモノ C_1-C_{10} アルコキシもしくはそのアリアルオキシ誘導体である（米国特許第5,252,714号を参照のこと）。

【0176】

別の実施形態において、IL-Rポリペプチドは、ビオチンに化学的に連結され得る。次いで、このビオチン／IL-Rポリペプチド分子は、アビジンに結合され得、その結果、4価のアビジン／ビオチン／IL-Rポリペプチド分子が得られる。IL-Rポリペプチドはまた、ジニトロフェノール（DNP）またはトリニトロフェノール（TNP）に共有結合され得、そして得られた結合体は、抗-DNPまたは抗-TNP-IgMと共に沈殿し、10価の十量体の結合体を形成する。

【0177】

一般に、本発明の I L - 1 r a - R ポリペプチド誘導体の投与によって、緩和または調節され得る条件は、I L - 1 r a - R ポリペプチドについて本明細書中に記載されたものを含む。しかし、本明細書中に開示される I L - 1 r a - R ポリペプチド誘導体は、非誘導体化分子と比較した場合、さらなる活性、増強または減少した生物学的活性、または他の特性（例えば、増加または減少した半減期）を有し得る。

【0178】

（遺伝子操作した非ヒト動物）

マウス、ラット、または他のげっ歯類；ウサギ、ヤギ、ヒツジ、または他の家畜のような非ヒト動物が、さらに本発明の範囲内に含まれ、ここで、天然の I L - 1 r a - R ポリペ

10

【0179】

本発明は、マウス、ラット、または他のげっ歯類；ウサギ、ヤギ、ヒツジ、または他の家畜のような非ヒト動物をさらに含み、この動物の I L - 1 r a - R 遺伝子の天然の形態または非相同性 I L - 1 r a - R 遺伝子のいずれかが、動物によって過剰発現され、これによって、「トランスジェニック」動物を作製する。このようなトランスジェニック動物は、

20

【0180】

本発明は、非ヒト動物をさらに含み、ここで、本発明の 1 以上の I L - 1 r a - R ポリペプチドのプロモーターは、（例えば、相同的な組換え方法を使用することによって）活性化されるか、または活性化されず、1 以上の I L - 1 r a - R ポリペプチドの発現のレベルを改変する。

【0181】

これらの非ヒト動物は、薬物候補物スクリーニングのために使用され得る。このようなスクリーニングにおいて、動物での薬物候補物の影響が測定され得る。例えば、薬物候補物は、I L - 1 r a - R 遺伝子の発現を減少または増加させ得る。特定の実施形態において、

30

【0182】

（I L - 1 r a - R ポリペプチド活性の他の修飾因子についてのアッセイ）

いくつかの状態において、I L - 1 r a - R ポリペプチドの活性の修飾因子である分子（例えば、アゴニストまたはアンタゴニスト）を同定することが所望され得る。I L - 1 r a - R ポリペプチドを調節する天然または合成分子は、本明細書中に記載されるように、1 以上のスクリーニングアッセイを使用して同定され得る。このような分子は、インビボ様式またはインビトロ様式のいずれかで、注射、または経口送達、移植デバイスなどによって投与され得る。

40

【0183】

「試験分子」とは、I L - 1 r a - R ポリペプチドの活性を調節する（すなわち、増加または減少させる）ための能力について評価する分子を言う。最も一般的に、試験分子は、

50

IL-1ra-Rポリペプチドと直接的に相互作用する。しかし、試験分子はまた、例えば、IL-1ra-R遺伝子発現に影響を与えることによって、またはIL-1ra-Rポリペプチド結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）に結合することによって、IL-1ra-Rポリペプチド活性を直接的に調節し得る。1実施形態において、試験分子は、少なくとも約 10^{-6} M、好ましくは、約 10^{-8} M、より好ましくは、約 10^{-9} M、そしてさらにより好ましくは約 10^{-10} Mの親和性定数（affinity constant）でIL-1ra-Rポリペプチドと結合する。

【0184】

IL-1ra-Rポリペプチドと相互作用する化合物を同定するための方法は、本発明によって包含される。特定の実施形態において、IL-1ra-Rポリペプチドは、試験分子とIL-1ra-Rポリペプチドとの相互作用が可能な条件下で、試験分子と共にインキュベートされ、そして相互作用の範囲が測定される。試験分子は、実質的に精製された形態または粗製の混合物中でスクリーニングされ得る。

10

【0185】

特定の実施形態において、IL-1ra-Rポリペプチドアゴニストまたはアンタゴニストは、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質、または低分子量の分子であり得、これは、IL-1ra-Rポリペプチドと相互作用して、その活性を調節する。IL-1ra-Rポリペプチドの発現を調節する分子は、IL-1ra-Rポリペプチドをコードする核酸と相補的であるか、またはIL-1ra-Rポリペプチドの発現を指向または制御する核酸配列に対して相補的である核酸分子、および発現のアンチセンス制御因子として作用する核酸分子を含む。

20

【0186】

一旦、IL-1ra-Rポリペプチドと相互作用する場合に、試験化合物が、同定されると、この分子は、IL-1ra-Rポリペプチド活性を増加または減少させる能力についてさらに評価され得る。試験分子とIL-1ra-Rポリペプチドとの相互作用の測定は、いくつかの形態で実施され得、これには、細胞ベースの結合アッセイ、膜結合アッセイ、液相アッセイ、および免疫アッセイが挙げられる。一般に、試験分子は、特定の期間、IL-1ra-Rポリペプチドと共にインキュベートされ、そしてIL-1ra-Rポリペプチド活性が、生物学的活性を測定するために1以上のアッセイによって決定される。

【0187】

試験分子とIL-1ra-Rポリペプチドとの相互作用はまた、免疫アッセイにおいて、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を使用して直接的にアッセイされ得る。あるいは、本明細書中に記載されるようなエピトープタグを含むIL-1ra-Rポリペプチドの改変形態は、溶液および免疫アッセイ中で使用され得る。

30

【0188】

IL-1ra-Rポリペプチドが、結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）との相互作用を介して、生物学的活性を示す場合において、種々のインビトロアッセイが、対応する結合パートナー（選択的結合因子、レセプター、またはリガンド）へのIL-1ra-Rポリペプチドの結合を測定するために使用され得る。これらのアッセイは、結合パートナーに対するIL-1ra-Rポリペプチドの結合の速度および／または速度を増加または減少させるために、試験分子をスクリーニングするために使用され得る。1アッセイにおいて、IL-1ra-Rポリペプチドは、マイクロタイタープレートのウェル中に固定化される。次いで、放射標識したIL-1ra-Rポリペプチド結合パートナー（例えば、ヨウ素化したIL-1ra-Rポリペプチド結合パートナー）および試験化合物は、このウェルに、一時に一方を（いずれかの順序で）または同時に添加され得る。インキュベーション後に、この壁を洗浄し、そしてシンチレーション計数器を使用して、放射活性を計数し、結合パートナーがIL-1ra-Rポリペプチドに結合する範囲を決定する。代表的に、分子は、濃度範囲にわたって試験され、そして試験アッセイの1以上を欠く一連のコントロールウェルは、結果の評価の正確性のために使用され得る。この方法の代わりは、タンパク質の「位置」を逆にする工程を逆にする工程（すなわち、マイク

40

50

ロタイタープレートウェルに I L - 1 r a - R ポリペプチド結合パートナーを固定化し、試験分子および放射標識した I L - 1 r a - R ポリペプチドをインキュベートし、そして I L - 1 r a - R ポリペプチド結合の範囲を決定する工程) を包含する。例えば、C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y、第 18 章 (A u s u b e l ら編、G r e e n P u b l i s h e r s I n c. ならびに W i l e y および S o n s 1995) を参照のこと。

【0189】

放射性標識に対する代替として、I L - 1 r a - R ポリペプチドまたはその結合パートナーは、ビオチンと結合体化され得、そしてビオチン化されたタンパク質の存在が、次いで、酵素 (例えば、わさびペルオキシダーゼ (H R P) またはアルカリホスファターゼ (A P)) に結合したストレプトアビジンを使用して検出され得、これらは、比色定量的に検出され得るか、またはストレプトアビジンの蛍光タグ化によって検出され得る。I L - 1 r a - R ポリペプチドまたは I L - 1 r a - R ポリペプチド結合パートナー (これらは、ビオチンに結合されている) に対する抗体はまた、A P または H R P に連結した酵素連結ストレプトアビジンとの複合体のインキュベーションに続いて、検出の目的のために使用され得る。

【0190】

I L - 1 r a - R ポリペプチドまたは I L - 1 r a - R ポリペプチド結合パートナーは、アガロースビーズ、アクリルビーズ、または他の型のこのような不活性な固体相基材への付着によって固定化され得る。基材-タンパク質複合体は、相補タンパク質および試験化合物を含む溶液内に配置され得る。インキュベーション後、これらのビーズは、遠心分離によって沈澱され得、そして I L - 1 r a - R ポリペプチドとその結合パートナーとの間の結合の量が、本明細書中に記載の方法を使用して評価され得る。あるいは、基材-タンパク質複合体は、カラムを通過する、試験分子および相補タンパク質を用いてカラム内に固定化され得る。I L - 1 r a - R ポリペプチドとその結合パートナーとの間の複合体の形成が、次いで、本明細書中に記載の技術 (例えば、放射性標識または抗体結合) のいずれかを使用して評価され得る。

【0191】

I L - 1 r a - R ポリペプチド結合タンパク質と I L - 1 r a - R ポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少させる試験分子を同定するために有用な別のインビトロアッセイは、表面プラズモン共鳴検出器システム (例えば、B I A c o r e アッセイシステム (P h a r m a c i a, P i s c a t a w a y, N J)) である。B I A c o r e システムは、製造業者によって特定されるように利用される。このアッセイは、本質的に、I L - 1 r a - R ポリペプチドまたは I L - 1 r a - R ポリペプチド結合パートナーのいずれかの、デキストランでコートされたセンサーチップ (これは、検出器に存在する) への共有結合を含む。次いで、この試験化合物および他の相補タンパク質が、同時にかまたは連続的にかのいずれかで、センサーチップを含むチャンバーに注入され得る。結合する相補タンパク質の量は、センサーチップのデキストランコート側面に物理的に関係する分子の質量の変化に基づいて評価され得、この分子の質量の変化は、検出器システムによって測定される。

【0192】

いくつかの場合において、2 つ以上の試験化合物と一緒に、I L - 1 r a - R ポリペプチドと I L - 1 r a - R ポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少させるそれらの能力について評価することが所望され得る。これらの場合において、本明細書中に記載のアッセイは、第一の試験化合物と同時に、またはそれに続いてのいずれかで、このようなさらなる試験化合物を添加することによって容易に改変され得る。このアッセイにおける工程の残りは、本明細書中に記載される。

【0193】

インビトロアッセイ (例えば、本明細書中に記載されるもの) は、I L - 1 r a - R ポリペプチドと I L - 1 r a - R ポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成に対する

10

20

30

40

50

効果について、多数の化合物をスクリーニングするために、有利に使用され得る。これらのアッセイは、ファージディスプレイ、合成ペプチド、および化学合成ライブラリーにおいて生成された化合物をスクリーニングするために、自動化され得る。

【0194】

IL-1ra-RポリペプチドとIL-1ra-Rポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少される化合物はまた、IL-1ra-RポリペプチドまたはIL-1ra-Rポリペプチド結合パートナーFのいずれかを発現する細胞および細胞系列を使用して、細胞培養物においてスクリーニングされ得る。細胞および細胞系列は、任意の哺乳動物から得られ得るが、好ましくは、ヒト、または他の霊長類、イヌ類またはげっ歯類の供給源由来である。IL-1ra-Rポリペプチドの、IL-1ra-Rポリペプチド結合パートナーを発現する細胞への、その表面での結合は、試験化合物の存在または非存在下で評価され、そして結合の程度が、例えば、IL-1ra-Rポリペプチド結合パートナーに対するビオチン化抗体を使用するフローサイトメトリーによって決定され得る。細胞培養アッセイは、本明細書中に記載されるタンパク質結合アッセイにおいて、陽性であるとスコア付けされる化合物をさらに特徴付けするために有利に使用され得る。

10

【0195】

細胞培養物はまた、薬物候補の影響をスクリーニングするために使用され得る。例えば、薬物候補は、IL-1ra-R遺伝子の発現を減少または増加させ得る。特定の実施形態において、生成されるIL-1ra-RポリペプチドまたはIL-1ra-Rポリペプチドフラグメントの量は、細胞培養物の薬物候補への曝露の後に測定され得る。特定の実施形態において、細胞培養物への薬物候補の実質的な影響が検出され得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現は、細胞培養物への特定の影響を有し得る。このような場合に、遺伝子の発現を増加または減少させる薬物候補の能力、または細胞培養物に対する特定の影響を予防または阻害するその能力が試験され得る。他の例において、特定の代謝産物（例えば、ポリペプチドのフラグメントなど）の生成が、疾患または病的状態を生じ得るか、またはそれらに関連し得る。このような場合、細胞培養物におけるこのような代謝産物の生成を減少する薬物候補の能力が試験され得る。

20

【0196】

（内部移行タンパク質）

30

tatタンパク質配列（HIV由来）が、タンパク質を細胞内に内部移行させるために、使用され得る。例えば、Falwellら、1994、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91:664-68を参照のこと。例えば、HIV tatタンパク質の11アミノ酸の配列（Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R；配列番号18）（「タンパク質形質導入ドメイン」、またはTAT-PDTを称される）は、細胞の細胞質膜および核膜を横切る送達を媒介するとして記載されている。Schwarzeら、1999、Science 285:1569-72；およびNagaharaら、1998、Nat. Med. 4:1449-52を参照のこと。これらの手順において、FITC構築物（FITC標識G-G-G-G-Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R；配列番号19）（これは、腹腔内投与に続いて組織を貫通する）が調製され、そしてこのような構築物の細胞への結合が、蛍光細胞分析分離（FACS）分析によって検出される。tat-β-gal融合タンパク質で処置された細胞は、β-gal活性を示す。注入に続いて、このような構築物の発現が、多くの組織（肝臓、腎臓、肺、心臓および脳組織）において検出され得る。このような構築物は、細胞に入るためにある程度の変性を受け、そしてそれ自体、細胞内への移入に続いて、再折り畳みを必要とし得ると考えられる。

40

【0197】

従って、tatタンパク質配列は、所望のポリペプチドを細胞に内部移入させるために使用され得ることが理解される。例えば、tatタンパク質配列を使用して、IL-1ra-Rアンタゴニスト（例えば、抗IL-1ra-R選択的結合因子、低分子、可溶性レセ

50

プター、またはアンチセンスオリゴヌクレオチド)は、IL-1ra-R分子の活性を阻害するために、細胞内投与され得る。本明細書中で使用される場合、用語「IL-1ra-R分子」は、本明細書中に規定されるような、IL-1ra-R核酸分子およびIL-1ra-Rポリペプチドの両方をいう。所望ならば、IL-1ra-Rタンパク質自体はまた、これらの手順を使用して、細胞に内部投与され得る。Straus, 1999, Science 285:1466-67をまた参照のこと。

【0198】

(IL-1ra-Rポリペプチドを使用する細胞供給源の同定)

本発明の特定の実施形態に従って、IL-1ra-Rポリペプチドと関連する特定の細胞型の供給源を決定することを可能することが有用であり得る。例えば、適切な治療を選択する際の補助として疾患または病的状態の起源を決定することが有用であり得る。特定の実施形態において、IL-1ra-Rポリペプチドをコードする核酸は、プローブとして使用されて、このようなプローブを用いて細胞の核酸をスクリーニングすることによって、本明細書中に記載の細胞を同定し得る。他の実施形態において、抗IL-1ra-Rポリペプチド抗体を使用して、細胞におけるIL-1ra-Rポリペプチドの存在について試験し得、従って、このような細胞が本明細書中に記載される型の細胞か否かを決定し得る。

10

【0199】

(IL-1ra-Rポリペプチド組成物および投与)

治療組成物は、本発明の範囲内である。このようなIL-1ra-Rポリペプチド薬学的組成物は、治療有効量のIL-1ra-RポリペプチドまたはIL-1ra-R核酸分子を、投与の様式と適合するように選択された薬学的にまたは生理学的に受容可能な処方薬剤との混合物中に、含み得る。薬学的組成物は、治療有効量の1以上のIL-1ra-Rポリペプチド選択的結合因子を、投与の様式と適合するように選択された薬学的にまたは生理学的に受容可能な処方薬剤との混合物中に、含み得る。

20

【0200】

受容可能な処方物材料は、好ましくは、使用される投薬量および濃度で、レシピエントに対して非毒性である。

【0201】

薬学的組成物は、例えば、pH、浸透圧、粘度、清澄性、色、等張性、におい、無菌性、安定性、解離または放出の速度、吸着、または組成物の浸透を改変、維持または保存するための処方物材料を含み得る。適切な処方物材料としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、またはリジン）、抗菌剤、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム、または亜硫酸水素ナトリウム (sodium hydrogen-sulfite)）、緩衝液（例えば、ホウ酸塩、炭酸水素塩、Tris-HCl、クエン酸塩、リン酸塩、または他の有機酸）、バルキング剤（例えば、マンニトールまたはグリシン）、キレート化剤（エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)）、複合体化剤（例えば、カフェイン、ポリビニルピロリドン、β-シクロデキストリン、またはヒドロキシプロピルβ-シクロデキストリン）、フィラー、単糖類、二糖類、および他の炭水化物（例えば、グルコース、マンノースまたはデキストリン）、タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン）、着色剤、味付け剤および希釈剤、乳化剤、親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）、低分子量ポリペプチド、塩形成対イオン（例えば、ナトリウム）、保存剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸、または過酸化水素）、溶媒（例えば、グリセリン、プロピレングリコール、またはポリエチレングリコール）、糖アルコール（例えば、マンニトールまたはソルビトール）、懸濁剤、表面活性剤または湿潤剤（例えば、プルロニック (pluronic)；PEG；ソルビタンエステル；ポリソルビテート（例えば、polysorbate 20またはpolysorbate 80）；トリトン；トロメタミン；レシチン；コレステロール

30

40

50

ルまたはチロキサポール (tyloxapal)、安定性増強剤 (例えば、スクロースまたはソルビトール)、張度増強剤 (例えば、ハロゲン化アルカリ金属 (好ましくは塩化ナトリウムまたは塩化カリウム)、またはマンニトール、ソルビトール)、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および/または薬学的なアジュバント。Remington's Pharmaceutical Sciences (第18版, A. R. Gennaro, 編, Mack Publishing Company 1990を参照のこと。

【0202】

最適な薬学的組成物は、当業者によって、例えば、意図される投与経路、送達形式、および所望の投薬量に依存して決定される。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 前出を参照のこと。このような組成物は、IL-1ra-R分子の、物理的な状態、安定性、インビボ放出の速度、およびインビボクリアランスの速度に影響し得る。

10

【0203】

薬学的組成物における主要なビヒクルまたはキャリアは、本来水性または非水性のいずれかであり得る。例えば、注入のための適切なビヒクルまたはキャリアは、水、生理学的な生理食塩水溶液、または人工脳脊髄液であり、おそらく非経口投与のための組成物において一般的な他の材料で補充されている。中性の緩衝化生理食塩水または血清アルブミンと混合された生理食塩水は、さらなる例示的なビヒクルである。他の例示的な薬学的組成物は、約pH7.0-8.5のTris緩衝液または約pH4.0-5.5の酢酸塩緩衝液を含み、これはさらに、ソルビトールまたは適切な置換物を含み得る。本発明の1つの実施形態において、IL-1ra-Rポリペプチド組成物は、所望の程度の純度を有する選択された組成物を、任意の処方薬剤 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 前出) と混合することによって、凍結乾燥ケーキまたは水溶液の形態で、保存のために調製され得る。さらに、IL-1ra-Rポリペプチド産物は、スクロースのような適切な賦形剤を使用して凍結乾燥物として処方され得る。

20

【0204】

このIL-1ra-Rポリペプチドの薬学的組成物は、非経口送達のために選択され得る。あるいは、これらの組成物は、吸入または消化管を介する送達 (例えば、経口的に) のために、選択され得る。このような薬学的に受容可能な組成物の調製は、当該分野の技術内にある。

30

【0205】

処方成分が、投与の部位に受容可能な濃度で存在する。例えば、緩衝液は、生理学的pHまたは多少より低いpH (典型的に、約5~約8のpH範囲内) にこの組成物を維持するために使用される。

【0206】

非経口投与が意図される場合、本発明における使用のための治療組成物は、薬学的に受容可能なビヒクルに所望のIL-1ra-R分子を含む、発熱物質を含まない非経口的に受容可能な水溶液の形態であり得る。非経口注入のために特に適切なビヒクルは、滅菌蒸留水であり、ここで、IL-1ra-R分子が、滅菌で、等張溶液として処方され、適切に保存される。なお別の調製は、所望の分子と、薬剤 (例えば、注入可能なミクロスフィア、生体侵食 (bio-erodible) 薬剤、ポリマー化合物 (ポリ乳酸またはポリグリコール酸)、ビーズまたはリポソーム) との処方物に関係し、これは、次いで蓄積注射を介して送達され得る産物の制御されたまたは持続された放出を提供し得る。ヒアルロン酸がまた、使用され得、そしてこれは、循環において、維持された持続時間を促進する効果を有し得る。所望の分子の導入のための他の適切な手段は、移植可能な薬物送達デバイスを含む。

40

【0207】

1つの実施形態において、薬学的組成物は、吸入のために処方され得る。例えば、IL-1ra-Rポリペプチドは、吸入のための乾燥粉末として処方され得る。IL-1ra-Rポリペプチドまたは核酸分子の吸入溶液はまた、エアロゾル送達のための噴霧体と共に

50

処方され得る。なお別の実施形態において、溶液は、噴霧され得る。肺投与が、PCT公開番号WO94/20069にさらに記載され、これは化学的に改変されたタンパク質の肺送達を記載する。

【0208】

特定の処方物が、経口投与され得ることがまた意図される。本発明の1つの実施形態において、このよう様式で投与されるIL-1ra-Rポリペプチドが、固体投薬形態（例えば、錠剤またはカプセル）の調合において慣用的に使用されるキャリアを伴うか、または伴わず処方され得る。例えば、カプセルは、バイオアベイラビリティが最大化され、そして前全身分解が最小化される場合、胃腸管内で処方物の活性部分を放出するように設計され得る。さらなる薬剤が、IL-1ra-Rポリペプチドの吸収を容易にするために含まれ得る。希釈剤、味付け剤、低融点ワックス、植物油、潤滑剤、懸濁剤、錠剤崩壊剤、およびバインダーがまた、使用され得る。

10

【0209】

別の薬学的組成物は、錠剤の製造に適切な非毒性賦形剤との混合物中に、有効量のIL-1ra-Rポリペプチドを含み得る。錠剤を滅菌水または別の適切なビヒクルに溶解することによって、溶液が、単位用量形態で調製され得る。適切な賦形剤は以下を含むが、これらに限定されない：不活性な希釈剤（炭酸カルシウム、炭酸ナトリウムまたは炭酸水素ナトリウム、ラクトース、あるいはリン酸カルシウム）；または結合剤（例えば、デンプン、ゼラチンまたはアラビアゴム）；あるいは潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルク）。

20

【0210】

さらなるIL-1ra-Rポリペプチドの薬学的組成物は、当業者に明らかであり、持続または制御送達処方物中にIL-1ra-Rポリペプチドを含む処方物を含む。種々の他の持続または制御送達手段（例えば、リポソームキャリア、生体侵食マイクロスフィアあるいは多孔性ビーズおよび蓄積注射）を処方するための技術はまた、当業者に公知である。例えば、PCT/US93/00829（これは、薬学的組成物の送達のための多孔性ポリマー性マイクロ粒子の制御放出を記載する）を参照のこと。

【0211】

徐放性調製物のさらなる例としては、成形された物品の形態（例えば、フィルム、またはマイクロカプセル）の半透過性ポリマーマトリックスを含む。徐放性マトリックスとしては、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号および欧州特許第058481号）、L-グルタミン酸と γ -エチルーL-グルタメートとのコポリマー（Sidmanら, 1983, Biopolymers 22:547-56）、ポリ（2-ヒドロキシエチルーメタクリレート）（Langerら, 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277およびLanger, 1982, Chem. Tech. 12:98-105）、エチレンビニルアセテート（Langerら, 前出）またはポリ-D（-）-3-ヒドロキシ酪酸（欧州特許第133988号）。徐放性組成物はまた、リポソームを含み得、これは、当該分野で公知のいくつかの方法のいずれかによって調製され得る。例えば、Eppsteinら, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-92；および欧州特許第036676号、同第088046号、および同第143949号を参照のこと。

30

40

【0212】

インビボ投与のために使用されるIL-1ra-Rの薬学的組成物は、代表的に滅菌でなければならない。このことは、滅菌濾過膜を介する濾過によって達成され得る。組成物が、凍結乾燥される場合、この方法を使用する滅菌は、凍結乾燥および再構成の前に、またはそれに続いてのいずれかで実施され得る。非経口投与のための組成物は、凍結乾燥された形態または溶液で保存され得る。さらに、非経口組成物は、一般に、滅菌アクセスポートを有する容器（例えば、静脈内溶液バッグまたは皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有するバイアル）内に配置される。

【0213】

50

一旦、薬学的組成物が処方されると、それは、滅菌バイアル中に溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固体、または脱水和粉末または凍結乾燥粉末として保存され得る。このような処方物は、すぐに使用できる形態または投与の前に再構成を必要とする形態（凍結乾燥された形態）のいずれかで保存され得る。

【0214】

特定の実施形態において、本発明は、単一用量投与単位を生成するためのキットに関する。このキットは、各々、乾燥タンパク質を有する第一の容器および水性処方物を有する第二の容器の両方を含み得る。また、本発明の範囲内には、単一および多チャンバーの予め充填されたシリンジ（例えば、液体シリンジおよび分散シリンジ（*lysyringe*））を含むキットが含まれる。

10

【0215】

治療的に使用される *IL-1ra-R* の薬学的組成物の有効量は、例えば、治療の内容および目的に依存する。当業者は、処置のための適切な投薬レベルが、従って、送達される分子、*IL-1ra-R* 分子が使用されている指標、投与の経路、および患者のサイズ（体重、体表面、または器官の大きさ）および状態（年齢および一般的な健康）に、部分的に依存して変化することを理解する。従って、臨床家は、最適な治療効果を得るために、投薬量を力価決定し（*titer*）、投与経路を改変し得る。代表的な投薬量は、上記の因子に依存して、約 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ～ 約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ 以上までの範囲であり得る。他の実施形態において、投薬量は、 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ～ 約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ まで；または $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ～ 約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ まで；または $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ～ 約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ までの範囲であり得る。

20

【0216】

投薬の頻度は、使用される処方物中での *IL-1ra-R* 分子の薬物動態学のパラメーターに依存する。典型的に、臨床家は、所望の効果を達成する投薬量に達するまで組成物を投与する。組成物は、従って、組成物が、経時的な単一用量として、2以上の用量（これは、同量の所望の分子を含んでも、含まなくてもよい）として、あるいは移植デバイスまたはカテーテルを介する連続的な注入として、投与され得る。適切な投薬量のさらなる改良は、当業者によって慣用的になされ、そしてそれらによって慣用的に実施される課題の範囲内である。適切な投薬量は、適切な用量-応答データの使用を介して確認され得る。

【0217】

薬学的組成物の投与の経路は、例えば、以下のような公知の方法と一致する：経口的に；静脈内、腹腔内、脳内（実質内の）、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、門脈内、または病巣内の経路による注入を介して；徐放性系によって；または移植デバイスによって。所望される場合、これらの組成物は、ボーラス注射によって投与され得るか、または注入によって連続的に投与され得るか、または移植デバイスによって投与され得る。

30

【0218】

あるいはまたはさらに、組成物は、その上に所望の分子が吸収されるかまたはカプセル化される膜、スポンジ、または他の適切な材料の移植を介して局所的に投与され得る。移植デバイスが使用される場合、このデバイスは、任意の適切な組織または器官に移植され得、そして所望の分子の送達は、拡散、時限放出ボーラスまたは連続的な投与を介し得る。

40

【0219】

いくつかの場合において、エキソピボ様式において、*IL-1ra-R* ポリペプチドの薬学的組成物を使用することが所望され得る。このような例において、患者から除去された細胞、組織、または器官は、これらの細胞、組織、または器官が引き続いて患者に移植して戻された後に *IL-1ra-R* ポリペプチドの薬学的組成物に曝露される。

【0220】

他の場合において、*IL-1ra-R* ポリペプチドは、本明細書中に記載される方法を使用して、遺伝的に操作されて、*IL-1ra-R* ポリペプチドを発現および分泌する特定の細胞を移植することによって送達され得る。このような細胞は、動物またはヒト細胞であり得、そして自己、異種、または外因性の細胞であり得る。必要に応じて、細胞は、不

50

死化され得る。免疫学的応答の機会を減少するために、細胞は、周囲の組織の浸潤を回避するために、カプセル化され得る。カプセル化材料は、典型的に、生体適合性の半浸透性ポリマー性包囲物または膜であり、これらは、タンパク質産物の放出を可能にするが、患者の免疫系または周囲の組織からの他の有害な因子による細胞の破壊を防止する。

【0221】

本明細書中において議論されるように、単離された細胞集団（例えば、幹細胞、リンパ球、赤血球、軟骨細胞、ニューロンなど）を1つ以上のIL-1ra-Rポリペプチドで処理することが、望ましくあり得る。このことは、このポリペプチドが細胞膜に対して透過性の形態である場合には、単離された細胞をこのポリペプチドに直接曝露することによって達成され得る。

10

【0222】

本発明のさらなる実施形態は、治療ポリペプチドのインビトロ産生と、遺伝子治療または細胞治療による治療ポリペプチドの産生および送達との両方のための、細胞および方法（例えば、相同組換えおよび／または他の組換え産生方法）に関する。相同組換えおよび他の組換えの方法を使用して、通常は転写に対してサイレントなIL-1ra-R遺伝子（すなわち、過少発現される遺伝子）を含む細胞を改変し得、これによって、治療有効量のIL-1ra-Rポリペプチドを発現する細胞を産生し得る。

【0223】

相同組換えは、もともとは、遺伝子を標的化して転写活性な遺伝子における変異を誘導するか、または修正するために開発された技術である。Kucherlapati, 1989, Prog. in Nucl. Acid Res. & Mol. Biol. 36:301。基本的な技術が、特定の変異を哺乳動物ゲノムの特定の領域に導入するため（Thomasら、1986, Cell 44:419-28; ThomasおよびCapecci, 1987, Cell 51:503-12; Doetschmanら、1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85:8583-87）、または欠損遺伝子における特定の変異を修正するため（Doetschmanら、1987, Nature 330:576-78）の方法として、開発された。例示的な相同組換え技術は、米国特許第5,272,071号；欧州特許第9193051号および同第505500号；PCT/US90/07642、ならびにPCT公開番号WO 91/09955）に記載されている。

20

30

【0224】

相同組換えによって、ゲノムに挿入されるべきDNA配列は、このDNA配列に標的化DNAを結合することによって、目的の遺伝子の特定の領域に指向され得る。この標的化DNAは、ゲノムDNAの領域に相補的（相同）であるヌクレオチド配列である。ゲノムの特定の領域に対して相補的な標的化DNAの小さな断片は、DNA複製プロセスの間に親鎖と接触される。これは、細胞に挿入されて、共有される相同領域を介して内因性DNAの他の断片とハイブリダイズし、そして従って、その内因性DNAの他の断片と組み換わる、DNAの一般的特性である。この相補鎖に、変異または異なる配列あるいはさらなるヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドが結合される場合には、このオリゴヌクレオチドもまた、この組換えの結果としてその新たに合成された鎖に組み込まれる。ブルーフリーディング機能の結果として、DNAのこの新たな配列がテンプレートとして働くことが可能である。従って、この移入されたDNAは、ゲノムに組み込まれる。

40

【0225】

IL-1ra-Rポリペプチドと相互作用し得るかまたはその発現を制御し得るDNAの領域（例えば、隣接配列）に、標的化DNAのこれらの断片を結合する。例えば、プロモーター／エンハンサーエレメント、サプレッサ、または外因性転写調節エレメントが、意図される宿主細胞のゲノムにおいて、所望のIL-1ra-RポリペプチドをコードするDNAの転写に影響を与えるに十分な近接性および方向で、挿入される。制御エレメントは、この宿主細胞ゲノムに存在するDNAの一部を制御する。従って、所望のIL-1ra-Rポリペプチドの発現は、IL-1ra-R遺伝子自体をコードするDNAのラン

50

スフェクションによってではなく、むしろ、IL-1 α -R遺伝子の転写のための認識可能なシグナルを有する内因性遺伝子配列を提供するDNA調節セグメントと結合した標的化DNA（目的の内因性遺伝子と相同の領域を含む）の使用によって、達成され得る。

【0226】

例示的な方法において、細胞における所望の標的遺伝子（すなわち、所望の内因性細胞遺伝子）の発現は、予め選択された部位における細胞ゲノムへの相同組換えを介して、少なくとも調節配列、エキソン、およびスプライスドナー部位を含むDNAの導入によって、変更される。これらの構成成分は、新たな転写単位の産生を実際に生じるような様式で、染色体（ゲノム）DNAに導入される（ここで、DNA構築物に存在する調節配列、エキソン、およびスプライスドナー部位は、内因性遺伝子に作動可能に連結される）。染色体DNAへのこれらの構成成分の導入の結果として、所望の内因性遺伝子の発現が変化する。

10

【0227】

本明細書中で記載されるように、変化された遺伝子発現は、得られたままの細胞において通常にはサイレントな（発現されていない）遺伝子を活性化すること（または発現させること）、ならびに得られたままの細胞において生理学的に有意なレベルでは発現されない遺伝子の発現を増加させることを包含する。この実施形態はさらに、調節または誘導のパターンを変化させる工程を包含し、その結果、このパターンは、得られたままの細胞において生じる調節または誘導のパターンとは異なり、そしてその得られたままの細胞において発現される遺伝子の発現を減少（排除を含む）させる。

20

【0228】

細胞の内在性IL-1 α -R遺伝子からのIL-1 α -Rポリペプチドの産生を増加するかまたはこれを引き起こすために相同組換えが使用され得る、1つの方法は、最初に、相同性組換えを使用して、部位特異的組換え系由来の組換え配列（例えば、Cre/loxP、FLP/FRT）（Sauer, 1994, Curr. Opin. Biotechnol., 5: 521-2; Sauer, 1993, Methods Enzymol., 225: 890-900）を、その細胞の内在性ゲノムIL-1 α -Rポリペプチドコード領域の上流（すなわち、5'側）に配置する工程を包含する。ゲノムIL-1 α -Rポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置されたこの部位に対して相同性の組換え部位を含むプラスミドは、適切なリコンビナーゼ酵素と共に、その改変された細胞株に導入される。このリコンビナーゼは、このプラスミドを、このプラスミドの組換え部位を介して、この細胞株のゲノムIL-1 α -Rポリペプチドコード領域のすぐ上流に位置するその組換え部位に組込む（BaubonisおよびSauer, 1993, Nucleic Acids Res. 21: 2025-29; O'Gormanら, 1991, Science 251: 1351-55）。転写を増加させることが知られている任意の隣接配列（例えば、エンハンサー/プロモーター、イントロン、翻訳エンハンサー）は、このプラスミド中に適切に配置される場合、細胞の内在性IL-1 α -R遺伝子からの新たなまたは増加したIL-1 α -Rポリペプチド産生を生じる、新たなまたは改変された転写単位を作製するような様式で組み込む。

30

【0229】

部位特異的組換え配列が細胞の内在性ゲノムIL-1 α -Rポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置された細胞株を使用するさらなる方法は、相同組換えを使用して細胞株のゲノムの他の位置に第2の組換え部位を導入することである。次いで、適切なリコンビナーゼ酵素が、この二組換え部位細胞株に導入され、組換え事象（欠失、反転、および転移）を生じ（Sauer, 1994, Curr. Opin. Biotechnol., 5: 521-27; Sauer, 1993, Methods Enzymol., 225: 890-900）、これは、その細胞の内在性IL-1 α -R遺伝子からの新規なまたは増加したIL-1 α -Rポリペプチド産生を生じる、新しいかまたは改変された転写単位を作製する。

40

【0230】

50

細胞の内在性 I L - 1 r a - R 遺伝子からの I L - 1 r a - R ポリペプチドの発現を増加するため、または引き起こすためのさらなるアプローチは、細胞の内在性 I L - 1 r a - R 遺伝子からの新たなまたは増加した I L - 1 r a - R ポリペプチドの産生を生じる様式で、遺伝子（単数または複数）（例えば、転写因子）の発現を増加するかまたは引き起こす工程、および／または遺伝子（単数または複数）（例えば、転写リプレッサー）の発現を減少する工程を包含する。この方法は、天然に存在しないポリペプチド（例えば、転写因子ドメインに融合した部位特異的 DNA 結合ドメインを含むポリペプチド）を、その細胞の内在性 I L - 1 r a - R 遺伝子からの新たなまたは増加した I L - 1 r a - R ポリペプチドの産生が起こるように、細胞に導入する工程を包含する。

【0231】

本発明はさらに、標的遺伝子の発現を変化させる方法において有用な DNA 構築物に関する。特定の実施形態において、代表的な DNA 構築物は、以下を含む：（a）1つ以上の標的化配列、（b）調節配列、（c）エキソン、および（d）不對スプライスドナー部位。DNA 構築物中の標的化配列は、細胞中の標的遺伝子へのエレメント（a）～（d）の組込みを指向し、その結果、これらのエレメント（b）～（d）が、その内在性標的遺伝子の配列に作動可能に連結される。別の実施形態において、DNA 構築物は、以下を含む：（a）1つ以上の標的化配列、（b）調節配列、（c）エキソン、（d）スプライスドナー部位、（e）イントロン、および（f）スプライスアクセプター部位。ここで、標的化配列は、エレメント（a）～（f）の組込みを指向し、その結果、これらのエレメント（b）～（f）が、その内在性遺伝子に作動可能に連結される。この標的化配列は、相同性組換えが生じる細胞染色体 DNA の予め選択された部位に対して相同性である。この構築物において、エキソンは、一般的に、制御配列の 3' 側であり、そしてスプライスドナー部位は、このエキソンの 3' 側である。

【0232】

特定の遺伝子の配列（例えば、本明細書中で記載される I L - 1 r a - R ポリペプチドの核酸配列）が公知である場合、この遺伝子の選択された領域に対して相補的な DNA の断片が、合成され得るか、またはそうでなければ、例えば、目的の領域に結合している特定の認識部位におけるそのネイティブの DNA の適切な制限処理によって得られ得る。この断片は、細胞に挿入された際に、標的化配列として働き、そしてそのゲノム内の相同性領域にハイブリダイズする。このハイブリダイゼーションが、DNA 複製の間に生じる場合、この DNA の断片およびそれに結合した任意のさらなる配列は、岡崎フラグメントとして作用し、そして DNA の新たに合成された娘鎖に組み込まれる。従って、本発明は、I L - 1 r a - R ポリペプチドをコードするヌクレオチドを含み、このヌクレオチドは、標的化配列として使用され得る。

【0233】

I L - 1 r a - R ポリペプチド細胞治療（例えば、I L - 1 r a - R ポリペプチドを産生する細胞の移植）もまた企図される。この実施形態は、生物学的に活性な形態の I L - 1 r a - R ポリペプチドを合成および分泌し得る細胞を移植する工程を包含する。このような I L - 1 r a - R ポリペプチド産生細胞は、I L - 1 r a - R ポリペプチドの天然の産生者である細胞であり得るか、またはその I L - 1 r a - R ポリペプチドを産生する能力が、所望の I L - 1 r a - R ポリペプチドをコードする遺伝子または I L - 1 r a - R ポリペプチドの発現を増大する遺伝子で形質転換することによって増大された、組換え細胞であり得る。このような改変は、遺伝子を送達しそしてその遺伝子の発現および分泌を促進するために適切なベクターによって達成され得る。I L - 1 r a - R ポリペプチドを投与されている患者における強力な免疫学的反応を最小化するために、外来種のポリペプチドの投与と共に生じ得る場合、I L - 1 r a - R ポリペプチドを産生する天然の細胞が、ヒト起源であり、そしてヒト I L - 1 r a - R ポリペプチドを産生することが好ましい。同様に、I L - 1 r a - R ポリペプチドを産生する組換え細胞が、ヒト I L - 1 r a - R ポリペプチドをコードする遺伝子を含む発現ベクターで形質転換されることが好ましい。

【0234】

移植細胞は、周辺組織の浸潤を回避するようにカプセル化され得る。ヒトまたは非ヒト動物細胞は、生体適合性の半透性ポリマー封入物または膜（これは、IL-1ra-Rポリペプチドの放出を可能にするが、患者の免疫系によるかまたは周辺組織からの他の有害な因子による細胞の崩壊を防止する）の形態で患者に移植され得る。あるいは、IL-1ra-Rポリペプチドをエキソビボで産生するように形質転換された患者自身の細胞が、このようなカプセル化なしで、患者に直接移植され得る。

【0235】

生きた細胞をカプセル化するための技術は当該分野で公知であり、そしてカプセル化された細胞の調製およびそれらの患者への移植は、慣用的に達成され得る。例えば、Baetgeら（PCT公開WO95/05452およびPCT/US94/09299）は、生物学的に活性な分子の効果的な送達のために遺伝子操作された細胞を含む膜カプセルを記載する。このカプセルは、生体適合性であり、そして容易に回収可能である。このカプセルは、生物学的に活性な分子をコードするDNA配列を含む組換えDNA分子でトランスフェクトされた細胞をカプセル化し、このDNA配列は、哺乳動物宿主に移植された際にインビボで下方制御に供されないプロモーターに作動可能に連結されている。このデバイスは、レシピエント内の特定の部位への生きた細胞由来の分子の送達を提供する。さらに、米国特許第4,892,538号；同第5,011,472号；および同第5,106,627号を参照のこと。生きた細胞をカプセル化するためのシステムは、PCT公開WO91/10425（Aebischerら）に記載される。PCT公開WO91/10470（Aebischerら）；Winnら、1991, Exper. Neurol. 113:322-29；Aebischerら、1991, Exper. Neurol. 111:269-75；およびTrescoら、1992, ASAIO 38:17-23もまた参照のこと。

【0236】

IL-1ra-Rポリペプチドのインビボおよびインビトロの遺伝子治療送達もまた想定される。遺伝子治療技術の一例は、構成的または誘導性プロモーターに作動可能に連結され得るIL-1ra-RポリペプチドをコードするIL-1ra-R遺伝子（ゲノムDNA、cDNAおよび／または合成DNAのいずれか）を使用して、「遺伝子治療DNA構築物」を形成することである。このプロモーターは、内在性IL-1ra-R遺伝子に対してホモ接合性またはヘテロ接合性であり得るが、ただし、これは、構築物が挿入される細胞または組織型において活性である。遺伝子治療DNA構築物の他の成分は、必要に応じて、部位特異的組込みのために設計されるDNA分子（例えば、相同性組換えのために有用な内在性配列）、組織特異的プロモーター、エンハンサーまたはサイレンサー、親細胞を越える選択的優性を提供し得るDNA分子、形質転換された細胞を同定するための標識として有用なDNA分子、ネガティブ選択系、細胞特異的結合因子（例えば、細胞標的化について）、細胞特異的内部移行因子、ベクターからの発現を増大する転写因子、およびベクターの産生を可能にする因子を含み得る。

【0237】

遺伝子治療DNA構築物は、次いで、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターを使用して細胞に導入され得る（エキソビボまたはインビボのいずれか）。遺伝子治療DNA構築物を導入するための1つの方法は、本明細書中に記載されるようなウイルスベクターの使用による。特定のベクター（例えば、レトロウイルスベクター）は、DNA構築物を細胞の染色体DNAに送達し、そしてこの遺伝子は、染色体DNAに組み込まれ得る。他のベクターは、エピソームとして機能し、そして遺伝子治療DNA構築物は、細胞質に残る。

【0238】

さらに他の実施形態において、調節エレメントが、標的細胞におけるIL-1ra-R遺伝子の制御された発現のために含められ得る。このようなエレメントは、適切なエフェクターに応答して刺激される。このようにして、治療的ポリペプチドは、所望の場合に発現され得る。1つの従来の制御手段は、低分子結合ドメインおよび生物学的プロセスを開始

し得るドメインを含むキメラタンパク質（例えば、DNA結合タンパク質または転写活性タンパク質）を二量化する低分子二量化剤またはラパログ（rapalog）の使用を包含する（PCT公開WO96/41865、WO97/31898およびWO97/31899を参照のこと）。タンパク質の二量化は、導入遺伝子の転写を開始するために使用され得る。

【0239】

代替の調節技術は、目的の遺伝子から発現されたタンパク質を、凝集体またはクラスターとして細胞の内側に貯蔵する方法を使用する。目的の遺伝子は、小胞体における凝集タンパク質の保持を生じる、条件的凝集ドメインを含む融合タンパク質として発現される。貯蔵されたタンパク質は安定であり、そして細胞の内側で不活性である。しかし、このタンパク質は、条件的凝集ドメインを除去する薬物（例えば、低分子リガンド）を投与することによって放出され得、それにより、凝集体またはクラスターを破壊し、その結果、このタンパク質は細胞から分泌され得る。Aridorら、2000, Science 287:816-17およびRiveraら、2000, Science 287:826-30を参照のこと。

10

【0240】

他の適切な制御手段または遺伝子スイッチとしては、本明細書中で記載される系が挙げられるが、これらに限定されない。Mifepristone（RU486）は、プロゲステロンアンタゴニストとして使用される。改変されたプロゲステロンレセプターリガンド結合ドメインのプロゲステロンアンタゴニストへの結合は、2つの転写因子のダイマーを形成することによって、転写を活性化し、次いで、核に至り、DNAに結合する。このリガンド結合ドメインは、天然のリガンドに結合するレセプターの能力を排除するように改変される。改変されたステロイドホルモンレセプター系はさらに、米国特許第5,364,791号、ならびにPCT公開WO96/40911およびWO97/10337に記載される。

20

【0241】

さらに別の制御系は、エクジソンレセプター（細胞質レセプター）に結合し、そしてこれを活性化するエクジソン（ショウジョウバエステロイドホルモン）を使用する。次いで、このレセプターは核に転移し、特定のDNA応答エレメント（エクジソン応答性遺伝子由来のプロモーター）に結合する。エクジソンレセプターは、トランス活性化ドメイン、DNA結合ドメイン、およびリガンド結合ドメインを含み、転写を開始する。エクジソン系はさらに、米国特許第5,514,578、およびPCT公開WO97/38117、WO96/37609、およびWO93/03162に記載される。

30

【0242】

別の制御手段は、陽性テトラシクリン制御可能トランス活性化因子を使用する。この系は、転写を活性化するポリペプチドに連結された変異したtetレプレッサタンパク質DNA結合ドメイン（逆テトラサイクリン調節トランス活性化因子タンパク質を生じた変異したtetR-4アミノ酸の変化、すなわち、これは、テトラサイクリンの存在下でtetオペレーターに結合する）を含む。このような系は、米国特許第5,464,758号、同第5,650,298号、および同第5,654,168号に記載される。

40

【0243】

さらなる発現制御系および核酸構築物は、米国特許第5,741,679号および同第5,834,186号（Innovir Laboratories Inc.）に記載される。

【0244】

インビボ遺伝子治療は、IL-1ra-Rポリペプチドをコードする遺伝子を、IL-1ra-R核酸分子の局所注射によって、またはその他の適切なウイルスもしくは非ウイルス送達ベクターによって、細胞に導入することにより達成され得る。Hefti, 1994, Neurobiology 25:1418-35。例えば、IL-1ra-Rポリペプチドをコードする核酸分子は、標的細胞への送達のためのアデノ随伴ウイルス（AA

50

V) ベクターに含まれ得る (例えば、Johnson, PCT 公開 WO 95/34670 ; PCT 出願 PCT/US 95/07178 を参照のこと。組換え AAV ゲノムは、典型的に、機能的プロモーターに作動可能に連結した IL-1 α -R ポリペプチドをコードする DNA 配列およびポリアデニル化配列に隣接する AAV 逆末端反復を含む。

【0245】

代替の適切なウイルスベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス、肝炎ウイルス、パルボウイルス、パポバウイルス、ポックスウイルス、アルファウイルス、コロナウイルス、ラブドウイルス、パラミクソウイルス、および乳頭腫ウイルスベクターが挙げられるがこれらに限定されない。米国特許第 5, 672, 344 号は、組換え神経栄養性 HSV-1 ベクターを含むインビボウイルス媒介遺伝子移入系を記載する。米国特許第 5, 399, 346 号は、治療タンパク質をコードする DNA セグメントを挿入するためにインビトロで処置されたヒト細胞の送達によって、治療タンパク質を患者に提供するためのプロセスの例を提供する。遺伝子治療技術の実施のためのさらなる方法および材料は、米国特許第 5, 631, 236 号 (アデノウイルスベクターを含む)、同第 5, 672, 510 号 (レトロウイルスベクターを含む)、同第 5, 635, 399 号 (サイトカインを発現するレトロウイルスベクターを含む) に記載される。

10

【0246】

非ウイルス送達法としては、リポソーム媒介移入、裸の DNA 送達 (直接注射)、レセプター媒介送達 (リガンド-DNA 複合体)、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降、および微粒子ボンバードメント (例えば、遺伝子銃) が挙げられるが、これらに限定されない。遺伝子治療材料および方法はまた、誘導性プロモーター、組織特異的エンハンサープロモーター、部位特異的組込みのために設計された DNA 配列、親細胞を越える選択的優性を提供し得る DNA 配列、形質転換された細胞を同定するための標識、ネガティブな選択系および発現制御系 (安全性の指標)、細胞特異的結合因子 (細胞ターゲティングのため)、細胞特異的内部移行因子、およびベクターならびにベクター製造の方法による発現を増大する転写因子を含み得る。遺伝子治療技術の実施のためのこのようなさらなる方法および材料は、米国特許第 4, 970, 154 号 (エレクトロポレーション技術を含む)、同第 5, 679, 559 号 (遺伝子送達のためのリポタンパク質含有系を記載する)、同第 5, 676, 954 号 (リポソームキャリアを含む)、同第 5, 593, 875 号 (リン酸カルシウムトランスフェクションのための方法を記載する)、および同第 4, 945, 050 同第 (生物学的に活性な粒子がある速度で細胞に噴霧され、それによりこの粒子がこの細胞の表面に浸透し、そしてこの細胞の内側に組み込まれるプロセスを記載する)、および PCT 公開 WO 96/40958 (核リガンドを含む) に記載される。

20

30

【0247】

IL-1 α -R 遺伝子治療または細胞治療はさらに、同じか異なる細胞 (単数または複数) における 1 つ以上のさらなるポリペプチドの送達を含み得ることもまた企図される。このような細胞は、患者に別々に導入され得るか、この細胞は、単一の移植可能デバイス (例えば、上記のカプセル化膜) に含められ得るか、あるいはこの細胞は、ウイルスベクターによって別々に改変され得る。

40

【0248】

遺伝子治療による細胞における内在性 IL-1 α -R ポリペプチドの発現を増加する手段は、IL-1 α -R ポリペプチドプロモーターに 1 つ以上のエンハンサーエレメントを挿入することであり、ここでエンハンサーエレメントは、IL-1 α -R 遺伝子の転写活性を増加させるように働き得る。使用されるエンハンサーエレメントは、遺伝子を活性化することを所望する組織に基づいて選択される。エンハンサーエレメントは、組織が選択されるという点で、プロモーター活性化を与えることが知られている。例えば、IL-1 α -R ポリペプチドをコードする遺伝子が T 細胞において「オンに変わる」場合、I κ B プロモーターエンハンサーエレメントが使用され得る。従って、付加される転写エ

50

レメントの機能的部分は、標準的なクローニング技術を使用して、I L-1 r a-Rポリペプチドプロモーターを含むDNAのフラグメントに挿入され得る（そして必要に応じて、ベクターおよび／または5'および／または3'隣接配列に挿入される）。「相同性組換え構築物」として公知のこの構築物は、次いで、エキソビボまたはインビボいずれかで、所望の細胞に導入され得る。

【0249】

遺伝子治療はまた、内在性プロモーターのヌクレオチド配列を改変することによって、I L-1 r a-Rポリペプチド発現を減少するために使用され得る。このような改変は、典型的に、相同性組換え方法によって達成される。例えば、不活性化のために選択されたI L-1 r a-R遺伝子のプロモーターの全てまたは一部を含むDNA分子は、転写を調節するプロモーターの断片を除去および／または置換するように操作され得る。例えば、プロモーターの転写活性化因子のT A T Aボックスおよび／または結合部位は、標準的な分子生物学的技術を使用して欠失され得；このような欠失は、プロモーター活性を阻害し得、それにより対応するI L-1 r a-R遺伝子の転写を阻止し得る。プロモーターにおけるT A T Aボックスまたは転写活性化因子結合部位の欠失は、I L-1 r a-Rポリペプチドプロモーター（調節されるI L-1 r a-R遺伝子と同じかまたは関連の種由来）のすべてまたは関連の部分を含むDNA構築物を生成することによって達成され得、ここで、1つ以上のT A T Aボックスおよび／または転写活性化因子結合部位のヌクレオチドは、1つ以上のヌクレオチドの置換、欠失、および／または挿入によって変異される。結果として、T A T Aボックスおよび／または活性化因子結合部位は、活性を減少するか、または完全に不活性にされる。この構築物（これはまた、典型的に、改変されたプロモーターセグメントに隣接したネイティブの（内在性）5'および3'DNA配列に対応する少なくとも約500塩基のDNAを含む）は、直接かまたは本明細書中に記載されるようなウイルスベクターを介してのいずれかで、適切な細胞に（エキソビボまたはインビボのいずれかで）導入され得る。典型的に、細胞のゲノムDNAへのこの構築物の組込みは、相同性組換えによってであり、ここで、このプロモーター構築物の5'および3'DNA配列は、内在性染色体DNAへのハイブリダイゼーションによって、改変プロモーター領域に一体化するのを助け得る。

【0250】

（治療的用途）

I L-1 r a-R核酸分子、ポリペプチド、ならびにそれらのアゴニストおよびアンタゴニストは、多数の疾患、障害または状態（本明細書中で引用されるものを含む）を処置、診断、回復または予防するために使用され得る。

【0251】

I L-1 r a-Rポリペプチドアゴニストおよびアンタゴニストは、I L-1 r a-Rポリペプチド活性を調節し、I L-1 r a-Rポリペプチドの成熟形態の少なくとも1つの活性を増加または減少するそれらの分子を含む。アゴニストまたはアンタゴニストは、I L-1 r a-Rポリペプチドと相互作用し、それによりその活性を調節する補因子（例えば、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質または低分子量分子）であり得る。強力なポリペプチドアゴニストまたはアンタゴニストは、タンパク質の細胞外ドメインの一部または全てを含むI L-1 r a-Rポリペプチドの可溶性または膜結合形態のいずれかと反応する抗体を含む。I L-1 r a-Rポリペプチド発現を調節する分子は、典型的に、発現のアンチセンス制御因子として働き得るI L-1 r a-Rポリペプチドをコードする核酸を含む。

【0252】

例えば、本発明のI L-1 r a-R核酸分子、ポリペプチド、ならびにアゴニストおよびアンタゴニストは、免疫系不全を含む、疾患、障害または状態を処置、診断、回復または予防するために使用され得る。このような疾患の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：リウマチ様動脈炎、乾癬性関節炎、炎症性関節炎、変形性関節症、炎症性関節疾患、自己免疫疾患（自己免疫脈管炎を含む）、多発性硬化症、狼瘡、糖尿病（

例えば、インスリン糖尿病）、炎症性腸疾患、移植拒絶、移植片対宿主疾患、および骨折、捻挫、軟骨損傷、外傷、整形手術、感染または他の疾患プロセスから生じる炎症状態。免疫系の不全によって影響を受ける他の疾患は、本発明の範囲内に包含される。

【0253】

本発明の I L - 1 r a - R 核酸分子、ポリペプチド、ならびにアゴニストおよびアンタゴニストはまた、感染を含む疾患、障害または状態を処置、診断、回復または予防するために使用され得る。このような疾患の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：らい病、ウイルス感染（例えば、肝炎または H I V）、細菌感染（例えば、c l o s t r i d i u m 関連疾患、c l o s t r i u m 関連下痢を含む）、肺結核、急性熱性疾患、熱、肝臓の急性期反応、敗血症または敗血症ショック。感染を含む他の疾患は、本発明の範囲内に包含される。

10

【0254】

本発明の I L - 1 r a - R 核酸分子、ポリペプチド、ならびにアゴニストおよびアンタゴニストはまた、体重障害を含む疾患、障害または状態を処置、診断、回復または予防するために使用され得る。このような疾患の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：肥満、食欲不振、悪液質（A I D S 誘発性悪液質を含む）、筋障害（例えば、敗血症における筋肉タンパク質代謝）、および低血糖症。体重障害を含む他の疾患は、本発明の範囲内に包含される。

【0255】

本発明の I L - 1 r a - R 核酸分子、ポリペプチド、ならびにアゴニストおよびアンタゴニストはまた、神経機能不全を含む疾患、障害または状態を処置、診断、回復または予防するために使用され得る。このような疾患の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アルツハイマー病、パーキンソン病、神経毒性（例えば、H I V によって誘発されるような）、A L S、脳損傷、ストレス、うつ病、痛覚および他の疼痛（癌関連疼痛を含む）、痛覚過敏、癲癇、学習障害および記憶障害、睡眠障害、ならびに末梢神経障害および中枢神経障害。他の神経学的障害は、本発明の範囲内に包含される。

20

【0256】

本発明の I L - 1 r a - R 核酸分子、ポリペプチド、ならびにアゴニストおよびアンタゴニストはまた、肺を含む疾患、障害または状態を処置、診断、回復または予防するために使用され得る。このような疾患の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：急性もしくは慢性肺損傷（間質性肺疾患を含む）、急性呼吸疾患症候群、肺高血圧症、気腫、嚢胞性線維症、肺性線維症、および喘息。肺の他の疾患は、本発明の範囲内に包含される。

30

【0257】

本発明の I L - 1 r a - R 核酸分子、ポリペプチド、ならびにアゴニストおよびアンタゴニストはまた、皮膚を含む疾患、障害または状態を処置、診断、回復または予防するために使用され得る。このような疾患の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：乾癬、湿疹および創傷治癒。他の皮膚の疾患は、本発明の範囲内に包含される。

【0258】

本発明の I L - 1 r a - R 核酸分子、ポリペプチド、ならびにアゴニストおよびアンタゴニストはまた、腎臓を含む疾患、障害または状態を処置、診断、回復または予防するために使用され得る。このような疾患の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：急性および慢性糸球体腎炎。他の腎臓の疾患は、本発明の範囲内に包含される。

40

【0259】

本発明の I L - 1 r a - R 核酸分子、ポリペプチド、ならびにアゴニストおよびアンタゴニストはまた、骨を含む疾患、障害または状態を処置、診断、回復または予防するために使用され得る。このような疾患の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：骨粗鬆症、変形性関節症、骨形成不全症、パジェット病、歯周疾患、一時的顎関節疾患、および高カルシウム血症。他の骨の疾患は、本発明の範囲内に包含される。

【0260】

50

本発明の I L - 1 r a - R 核酸分子、ポリペプチド、ならびにアゴニストおよびアンタゴニストはまた、血管系を含む疾患、障害または状態を処置、診断、回復または予防するために使用され得る。このような疾患の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：出血または発作、出血性ショック、虚血（心臓虚血および大脳虚血、例えば、外傷、癲癇、出血または発作の結果としての脳損傷（これらの各々は、神経変性を生じ得る）を含む）、アテローム性動脈硬化症、うっ血性心不全、再狭窄、再灌流障害、および新脈管形成。他の血管系の疾患は、本発明の範囲内に包含される。

【0261】

本発明の I L - 1 r a - R 核酸分子、ポリペプチド、ならびにアゴニストおよびアンタゴニストはまた、腫瘍細胞を含む疾患、障害または状態を処置、診断、回復または予防するために使用され得る。このような疾患の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：リンパ腫、骨肉腫、慢性および急性骨髄性白血病（C M L および A M L）、および他の白血病、多発性骨髄腫、肺癌、乳癌、腫瘍転移、および放射線治療の副作用。他の腫瘍細胞を含む疾患は、本発明の範囲内に包含される。

10

【0262】

本発明の I L - 1 r a - R 核酸分子、ポリペプチド、ならびにアゴニストおよびアンタゴニストはまた、生殖器系を含む疾患、障害または状態を処置、診断、回復または予防するために使用され得る。このような疾患の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：不妊症、流産、早期分娩および早期産、ならびに子宮内膜症。他の生殖器系を含む疾患は、本発明の範囲内に包含される。

20

【0263】

本発明の I L - 1 r a - R 核酸分子、ポリペプチド、ならびにアゴニストおよびアンタゴニストはまた、眼を含む疾患、障害または状態を処置、診断、回復または予防するために使用され得る。このような疾患の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：炎症性眼疾患（例えば、角膜移植に関連し得る）、網膜変性、失明、黄斑変性、緑内障、ブドウ膜炎、および網膜ニューロパシー。他の眼の疾患は、本発明の範囲内に包含される。

【0264】

本発明の I L - 1 r a - R 核酸分子、ポリペプチド、ならびにアゴニストおよびアンタゴニストはまた、疾患（例えば、急性膵炎、慢性疲労症候群、線維素血症、および川崎病（M L N S））を処置するために使用され得る。

30

【0265】

I L - 1 インヒビターは、I L - 1 に対する細胞性レセプターの活性化を特異的に防止し得る任意のタンパク質を含み、これは、多くの機構から生じ得る。このような機構は、I L - 1 産生のダウンレギュレーション、遊離 I L - 1 の結合、I L - 1 のそのレセプターへの結合の妨害、I L - 1 レセプター複合体の形成（すなわち、I L - 1 レセプター補助タンパク質との I L - 1 レセプターの結合）の妨害、および I L - 1 のそのレセプターへの結合後のシグナル伝達の調節の妨害を含む。このようなインターロイキン-1 インヒビターとしては、以下が挙げられる：本明細書中に記載されるような、I L - 1 r a - R のようなインターロイキン-1 レセプター アンタゴニスト、抗 I L - 1 レセプターモノクローナル抗体（例えば、欧州特許第 6 2 3 6 7 4 号）、可溶性 I L - 1 レセプターのような I L - 1 結合タンパク質（例えば、米国特許第 5, 4 9 2, 8 8 8 号、同第 5, 4 8 8, 0 3 2 号、同第 5, 4 6 4, 9 3 7 号、同第 5, 3 1 9, 0 7 1 号、および同第 5, 1 8 0, 8 1 2 号）、抗 I L - 1 モノクローナル抗体（例えば、P C T 公開番号 W O 9 5 / 0 1 9 9 7、W O 9 4 / 0 2 6 2 7、W O 9 0 / 0 6 3 7 1；米国特許第 4, 9 3 5, 3 4 3 号；および欧州特許第 3 6 4 7 7 8 号、同第 2 6 7 6 1 1 号および同第 2 2 0 0 6 3 号）、I L - 1 レセプター 補助タンパク質およびそれらに対する抗体（例えば、P C T 公開番号 W O 9 6 / 2 3 0 6 7）；インターロイキン-1 β 変換酵素（I C E）またはカスパーゼ I のインヒビター（これを使用して、I L - 1 β の産生および分泌を阻害し得る）、インターロイキン-1 β プロテアーゼインヒビター、ならびに I L - 1 のインビボ合成ま

40

50

たは細胞外放出を遮断する他の化合物およびタンパク質。

【0266】

例示的な IL-1 インヒビターは、以下において開示される：米国特許第 5, 747, 444 号、同第 5, 359, 032 号、同第 5, 608, 035 号、同第 5, 843, 905 号、同第 5, 359, 032 号、同第 5, 866, 576 号、同第 5, 869, 660 号、同第 5, 869, 315 号、同第 5, 872, 095 号、同第 5, 955, 480 号；PCT 公開番号 WO 98/21957、WO 96/09323、WO 91/17184、WO 96/40907、WO 98/32733、WO 98/42325、WO 98/44940、WO 98/47892、WO 98/56377、WO 99/03837、WO 99/06426、WO 99/06042、WO 91/17249、WO 98/32733、WO 98/17661、WO 97/08174、WO 95/34326、WO 99/36426、および WO 99/36415；欧州特許第 534978 号および同第 894795；ならびに 仏国特許出願 FR 2762514。

10

【0267】

インターロイキン-1 レセプターアンタゴニスト (IL-1ra) は、インターロイキン-1 の天然のインヒビターとして作用するヒトタンパク質である。好ましいレセプターアンタゴニスト (IL-1ra ならびに その改変体および誘導体を含む)、ならびに、その作成方法および使用法は、米国特許第 5, 075, 222 号；PCT 公開番号 WO 91/08285、WO 91/17184、WO 92/16221、WO 93/21946、WO 94/06457、WO 94/21275、WO 94/21235、WO 94/20517、WO 96/22793、WO 97/28828 および WO 99/36541；豪国特許第 AU 9173636 号；仏国特許第 FR 2706772 号；ならびに 独国特許第 DE 4219626 号に記載される。このようなタンパク質には、グリコシル化 IL-1 レセプターアンタゴニストおよび非グリコシル化 IL-1 レセプターアンタゴニストが含まれる。

20

【0268】

具体的には、IL-1ra および その改変体の 3 つの代表的な形態が、5, 075, 222 特許に開示されかつ記載される。これらのうち 1 つ目は、「IL-1i」と呼ばれ、Tris 緩衝液 (pH 7.6) 中の約 52mM NaCl にて Mono Q FPLC カラムから溶出する、およそ 4.8 の等電点を有する、SDS-PAGE における 22~23kD の分子として特徴付けられる。2 番目 (IL-1raβ) は、48mM NaCl で Mono Q カラムから溶出する、22~23kD のタンパク質として特徴付けられる。IL-1raα および IL-1raβ の両方がグリコシル化される。3 番目 (IL-1rax) は、48mM NaCl で Mono Q カラムから溶出する、20kD のタンパク質として特徴付けられ、そして グリコシル化されていない。米国特許第 5, 075, 222 号はまた、これらのインヒビターのコードの原因である遺伝子を単離するための方法、この遺伝子を適切なベクターおよび細胞型でクローン化するための方法、ならびに この遺伝子を発現させてこれらのインヒビターを産生するための方法を開示する。

30

【0269】

欠失、挿入および置換の多くの組合せ（本明細書中では個々にまたは集合的に「改変体（単数または複数）」）が、IL-1ra-R のアミノ酸配列内で成され得、但し、得られる分子は、生物学的に活性である（例えば、本明細書中に記載されるような疾患および障害の 1 つ以上に影響を及ぼす能力を有する）ことを、当業者は認識する。

40

【0270】

本発明により意図されるように、IL-1ra-R ポリペプチドは、他の治療に対する補助物として、そして また処置される適応症に適切な他の薬学的組成物と共に投与され得る。IL-1ra-R ポリペプチド、および 1 つ以上の更なる治療または薬学的処方の中のいずれかが、別々にか、続けてか、または同時に投与され得る。

【0271】

特定の実施形態において、本発明は、本明細書中に記載される疾患および障害の処置また

50

は予防のための1つ以上のTNFインヒビターのいずれかと組合わせた（前処置、処置後、または同時処置）IL-1 α -Rポリペプチドの使用に関する。

【0272】

このようなTNFインヒビターとしては、TNFのインビボ合成または細胞外放出を遮断する化合物およびタンパク質が挙げられる。特定の実施形態において、本発明は、以下の1つ以上のTNFインヒビターのいずれかと組合わせた（前処置、処置後、または同時処置）IL-1 α -Rポリペプチドの使用に関する：TNF結合タンパク質（本明細書中で定義されるような、可溶性TNFレセプターI型および可溶性TNFレセプターII型（「sTNFR」）、抗TNF抗体、顆粒球コロニー刺激因子、サリドマイド、BN 50730、テニダプ（tenidap）、E 5531、チアパファント（tiapafant）PCA 4248、ニメスリド（nimesulide）、パナビル（panavir）、ロリプラム（rolipram）、RP 73401、ペプチドT、MDL 201, 449A、（1R, 3S）-Cis-1-[9-(2, 6-ジアミノプリン)]-3-ヒドロキシ-4-シクロペンテン塩酸塩、（1R, 3R）-trans-1-[9-(2, 6-ジアミノ)プリン]-3-アセトキシシクロペンタン、（1R, 3R）-trans-1-[9-アデニル]-3-アジドシクロペンタン塩酸塩および（1R, 3R）-trans-1-(6-ヒドロキシプリン-9-イル)-3-アジドシクロペンタン。TNF結合タンパク質は、当該分野で開示される（米国特許第5, 136, 021号；欧州特許第308378号、同第422339号、同第393438号、同第398327号、同第412486号、同第418014号、同第433900号、同第464533号、同第512528号、同第526905号、同第568928号、同第417563号；PCT公開番号WO90/13575、WO91/03553、WO92/01002、WO92/13095、WO92/16221、WO93/07863、WO93/21946、WO93/19777、WO94/06476、PCT出願番号PCT/US97/12244；英国特許第GB 2218101号および同第2246569号；ならびに日本国特許出願第JP127, 800/1991）。

【0273】

例えば、欧州特許第393438号および同第422339号は、可溶性TNFレセプターI型（「sTNFR-I」または「30kDa TNFインヒビター」としても公知）および可溶性TNFレセプターII型（「sTNFR-II」または「40kDa TNFインヒビター」としても公知）（集合的に「sTNFR」と称する）ならびにその改変形態（例えば、フラグメント、機能的誘導体、および改変体）のアミノ酸配列および核酸配列を教示する。欧州特許第393438号および同第422339号はまた、インヒビターのコードの原因である遺伝子を単離するための方法、適切なベクターおよび細胞型でこの遺伝子をクローニングするための方法、ならびにこの遺伝子を発現させてインヒビターを産生するための方法を開示する。さらに、sTNFR-IおよびsTNFR-IIの多価形態（すなわち、1より多くの活性部分を含む分子）もまた開示された。1つの実施形態において、多価形態は、少なくとも1つのTNFインヒビターおよび別の部分を、任意の臨床的に受容可能なリンカー（例えば、ポリエチレングリコール）と化学的にカップリングすることにより（PCT公開番号WO92/16221およびWO95/34326）、ペプチドリinkerにより（Neveら、1996、Cytokine、8:365-70）、ビオチンへの化学的カップリングおよび次いでアビジンへの結合（PCT公開番号WO91/03553）により、そして最後に、キメラ抗体分子を組合わせることにより（米国特許第5, 116, 964号；PCT公開番号WO89/09622およびWO91/16437；ならびに欧州特許第315062号）構築され得る。

【0274】

抗TNF抗体としては、以下が挙げられる：MAK 195F Fab抗体（Hollerら、1993、1st International Symposium on Cytokines in Bone Marrow Transplantation 147）、CDP 571抗TNFモノクローナル抗体（Rankinら、1995、B

10

20

30

40

50

r. J. Rheumatol.、34:334-42)、BAY X 1351マウス抗腫瘍壊死因子モノクローナル抗体(Kieftら、1995、7th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 9); CentTNF cA2抗TNFモノクローナル抗体(Elliottら、1994、Lancet、344:1125-27; Elliottら、1994、Lancet、344:1105-10)。

【0275】

特定の実施形態において、本発明は、分泌または可溶性のヒトfas抗原またはその組換えバージョン(PCR公開番号WO96/20206; Mountzら、1995、J. Immunol.、155:4829-37; および欧州特許第510691号)と組合わせた(前処置、後処置、または同時処置)IL-1ra-Rポリペプチドの使用に関する。PCR公開番号WO96/20206は、分泌ヒトfas抗原(ネイティブおよび組換え(Ig融合タンパク質を含む))、可溶性組換えヒトfas抗原のコードの原因である遺伝子を単離するための方法、適切なベクターおよび細胞型でこの遺伝子をクローン化するための方法、ならびにこの遺伝子を発現させてインヒビターを産生するための方法を開示する。欧州特許第510691号は、ヒトfas抗原(可溶性fas抗原を含む)をコードする核酸、この核酸を発現するためのベクター、およびこのベクターでトランスフェクトされた形質転換体を教示する。非経口的に投与される場合、分泌または可溶性のfas抗原融合タンパク質の用量は、それぞれ一般的に、約1μg/kg~約100μg/kgである。

【0276】

本明細書中に列挙される疾患および障害(リウマチ性疾患のような急性および慢性の炎症を含む)の現在の処置は、一般的に、疼痛および炎症の制御のための第1の系統の薬物の使用を包含し; これらの薬物は、非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)として分類される。二次的な処置は、コルチコステロイド(遅効性の抗リウマチ薬(SARD)、または疾患改善(DM)薬を含む。以下の化合物に関する情報は、The Merck Manual of Diagnosis and Therapy(第16版、1992)およびPharmaprojects(PJB Publications Ltd)に見出され得る。

【0277】

特定の実施形態において、本発明は、本明細書中に列挙される疾患および障害(リウマチ性疾患のような急性および慢性の炎症ならびに移植片対宿主病を含む)の処置のためのIL-1ra-Rポリペプチドおよび1以上のNSAIDのいずれかの使用に関する。NSAIDは、その抗炎症性作用が、少なくとも部分的に、プロスタグランジン合成の阻害による(GoodmanおよびGilman、The Pharmacological Basis of Therapeutics(第7版、1985))。NSAIDは、以下の少なくとも9つのグループに特徴付けられ得る: (1) サリチル酸誘導体、(2) プロピオン酸誘導体、(3) 酢酸誘導体、(4) フェナム酸誘導体、(5) カルボン酸誘導体、(6) 酪酸誘導体、(7) オキシカム類、(8) ピラゾール類、および(9) ピラゾロン類。

【0278】

別の特定の実施形態において、本発明は、1つ以上のサリチル酸誘導体、そのプロドラッグエステル、または薬学的に受容可能な塩のいずれかと組合わせた(前処置、後処置、または同時処置)IL-1ra-Rポリペプチドの使用に関する。このようなサリチル酸誘導体、そのプロドラッグエステル、および薬学的に受容可能な塩は、以下を含む: アセトアミノザロール(acetaminosalol)、アロキシプリン(aloxiprin)、アスピリン、ベノリレート(benorylate)、プロモサリゲニン、アセチルサリチル酸カルシウム、コリンマグネシウムトリサリチレート、サリチル酸マグネシウム、コリンサリチレート、ジフルシナル(diffusinal)、エテルサレート(etersalate)、フェンドサル(fendosal)、ゲンチジン酸、サリチ

10

20

30

40

50

ル酸グリコール、イミダゾールサリチレート、リジンアセチルサリチレート、メサラミン、モルホリンサリチレート、1-ナフチルサリチレート、オルサラジン、パルサルミド (parsalimide)、アセチルサリチル酸フェニル、サリチル酸フェニル、サラセタミド (salacetamide)、サリチルアミド、〇-酢酸、サルサレート、サリチル酸ナトリウムおよびスルファサラジン。同様の鎮痛特性および抗炎症特性を有する構造的に関連したサリチル酸誘導体もまた、この群に包含されることが意図される。

【0279】

さらなる特定の実施形態において、本発明は、1つ以上のプロピオン酸誘導体、そのプロドラッグエステル、または薬学的に受容可能な塩のいずれかと組み合わせた（前処置、後処置、または同時処置）IL-1 α -Rポリペプチドの使用に関する。プロピオン酸誘導体、そのプロドラッグエステル、および薬学的に受容可能な塩は、以下を含む：アルミノプロフェン、ベノキサプロフェン、ブクロクス酸、カルプロフェン、デキスインドプロフェン (dexindoprofen)、フェノプロフェン、フルノキサプロフェン、フルプロフェン、フルルビプロフェン、フルクロプロフェン、イブプロフェン、イブプロフェンアルミニウム、イブプロキサム、インドプロフェン、イソプロフェン、ケトプロフェン、ロキソプロフェン (loxoprofen)、ミロプロフェン、ナプロキセン、ナプロキセンナトリウム、オキサプロジン、ピケトプロフェン、ピメプロフェン、ピルプロフェン、プラノプロフェン、プロチジン酸、ピリドキシプロフェン (pyridoxipropfen)、スプロフェン、チアプロフェン酸およびチオキサプロフェン。類似した鎮痛性特性および抗炎症性特性を有する構造的に関連したプロピオン酸誘導体もまた、この群に含まれることが意図される。

【0280】

なお別の特定の実施形態において、本発明は、1つ以上の酢酸誘導体、そのプロドラッグエステル、または薬学的に受容可能な塩のいずれかと組み合わせた（前処置、後処置、または同時処置）IL-1 α -Rポリペプチドの使用に関する。酢酸誘導体、そのプロドラッグエステル、および薬学的に受容可能な塩は、以下を含む：アセメタシン、アルクロフェナク、アムフェナク、ブフェキサマック、シンメタシン、クロピラク、デルメタシン (delmetacin)、ジクロフェナクカリウム、ジクロフェナクナトリウム、エトドラク、フェルビナク、フェンクロフェナク、フェンクロラク、フェンクロジン酸、フェンチアザク、フロフェナク、グルカメタシン、イブフェナック、インドメタシン、イソフェゾラク、イソキセパック、ロナゾラク、メチアジン酸 (metiazinic acid)、オキサメタシン、オキシピナック (oxpinac)、ピメタシン、プログルメタシン、スリンダク、タルメタシン、チアラミド、チオピナク、トルメチン、トルメチンナトリウム、ジドメタシンおよびゾメピラク。類似した鎮痛性特性および抗炎症性特性を有する構造的に関連した酢酸誘導体もまた、この群に含まれることが意図される。

【0281】

別の特定の実施形態において、本発明は、1つ以上のフェナム酸誘導体、そのプロドラッグエステル、または薬学的に受容可能な塩のいずれかと組み合わせた（前処置、後処置、または同時処置）IL-1 α -Rポリペプチドの使用に関する。フェナム酸誘導体、そのプロドラッグエステル、および薬学的に受容可能な塩は、以下を含む：エンフェナム酸、エトフェナマート、フルフェナム酸、イソニキシン、メクロフェナム酸、メクロフェナム酸ナトリウム、メドフェナム酸 (medofenametic acid)、メフェナム酸、ニフルム酸、タルニフルマート、テロフェナマート、トルフェナム酸およびウフェナマート。類似した鎮痛性特性および抗炎症性特性を有する構造的に関連したフェナム酸誘導体もまた、この群に含まれることが意図される。

【0282】

さらなる特定の実施形態において、本発明は、1つ以上のカルボン酸誘導体、そのプロドラッグエステル、または薬学的に受容可能な塩のいずれかと組み合わせた（前処置、後処置、または同時処置）IL-1 α -Rポリペプチドの使用に関する。使用され得るカルボン酸誘導体、そのプロドラッグエステル、および薬学的に受容可能な塩は以下を含む：

クリダナク、ジフルニサル、フルフェニサル、イノリジン (inoridine)、ケトロラクおよびチノリジン。類似した鎮痛性特性および抗炎症性特性を有する構造的に関連したカルボン酸誘導体もまた、この群に含まれることが意図される。

【0283】

なお別の特定の¹⁰実施形態において、本発明は、1つ以上の酪酸誘導体、そのプロドラッグエステル、またはその薬学的に受容可能な塩のいずれかと組み合わせた（前処置、後処置、または同時処置）IL-1ra-Rポリペプチドの使用に関する。酪酸誘導体、そのプロドラッグエステル、および薬学的に受容可能な塩は、以下を含む：ブマジソン、ブチブフェン、フェンブフェンおよびキセンブシン。類似した鎮痛性特性および抗炎症性特性を有する構造的に関連した酪酸誘導体もまた、この群に含まれることが意図される。

【0284】

別の特定の²⁰実施形態において、本発明は、1つ以上のオキシカム、そのプロドラッグエステル、または薬学的に受容可能な塩のいずれかと組み合わせた（前処置、後処置、または同時処置）IL-1ra-Rポリペプチドの使用に関する。オキシカム、そのプロドラッグエステル、および薬学的に受容可能な塩は、以下を含む：ドロキシカム、エノリカム、イソキシカム、ピロキシカム、スドキシカム、テノキシカムおよび4-ヒドロキシル-1, 2-ベンゾチアジン1, 1-ジオキシド4-(N-フェニル)-カルボキサミド。類似した鎮痛性特性および抗炎症性特性を有する構造的に関連したオキシカムもまた、この群に含まれることが意図される。

【0285】

なお別の²⁰特定の²⁰実施形態において、本発明は、1つ以上のピラゾール、そのプロドラッグエステル、または薬学的に受容可能な塩のいずれかと組み合わせた（前処置、後処置、または同時処置）IL-1ra-Rポリペプチドの使用に関する。使用され得るピラゾール、そのプロドラッグエステル、および薬学的に受容可能な塩は以下を含む：ジフェナミゾールおよびエピリゾール。類似した鎮痛性特性および抗炎症性特性を有する構造的に関連したピラゾールもまた、この群に含まれることが意図される。

【0286】

さらなる特定の³⁰実施形態において、本発明は、1つ以上のピラズロン、そのプロドラッグエステル、または薬学的に受容可能な塩のいずれかと組み合わせた（前処置、後処置、または同時処置）IL-1ra-Rポリペプチドの使用に関する。使用され得るピラズロン、そのプロドラッグエステル、および薬学的に受容可能な塩は、以下を含む：アパゾン、アザプロパゾン、ベンズピペリロン、フェブラゾン、モフェブタゾン、モラゾン、オキシフェンブタゾン、フェニルブタゾン、ピペブゾン、プロピルフェナゾン、ラミフェナゾン、スキシブゾンおよびチアゾリノブタゾン。類似した鎮痛性特性および抗炎症性特性を有する構造的に関連したピラズロン (pyrazalone) もまた、この群に含まれることが意図される。

【0287】

別の特定の⁴⁰実施形態において、本発明は、以下のNSAIDの1つ以上のいずれかと組み合わせた（処置前、処置後、または処置と同時）、IL-1ra-Rポリペプチドの使用に関する： ϵ -アセトアミドカブロン酸、S-アデノシルメチオニン、3-アミノ-4-ヒドロキシ酪酸、アミキセトリン、アニトラザフェン、アントラフェニン、ベンダザック、ベンダザックリジネート (bendazac lysinate)、ベンジダミン、ベプロジン (beprozine)、プロペラモール、ブコローム、ブフェゾラク、シプロカゾン、クロキシマート、ダジダミン、デボキサメト、デトミジン、ジフェンピラミド、ジフェンピラミド、ジフィサラミン (difisalamine)、ジタゾール、エモルファゾン、ファネチゾールメシレート、フェンフルミゾール、フロクタフェニン、フルミゾール、フルニキシン、フルプロカゾン、フォピルトリン (fopirtoline)、フォスフォサル、グアイメサル、グアイアゾレン (guaiazolene)、イソニキシン (isonixirine)、レフェタミンHCl、レフルノミド、ロフェミゾール、ロチファゾール、リジンクロニキシネート (lysine clonixinate)、メセ⁵⁰

クラゾン、ナブメトン、ニクチンドール、ニメスリド、オルゴテイン、オルパノキシム、オキサセプロール、オキサパドール、パラニリン (paranyline)、ペリソキサール、クエン酸ペリソキサール、ピフォキシム、ピプロキセン (piproxen)、ピラゾラク、ピルフェニドン、プロカゾン、プロキサゾール、チエラビンB (thielaavin B)、チフラミゾール、チメガジン、トレクチン、トルパドール、トリプトアミド (tryptamid) および 480156S、AA861、AD1590、AFP802、AFP860、AI77B、AP504、AU8001、BPPC、BW540C、CHINOIN 127、CN100、EB382、EL508、F1044、FK-506、GV3658、ITF182、KCNT EI6090、KME4、LA2851、MR714、MR897、MY309、ONQ3144、PR823、PV102、PV108、R830、RS2131、SCR152、SH440、SIR133、SPASS510、SQ27239、ST281、SY6001、TA60、TAI-901 (4-ベンゾイル-1-インダンカルボン酸)、TVX2706、U60257、UR2301 および WY41770 のような会社コード番号によって登録されるような NS A I D。NS A I D に対して類似した鎮痛性特性および抗炎症性特性を有する構造的に関連した NS A I D はまた、この群に含まれることが意図される。

【0288】

さらに別の特定の実施形態において、本発明は、リウマチ性疾患、対宿主性移植片病、および多発性硬化症のような急性および慢性炎症を含む、本明細書中に列挙される疾患および障害の処置のための、1つ以上の副腎皮質ステロイド、プロドラッグエステル、またはその薬学的に受容可能な塩のいずれかと組み合わせた（処置前、処置後、または処置と同時に）、IL-1ra-Rポリペプチドの使用に関する。副腎皮質ステロイド、プロドラッグエステル、およびその薬学的に受容可能な塩は、以下に由来するヒドロコルチゾンおよび化合物を含む：21-アセトキシプレグネノロン、アルクロメラゾン、アルゲストン、アムシノニド、ベクロメタゾン、ベタメタゾン、ベタメタゾンバレレート、ブデソニド、クロブプレドニゾロン、クロベタゾール、クロベタゾールプロピオネート、クロベタゾン、クロベタゾンブチレート、クロコルトロン、クロブレドノール、コルチコステロン、コルチゾン、コルチバゾール、デフラザコン、デソニド、デスオキシメラゾン、デキサメタゾン、ジフロラゾン、ジフルコルトロン、ジフルブレドネート、エノキシロン、フルアザコート、フルクロロニド、フルメタゾン、フルメタゾンピバレート、フルシノロンアセトニド、フルニソリド、フルオシノニド、フルオシノロンアセトニド、フルオコルチンブチル、フルオコルトロン、フルオコルトロンヘキサノエート、ジフルコルトロンバレレート、フルオロメトロン、フルペロロンアセテート、フルブレドニデンアセテート、フルブレドニゾロン、フルランデノリド、ホルモコータル、ハルシノニド、ハロメタゾン、ハロブレドンアセテート、ヒドロコルタメート、ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾンアセテート、ヒドロコルチゾンブチレート、ヒドロコルチゾンホスフェート、ヒドロコルチゾン21-ナトリウムスクシネート、ヒドロコルチゾンテブテート、マジブレドン、メドリゾン、メブレドニゾンメチルブレドニソロン、モメタゾンフロエート、パラメタゾン、ブレドニカルベート、ブレドニゾロン、ブレドニゾロン21-ジエドリアミノアセテート、ブレドニゾロンナトリウムホスフェート、ブレドニゾロンナトリウムスクシネート、ブレドニゾロンナトリウム21-m-スルホベンゾエート、ブレドニゾロン21-ステアログリコレート、ブレドニゾロンテブテート、ブレドニゾロン21-トリメチルアセテート、ブレドニゾン、ブレドニバル、ブレドニリデン、ブレドニリデン21-ジエチルアミノアセテート、チキソコルトール、トリウムシノロン、トリウムシノロンアセトニド、トリウムシノロンベネトニド、およびトリウムシノロンヘキサアセトニドのようなヒドロコルチゾン。類似した鎮痛性特性および抗炎症性特性を有する構造的に関連した副腎皮質コルチコイドはまた、この群に含まれることが意図される。

【0289】

別の特定の実施形態において、本発明は、リウマチ性疾患、対宿主性移植片病、および多発性硬化症のような急性および慢性炎症を含む、本明細書中に列挙される疾患および障害

10

20

30

40

50

の処置のための、1つ以上の遅効性の抗リウマチ性薬物（S A A R D）または疾患改変抗リウマチ性薬物（D M A R D S）、プロドラッグエステル、またはその薬学的に受容可能な塩のいずれかと組み合わせた（処置前、処置後、または処置と同時に）、I L - 1 r a - R ポリペプチドの使用に関する。S A A R D または D M A R D、プロドラッグエステル、およびその薬学的に受容可能な塩は、以下を含む：アロキュプレイドナトリウム、オーラノフィン、アウロチオグルコース、アウロチオグリカニド、アザチオプリン、ブレキナール（b r e q u i n a r）ナトリウム、ブシラミン、カルシウム 3 - アウロチオ 2 - プロパノール - 1 - スルホネート、クロラムブシル、クロロキン、クロブザリット、キュプロキシリン、シクロホスホアミド、シクロスポリン、ダブソン、15 - デオキシスベルグアリン、ジアセレイン、グルコサミン、金塩（例えば、シクロキン金塩、金ナトリウムチオマレート、金ナトリウムチオスルフェート）、ヒドロキシクロロキン、ヒドロキシクロキンスルフェート、ヒドロキシ尿素、ケブゾン、レバミゾール、ロベンザリット、メリチン、6 - メルカプトプリン、メトトレキセート、ミゾリビン、ミコフェノレートモフェチル（m o f e t i l）、ミオラル、ナイトロジェン・マスタード、D - ペニシルアミン、ピリジノール、イミダゾール（例えば、S K N F 8 6 0 0 2 および S B 2 0 3 5 8 0）、ラパマイシン、チオール、サイモポエチン、およびピンクリスチン。類似した鎮痛性特性および抗炎症性特性を有する構造的に関連した S A A R D または D M A R D はまた、この群に含まれることが意図される。

10

【0290】

別の特定の実施形態において、本発明は、急性および慢性炎症を含む、本明細書中に列挙される疾患および障害の処置のための、1つ以上の C O X 2 インヒビター、プロドラッグエステル、またはその薬学的に受容可能な塩のいずれかと組み合わせた（処置前、処置後、または処置と同時に）、I L - 1 r a - R ポリペプチドの使用に関する。C O X 2 インヒビター、プロドラッグエステル、またはその薬学的に受容可能な塩の例としては、例えば、セレコキシブ（c e l e c o x i b）が挙げられる。類似した鎮痛性特性および抗炎症性特性を有する構造的に関連した C O X 2 インヒビター はまた、この群に含まれることが意図される。

20

【0291】

さらに別の特定の実施形態において、本発明は、急性および慢性炎症を含む、本明細書中に記載される疾患および障害の処置のための、1つ以上の抗菌剤、プロドラッグエステル、またはその薬学的に受容可能な塩のいずれかと組み合わせた（処置前、処置後、または処置と同時に）、I L - 1 r a - R ポリペプチドの使用に関する。抗菌剤としては、例えば、ペニシリン、セファロスポリンおよび他の β - ラクタム、アミノ配糖体、アゾール、キノロン類、マクロライド、リファマイシン、テトラサイクリン、スルホンアミド、リンコサミド（l i n c o s a m i d e）およびポリミキシンの広範なクラスが挙げられる。ペニシリンは、以下を含むがこれらに限定されない：ペニシリン G、ペニシリン V、メチシリン、ナフシリン、オキサシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、フロクサシリン、アンピシリン、アンピシリン / スルバクタム、アモキシリン、アモキシリン / クラブラン酸、ヘタシリン、シクラシリン（c y c l a c i l l i n）、バカンピシリン、カルベニシリン、カルベニシリンインダニル（c a r b e n i c i l l i n i n d a n y l）、チカルシリン、チカルシリン / クラブラン酸、アズロシリン、メズロシリン、ピペラシリン（p e p e r a c i l l i n）、およびメシリナム。セファロスポリンおよび他の β - ラクタムとしては、以下を含むがこれらに限定されない：セファロチン、セファピリン、セファレキシン、セフラジン、セファゾリン、セファドロキシル、セファクロール、セファマンドール、セフォテタン、セフォキシチン、セルロキシム（c e r u r o x i m e）、セフォニシド、セフォラジン（c e f o r a d i n e）、セフィキシム、セフォタキシム、モキサラクタム、セフチゾキシム、セトリアキソン（c e t r i a x o n e）、セフォペラゾン（c e p h o p e r a z o n e）、セフトジジム、イミペネムおよびアズトレオナム。アミノ配糖体としては、以下を含むがこれらに限定されない：ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、トブラマイシン、アミカシン、ネチルマイシン、カナマイシンお

30

40

50

よびネオマイシン。アゾールとしては、フルコナゾールを含むがこれに限定されない。キノロン類としては、ナリジクス酸、ノルフロキサシン、エノキサシン、シプロフロキサシン、オフロキサシン、スパルフロキサシンおよびテマフロキサシンを含むがこれらに限定されない。マクロライドとしては、エリスロマイシン (erythromycin)、スピラマイシンおよびアジスロマイシンを含むがこれらに限定されない。リファマイシンとしては、リファンピンを含むがこれに限定されない。テトラサイクリンとしては、スピサイクリン (spicycline)、クロルテトラサイクリン、クロモサイクリン、デメクロサイクリン、デオキシサイクリン (deoxycycline)、グアメサイクリン (guamecycline)、リメサイクリン、メクロサイクリン、メタサイクリン、ミノサイクリン、オキシテトラサイクリン、ペニメピサイクリン、ピパサイクリン、ロリテトラサイクリン、サンサイクリン、セノサイクリン (senocyclin) およびテトラサイクリンを含むがこれらに限定されない。スルホンアミドとしては、スルホニルアミド、スルファメトキサゾール、スルファセタミド、スルファジアジン、スルフィソキサゾールおよびコトリモキサゾール (トリメトプリム/スルファメトキサゾール) を含むがこれらに限定されない。リンコサミドとしては、クリンダマイシンおよびリンコマイシンを含むがこれらに限定されない。ポリミキシン (ポリペプチド) としては、ポリミキシンBおよびコリスチンを含むがこれらに限定されない。

10

【0292】

IL-1RA-Fポリペプチド機能のアゴニストまたはアンタゴニストは、処置される状態に適切であるように、1つ以上のサイトカイン、増殖因子、抗生物質、抗炎症剤および/または化学療法剤と組み合わせて (同時にかまたは引き続き) 使用され得る。

20

【0293】

望ましくないレベルの1つ以上のIL-1、IL-1ra、またはIL-1ra-Rポリペプチドによって引き起こされるかまたは媒介される他の疾患は、本発明の範囲内に含まれる。望ましくないレベルとしては、過度のレベルのIL-1、IL-1ra、またはIL-1ra-Rポリペプチド、および正常以下のレベルのIL-1、IL-1ra、またはIL-1ra-Rポリペプチドが挙げられる。

【0294】

(IL-1ra-R核酸およびIL-1ra-Rポリペプチドの使用)

本発明の核酸分子 (それ自体は生物学的に活性なポリペプチドをコードしない核酸分子を含む) を使用して、IL-1ra-R遺伝子および関連遺伝子の染色体上の位置をマッピングし得る。マッピングは、当該分野で公知の技術 (例えば、PCR増幅およびインサイチュハイブリダイゼーション) により行われ得る。

30

【0295】

IL-1ra-R核酸分子 (それ自体は生物学的に活性なポリペプチドをコードしない核酸分子を含む) は、哺乳動物組織または体液サンプル中のIL-1ra-R核酸分子の存在について、定性的または定量的のいずれかで試験するための、診断アッセイにおけるハイブリダイゼーションプローブとして有用であり得る。

【0296】

他の方法はまた、1つ以上のIL-1ra-Rポリペプチドの活性を阻害することが所望される場合に使用され得る。このような阻害は、発現制御配列 (三重らせん形成) またはIL-1ra-R mRNAに相補的でありかつ発現制御配列 (三重らせん形成) またはIL-1ra-R mRNAにハイブリダイズする核酸分子によりもたらされ得る。例えば、アンチセンスDNAまたはRNA分子 (これらは、IL-1ra-R遺伝子の少なくとも一部に相補的である配列を有する) は、細胞中に導入され得る。アンチセンスプローブは、本明細書中に開示されるIL-1ra-R遺伝子の配列を使用して、利用可能な技術により設計され得る。代表的には、このようなアンチセンス分子の各々は、選択された各IL-1ra-R遺伝子の開始部位 (5'末端) に相補的である。このアンチセンス分子が次いで、対応するIL-1ra-R mRNAにハイブリダイズする場合、このmRNAの翻訳は、防止されるかまたは低減される。アンチセンスインヒビターは、細胞また

40

50

は生物における I L - 1 r a - R ポリペプチドの減少または不在に関連する情報を提供する。

【0297】

あるいは、遺伝子治療を使用して、1つ以上の I L - 1 r a - R ポリペプチドの優性ネガティブインヒビターを作製し得る。この状況において、各選択された I L - 1 r a - R ポリペプチドの変異体ポリペプチドをコードする DNA は、調製され得、そして本明細書中に記載されるウイルスまたは非ウイルスの方法のいずれかを使用して患者の細胞中に導入され得る。このような変異体の各々は、代表的にはその生物学的役割において内因性ポリペプチドと競合するように設計される。

【0298】

さらに、I L - 1 r a - R ポリペプチド（生物学的に活性でも活性でなくても）は、免疫原として使用され得、すなわち、これらのポリペプチドは、それに対して抗体が誘発され得る少なくとも1つのエピトープを含有する。I L - 1 r a - R ポリペプチドに結合する選択的結合因子（本明細書中に記載されるように）は、インビボおよびインビトロでの診断目的のために使用され得、これらの目的としては、体液サンプルまたは細胞サンプル中の I L - 1 r a - R ポリペプチドの存在を検出するための標識された形態での使用を含むが、これに限定されない。これらの抗体をまた使用して、本明細書中に列挙される疾患および障害を含む多数の疾患および障害を、予防、処置、または診断し得る。これらの抗体は、I L - 1 r a - R ポリペプチドの少なくとも1つの活性特徴を低減するかまたは遮断するように、I L - 1 r a - R ポリペプチドに結合し得るか、またはポリペプチドに結合して I L - 1 r a - R ポリペプチドの少なくとも1つの活性特徴を増加し得る（I L - 1 r a - R ポリペプチドの薬物動態を増加させることによるものを含む）。

【0299】

本発明の I L - 1 r a - R ポリペプチドは、発現クローニングストラテジーを使用して、I L - 1 r a - R ポリペプチドレセプターをクローン化するために使用され得る。放射性標識（¹²⁵ヨウ素）された I L - 1 r a - R ポリペプチドまたはアフィニティ／活性ータグ化 I L - 1 r a - R ポリペプチド（例えば、Fc 融合またはアルカリホスファターゼ融合）を、結合アッセイにおいて使用して、I L - 1 r a - R ポリペプチドレセプターを発現する細胞型または細胞株または組織を同定し得る。このような細胞または組織から単離された RNA は、c DNA に変換され得、哺乳動物発現ベクターにクローン化され、そして哺乳動物細胞（例えば、COS または 293 細胞）にトランスフェクトされて発現ライブラリーを生成する。放射性標識されるかまたはタグ化された I L - 1 r a - R ポリペプチドは、次いで、アフィニティリガンドとして使用されて、このライブラリーから、その表面上に I L - 1 r a - R ポリペプチドレセプターを発現する細胞のサブセットを同定および単離し得る。DNA は、次いでこれらの細胞から単離され得、そして哺乳動物細胞にトランスフェクトされて二次発現ライブラリー（ここで、I L - 1 r a - R ポリペプチドレセプターを発現する細胞の画分は、元のライブラリーよりも何倍も高い）を作製し得る。この富化プロセスは、I L - 1 r a - R ポリペプチドレセプターを含有する単一の組換えクローンが単離されるまで繰り返し反復され得る。I L - 1 r a - R ポリペプチドレセプターの単離は、I L - 1 r a - R ポリペプチドシグナル伝達経路の新規なアゴニストおよびアンタゴニストを同定または開発するために有用である。このようなアゴニストおよびアンタゴニストとしては、可溶性 I L - 1 r a - R ポリペプチドレセプター、抗 I L - 1 r a - R ポリペプチドレセプター抗体、低分子またはアンチセンスオリゴヌクレオチドが含まれ、そしてこれらは、本明細書中に記載される疾患または障害の1つ以上を、処置、予防、または診断するために使用され得る。

【0300】

ヒト I L - 1 r a - R ポリペプチドをコードする c DNA の寄託（受託番号 P T A - 1 4 2 3 を有する）を、アメリカン タイプ カルチャー コレクション（ATCC）（バージニア 20110-2209、マナサス、ユニバーシティ ブールバード 10801）にて2000年2月29日に行った。

10

20

30

40

50

【0301】

以下の実施例は、例示目的のみのために意図され、本発明の範囲をどちらにしても限定するとは解釈されるべきではない。

【0302】

(実施例1：ヒトIL-1ra-Rポリペプチド遺伝子のクローニング)

概して、Sambrookら(前出)に記載されるような材料および方法を、ヒトIL-1ra-Rポリペプチドをコードする遺伝子をクローン化および分析するために使用した。

【0303】

ヒトIL-1ra-RポリペプチドをコードするcDNA配列を単離するために、専有データベース(Amgen、Thousand Oaks、CA)の検索を、クローンshos1-00003-d1を問い合わせ(query)配列として使用して行った。この様式で同定された423bpの配列は、アミノ酸レベルで問い合わせ配列に対して41%同一性を共有することが見出された。この配列内の最も高い相同性の領域を使用して、cDNA供給源の同定およびcDNAクローンの生成のために、種々のPCR戦略を使用して、遺伝子特異的オリゴヌクレオチドを設計した。

【0304】

多数のcDNAライブラリーを、25μlの全反応容積で、10ngのcDNAライブラリーテンプレートDNA、それぞれ10pmolのアンプライマー(amp limer) : 2349-98 (5'-C-A-C-A-C-G-C-T-T-C-A-C-C-T-T-C-T-T-T-C-C-A-G-3'; 配列番号20) および2349-99 (5'-T-A-A-A-A-C-T-T-G-G-T-A-C-G-G-G-C-T-G-A-G-G-G-3'; 配列番号21)、ならびにReady-To-Go PCRビーズ(Amersham-Pharmacia、Piscataway、NJ)(Pharmacia、Piscataway、NJ)を含有する増幅反応で分析した。反応を、95℃にて5分間を1サイクル; 95℃にて15秒間、63℃にて15秒間、そして72℃にて1分間を30サイクル; および72℃にて10分間を1サイクルにて行った。予測されたサイズ(153bp)のPCR産物を、多数のcDNAライブラリー(ヒト胎児頭皮(オリゴdTでプライムした(primed)もの) およびヒト胎盤(オリゴdTでプライムしたものおよびランダムにプライムしたもの)を含む)において同定した。

【0305】

胎児頭皮および胎盤のcDNAライブラリーを、以下のようにして調製した。全RNAを、ヒト胎児頭皮から、およびヒト胎盤から標準的なRNA抽出手順を使用して抽出し、そしてポリ-A⁺ RNAを、標準的な手順を使用してこの全RNAから選択した。ランダムにプライムされたかオリゴdTでプライムされたcDNAを、このポリ-A⁺ RNAから、cDNA合成およびプラスミドクローニングキット用のSuperscript Plasmid System(Gibco-BRL)を使用して、製造者の示唆したプロトコルまたは他の適切な手順に従って合成した。得られたcDNAを、適切な制限酵素を用いて消化し、次いでpSPORT-1、または他の適切なクローニングベクターにライゲーションした。ライゲーション産物を、標準的な技術を使用してE. coliに形質転換し、そして細菌性形質転換体を、アンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン、またはクロラムフェニコールのいずれかを含有する培養プレートで選択した。cDNAライブラリーは、これらの形質転換体の全てまたはサブセットから構成された。

【0306】

5'RACE反応および3'RACE反応の両方を、IL-1ra-Rポリペプチドについての全長cDNA配列を作成するために行った。IL-1ra-RポリペプチドについてのcDNA配列の5'末端に対応するcDNA配列を単離するために、5'RACEを、10ngのオリゴdTプライムされたヒト胎児頭皮cDNAライブラリーをpSPORT1ならびにプライマー1572-36 (5'-G-T-G-T-G-G-A-A-T-T-G-T-G-A-G-C-G-G-A-T-A-A-C-3'; 配列番号22)

10

20

30

40

50

および 2349-99 を使用して行った。反応を、94℃にて1分間を1サイクル；94℃にて5秒間そして72℃にて5分間を5サイクル；94℃にて5秒間、70℃にて10秒間そして72℃にて3分間を5サイクル；94℃にて5秒間、68℃にて10秒間、そして72℃にて3分間を25サイクル；ならびに72℃にて7分間を1サイクルで行った。入れ子式 (nested) PCR を、5' RACE 増幅産物の一部およびプライマー 2328-91 (5'-C-T-A-T-G-A-C-C-A-T-G-A-T-T-A-C-G-C-C-A-A-G-C-3'；配列番号23) および 2351-47 (5'-G-C-T-G-T-A-C-T-G-G-C-T-G-C-T-G-G-G-G-C-3'；配列番号24) を使用して行った。入れ子式 PCR を、94℃にて1分間を1サイクル；94℃にて5秒間および72℃にて5分間を5サイクル；94℃にて5秒間、70℃にて10秒間、そして72℃にて3分間を5サイクル；94℃にて5秒間、68℃にて10秒間、そして72℃にて3分間を25サイクル；ならびに72℃にて7分間を1サイクルで行った。

10

【0307】

IL-1ra-R ポリペプチドについての cDNA 配列の 3' 末端に対応する cDNA 配列を単離するために、3' RACE を、10ng のオリゴ dT でプライムされたヒト胎児頭皮 cDNA ライブラリーを使用して pSPORT1 ならびにプライマー 2351-48 (5'-C-C-T-T-C-A-G-G-C-T-T-G-A-G-G-C-T-G-C-T-G-3'；配列番号25) および 2329-93 (5'-C-G-G-G-C-C-T-C-T-T-C-G-C-T-A-T-T-A-C-G-C-3'；配列番号26) を使用して行った。反応を94℃にて1分間を1サイクル；94℃にて5秒間および72℃にて5分間を5サイクル；94℃にて5秒間、70℃にて10秒間、および72℃にて3分間を5サイクル；94℃にて5秒間、68℃にて10秒間、および72℃にて3分間を25サイクル；ならびに72℃にて7分間を1サイクルで行った。入れ子式 PCR を、3' RACE 増幅産物の一部およびプライマー 2363-04 (5'-C-C-T-G-G-C-T-G-G-T-T-C-C-T-G-T-G-T-G-G-C-3'；配列番号27) および 2329-94 (5'-T-G-G-C-G-A-A-A-G-G-G-G-G-A-T-G-T-G-C-T-G-3'；配列番号28) を使用して行った。入れ子式 PCR を、95℃にて1分間を1サイクル；95℃にて30秒間および68℃にて1分間を30サイクル；ならびに68℃にて7分間を1サイクルで行った。IL-1ra-R ポリペプチドについての全長 cDNA 配列を、5' RACE クローンおよび 3' RACE クローンの得られた収集物からアセンブルした。

20

30

【0308】

IL-1ra-R ポリペプチドについての cDNA 配列の 5' 部分を、ヒト胎盤 MarathontTM cDNA ライブラリー (Clontech) 由来の cDNA 配列を独立して単離することにより確認した。IL-1ra-R ポリペプチドについての cDNA 配列の 5' 末端に対応する cDNA 配列を単離するために、5' RACE を、1ng のヒト胎盤 cDNA ならびにプライマー AP-1 (5'-C-C-A-T-C-C-T-A-A-T-A-C-G-A-C-T-C-A-C-T-A-T-A-G-G-G-C-3'；配列番号29；Clontech) および 2353-87 (5'-C-C-T-T-G-G-T-G-A-G-C-T-G-T-A-C-T-G-G-C-T-G-3'；配列番号30) を使用して行った。反応を、94℃にて2分間を1サイクル；94℃にて5秒間および72℃にて1.5分間を5サイクル；94℃にて5秒間および70℃にて1.5分間を5サイクル；94℃にて5秒間および68℃にて1.5分間を25サイクル；および86℃にて7分間を1サイクルで行った。入れ子式 PCR を、5' RACE 増幅産物の一部ならびにプライマー AP-1 および 2349-52 (5'-C-C-G-G-G-C-C-A-C-A-C-A-G-G-A-A-C-C-A-3'；配列番号31) を使用して行った。入れ子式 PCR を、94℃にて2分間を1サイクル；94℃にて10秒間および68℃にて1.5分間を30サイクル；および68℃にて7分間を1サイクルで行った。

40

【0309】

50

ヒト I L-1 r a-R ポリペプチドについての推定 c D N A 配列の配列分析は、この遺伝子が、152個のアミノ酸のタンパク質をコードする456bpのオープンリーディングフレーム（図1A～1B）を含むことを示した。ヒト I L-1 r a-R ポリペプチドの配列改変体もまた同定された。この改変体の配列分析は、この改変体についての遺伝子もまた、152個のアミノ酸のタンパク質をコードする456bpのオープンリーディングフレーム（図2A～2B）を含むことを示唆した。この改変体のヌクレオチド配列は、2つのヌクレオチド位置においてヒト I L-1 r a-R 遺伝子と異なる。

【0310】

図4A～4Bは、以下のアミノ酸配列アラインメントを図示する：ヒト I L-1 α (I L-1 __a l p h a ; 配列番号7)、ヒト I L-1 β (I L-1 __b e t a ; 配列番号8)、ヒト I L-1 レセプターアンタゴニスト (I L-1 R A ; 配列番号9)、ヒト I L-1 δ (I L-1 __d e l t a ; 配列番号10)、ヒト I L-1 r a-R ポリペプチド (I L-1 r a-R ; 配列番号2)、ヒト T a n g o-77 (T a n g o-77 ; 配列番号11)、ヒト Z i l l a 4 (Z i l l a 4 ; 配列番号12)、ヒト I L-1 ζ (I L-1 __z e t a ; 配列番号13)、ヒト I L-1 レセプターアンタゴニスト β (I L-1 R A __β ; 配列番号14)、ヒト S P O I L I I (S p o i l __I I ; 配列番号15)、ヒト I L-1 ε (I L-1 __e p s i l o n ; 配列番号16)、およびヒト I L-1 η (I L-1 __e t a ; 配列番号17)。図5は、I L-1 r a 遺伝子ファミリーの系統発生的関係を模式的に図示する。

【0311】

(実施例2：ヒト I L-1 r a-R ポリペプチド遺伝子 スプライス改変体 (バリエント) のクローニング)

概して、ヒト I L-1 r a-R ポリペプチド スプライス改変体 (バリエント) をコードする遺伝子をクローニングおよび分析するために、S a m b r o o k ら (前出) に記載の材料および方法を用いた。

【0312】

ヒト I L-1 r a-R ポリペプチドの スプライス改変体 をコードする全長 c D N A 配列を、以下のように調製したヒト胎盤 c D N A ライブラリーから単離した。標準的 R N A 抽出手順を用いて、総 R N A をヒト胎盤から抽出し、そして標準的手順を用いてこの総 R N A からポリ-A⁺ R N A を選択した。製造業者の示唆したプロトコルに従って、c D N A S y n t h e s i s a n d P l a s m i d C l o n i n g キット (G i b c o - B R L) のための S u p e r s c r i p t P l a s m i d S y s t e m を用いて、このポリ-A⁺ R N A から、オリゴ-d T プライムした c D N A を、合成した。得られた c D N A を N o t I で消化し、次いで 0.8% アガロースゲル上での電気泳動によって分画した。0.8～1.6 kb のフラグメントを単離し、精製し、次いで p S P O R T - 1 に連結した。連結 (ライゲーション) 産物を、標準的技術を用いて E. c o l i 中に形質転換し、そして細菌形質転換体を、アンピシリン含有培養プレート上で選択した。得られた形質転換体をプールして、c D N A ライブラリーを 作製し、そして プラスミド DNA を、この c D N A ライブラリーの 12 のプール (それぞれが約 80,000 コロニーを含有する) から調製した。

【0313】

10 ng のテンプレート DNA、アンプライマー 2349～98 および 2349～99 (各、0.4 μM の濃度)、ならびに R e a d y - t o - G o (すぐ使用できる) P C R ビーズを含有する増幅反応物 (総反応容積 25 μl) 中で、各 c D N A ライブラリープールの それぞれを、分析した。94℃5分を1サイクル；94℃30秒、65℃30秒、および72℃1分を30サイクル；ならびに72℃10分を1サイクルで、反応を実施した。c D N A ライブラリープールをまた、10 ng のテンプレート DNA、アンプライマー 2349～51 (5' - A - A - G - A - G - G - C - C - A - C - A - C - G - C - T - T - C - A - C - C - T - T - C - T - 3' ; 配列番号32) および 2349～52 (各、0.4 μM の濃度)、ならびに R e a d y - t o - G o (すぐ使用できる) P C R ビー

10

20

30

40

50

ズを含有する増幅反応物（総反応容積25 μ l）中で、分析した。94℃5分を1サイクル；94℃30秒、65℃30秒、および72℃1分を30サイクル；ならびに72℃10分を1サイクルで、反応を実施した。次いで、これらの反応で得られたPCR産物をアガロースゲル上で分析した。

【0314】

3つのプール由来のプラスミドDNAは、期待されるサイズを有するPCR産物を生成した。そして、これらの各々の陽性プール由来の3 $\times$ 10⁵ クローンを、アンプライマー2349-98および2349-99を用いるPCRによってスクリーニングした。PCRによって生成したPCR産物（zhvt-000329）の1つを、³²P-dCTPで標識し、プローブとして用いて、陽性のcDNAライブラリーのプールを再スクリーニングした。細菌コロニーを、（150mmプレートあたり、約50,000で）プレートし、次いで、ニトロセルロースフィルター上に吊り上げた。ExpressHybハイブリダイゼーション溶液（Clontech）中で68℃30分間、フィルターをプレハイブリダイズし、次いで、標識プローブを添加した同じ溶液中で、68℃一晩ハイブリダイズした。ハイブリダイゼーション後、このフィルターを、2 $\times$ SSCおよび0.05% SDS中で、室温で10分間2回洗浄し、次いで0.1 $\times$ SSCおよび0.1% SDS中で、68℃で30分間2回洗浄した。次いで、強化スクリーンを有するオートラジオグラフィに-80℃で2時間フィルターを曝した。cDNAライブラリープールの1つから、約1.2kbのインサートを含有する陽性クローン（RDS#199918503）を、同定した。別のcDNAライブラリープールから、約0.8kbのサイズのインサートを含有する第二の陽性クローン（RDS#199918501）を、同定した。これらのクローンの各々からプラスミドDNAを調製し、そして配列を分析した。

【0315】

これらのクローンの1つについて予想されるcDNA配列の配列分析によって、このcDNAが、ヒトIL-1 α -Rポリペプチド（実施例1を参照）の改変体をコードすることが示された。この改変体をコードする遺伝子は、171アミノ酸のタンパク質をコードする513bpのオープンリーディングフレームを含む（図3）。

【0316】

IL-1 α -R遺伝子（Genbank登録番号AC016724、コンティグ、フラグメント76649-96342）を含有するヒトゲノムの配列分析により、IL-1 α -R遺伝子の最初のエキソン（実施例1を参照）が、IL-1オメガ（Omega）（Genbank登録番号Z300050）の最後のエキソンの4.1kb下流に存在するが示された。ゲノム中のこれらの2つの遺伝子の密接な近似により、本ポリペプチドは、IL-1 α -R遺伝子、またはその改変体（実施例1を参照）の第二のエキソン上のIL-1オメガ（Omega）の最初の2つのエキソンのスプライシング（または融合）から生じ得ることが示唆される。従って、IL-1 α -Rポリペプチドの改変体は、IL-1 α -R スプライス改変体、融合タンパク質、などであり得る。IL-1Omegaにおける第二エキソンおよびIL-1 α -R遺伝子（またはその改変体）の第二エキソンの並列（juxtaposition）は、シグナルペプチドとして機能するらしい、N末端を有するタンパク質をコードする配列を生じる。図6は、ヒトIL-1 α -Rポリペプチド（成熟（Mature）CS329）と、ヒトIL-1 α -Rポリペプチドの配列改変体（成熟CS329改変体タンパク質）と、ヒトIL-1 α -Rポリペプチドのスプライス改変体（オメガ（Omega）329タンパク質）との間の関係を図示する。

【0317】

（実施例3：マウスIL-1 α -Rポリペプチド遺伝子のクローニング）

概して、マウスIL-1 α -Rポリペプチドをコードする遺伝子をクローニングおよび分析するために、Sambrookら（前出）に記載の材料および方法を用いた。

【0318】

マウスIL-1 α -RポリペプチドをコードするcDNAを単離するために、7日齢マ

10

20

30

40

50

ウス胚 cDNA ライブラリーテンプレート、ならびにアンプライマー 2557-95 (5'-A-A-G-C-C-T-T-T-T-C-T-T-C-T-T-T-G-C-C-T-C-A-G-T-G-3'; 配列番号 33) および 2557~96 (5'-T-G-C-C-A-T-T-T-A-A-T-G-T-A-A-C-A-C-G-G-T-C-A-C-A-G-3'; 配列番号 34)、ならびに標準的技術を用いて、PCR を実施した。

【0319】

マウス IL-1ra-R ポリペプチドの推定 cDNA 配列の配列分析によって、この遺伝子が、152 アミノ酸のタンパク質をコードする 456 bp のオープンリーディングフレームを含むことが示された (図 7)。図 8 は、ヒト IL-1ra-R ポリペプチド (human IL-1ra-R; 配列番号 2) およびマウス IL-1ra-R ポリペプチド (mouse IL-1ra-R; 配列番号 36) のアミノ酸配列アラインメントを例示する。図 9A~9I は、マウス IL-1ra-R 遺伝子 (配列番号 37) のゲノムヌクレオチド配列を例示する。エキソン 1~4 のコード部分の位置を示す (下線)。

【0320】

(実施例 4: IL-1ra-R mRNA 発現)

IL-1ra-R mRNA の発現を、10 ng の cDNA ライブラリーテンプレート DNA、10 pmol のアンプライマー 2349~98 および 2349~99、ならびに Ready-to-Go (すぐ使用できる) PCR ビーズを含有する増幅反応物 (総反応容積 25 µl) 中での PCR によって検討した。95°C 5 分を 1 サイクル; 95°C 15 秒、63°C 15 秒、および 72°C 1 分を 30 サイクル; ならびに 72°C 10 分を 1 サイクルで、反応を実施した。ヒト胎児頭皮、ヒト胎児眼、ヒト胆嚢、およびヒト胎盤を含む、多数の cDNA ライブラリー中から、予期されたサイズ (153 bp) の PCR 産物を、同定した。IL-1ra-R mRNA 発現をまた、アンプライマー 2349~51 および 2349~52、ならびに Titan システム (Boehringer) を用いる RT-PCR によって、胎児眼および胎児脾臓中で検出した。55°C 30 分を 1 サイクル; 94°C 15 秒、64°C 15 秒、および 68°C 50 秒 (1 サイクルについて 2 秒ずつ増加) を 30 サイクル; ならびに 68°C 7 分を 1 サイクルで、これらの反応を実施した。

【0321】

IL-1ra-R mRNA の発現を、ヒトおよびマウスの RNA ブロット (Clontech) を用いたノーザンブロット分析によって試験した。ブロットをまず、Pre-Hyb 溶液 (Amersham) 中で 65°C で 30 分間、プレハイブリダイズし、次いで、IL-1ra-R ポリペプチドをコードする cDNA 配列のヌクレオチド 1~474 に対応する、25 ng の ³²P 標識プローブを含有する同じ溶液中で、65°C 一晩プローブした。このプローブを、Redi Prime II キット (Pharmacia) を用いて標識した。ハイブリダイゼーション後、ブロットを、6×SSC および 0.1% SDS 中で、1 時間 2 回、2×SSC および 0.1% SDS 中で 1 時間 2 回、0.2×SSC および 0.1% SDS 中で 30 分間 2 回洗浄し、次いで 2×SSC 中でリンスした。ホスホイメージャー (phosphorimager) 中のノーザンブロットの一晩の曝露後、約 1.6 kb の転写物を、マウスの骨格筋中で検出し (図 10A)、そして約 2.9 kb の転写物を、ヒトの脾臓および末梢血白血球中で検出した (図 10B および 10C)。同じプローブを用いたドットブロット (Clontech) の分析において、IL-1ra-R mRNA をマウス骨格筋、顎下腺、および精巣上体中で検出した。

【0322】

IL-1ra-R mRNA の発現を、インサイチュハイブリダイゼーションによって局在化した。正常胚および成体マウス組織のパネルを 4% パラホルムアミド中で固定し、パラフィンに包埋し、そして 5 µm に切片化した。切片化した組織を、0.2 M HCl 中で透過化処理し、プロテイナーゼ K で消化し、そしてトリエタノールアミンおよび無水酢酸でアセチル化した。切片を、ハイブリダイゼーション溶液 (300 mM NaCl、20 mM Tris-HCl、pH 8.0、5 mM EDTA、1×デンハート溶液、0.50

10

20

30

40

50

2% SDS、10mM DTT、0.25mg/ml tRNA、25μg/ml ポリA、25μg/ml ポリCおよび50%ホルムアミド) 中で1時間60℃でプレハイブリダイズし、次いで、10%デキストランおよび 2×10^4 cpm/μl の³²P-標識アンチセンスリボプローブ(ヒトIL-1ra-R遺伝子に相補的)を含有する同じ溶液中で60℃で一晩ハイブリダイズする。標準的技術を用いて、ヒトIL-1ra-R cDNAを含有するクローンのインビトロ転写によって、このリボプローブを得る。

【0323】

ハイブリダイゼーション後、切片を、ハイブリダイゼーション溶液中でリンスし、RNase Aで処理してハイブリダイズしていないプローブを消化し、次いで0.1×SSC中で55℃で30分間洗浄する。次いで、切片をNTB-2エマルジョン(Kodak, Rochester, NY)に浸し、4℃に3週間曝し、発色させ、そしてヘマトキシリンおよびエオシンで対比染色する。組織形態学およびハイブリダイゼーションシグナルを、脳(矢状断面1つおよび冠状断面2つ)、胃腸管(食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、近位結腸、および遠位結腸)、下垂体、肝臓、肺、心臓、脾臓、胸腺、リンパ節、腎臓、副腎、膀胱、膵臓、唾液腺、雄性および雌性生殖器(雌性の卵巣、卵管、および子宮；ならびに雄性の精巣、精巣上体、前立腺、精囊および輸精管)、BATおよびWAT(皮下、腎臓周囲)、骨(大腿)、皮膚、乳房、および骨格筋についての暗野かつ標準のイルミネーションによって同時に分析する。

【0324】

(実施例5: IL-1ra-Rポリペプチドの生成)

(A. 細菌におけるIL-1ra-Rポリペプチドの発現)

PCRを用いて、IL-1ra-RポリペプチドをコードするテンプレートDNA配列を増幅する。このPCRには、この配列の5'および3'末端に対応するプライマーを用いる。増幅したDNA産物を改変して、発現ベクター内への挿入を可能にするために制限酵素部位を含むようにし得る。PCR産物をゲル精製し、そして標準的組み換えDNA方法論を用いて発現ベクター中に挿入する。luxプロモーターおよびカナマイシン耐性をコードする遺伝子を含むpAMG21(ATCC番号98113)のような代表的ベクターを、挿入したDNAの方向性クローニングのために、BamHIおよびNdeIを用いて消化する。連結した混合物を、エレクトロポレーションによってE. coli 宿主株中に形質転換し、そして形質転換体をカナマイシン耐性について選択する。選択したコロニー由来のプラスミドDNAを、単離し、そしてDNA配列決定に供してインサート(挿入物)の存在を確認する。

【0325】

形質転換した宿主細胞を、導入前に、30μg/mLカナマイシンを含有する2×YT培地中で30℃でインキュベートする。最終濃度30ng/mLへのN-(3-オキソヘキサノイル)-D-グルタミン酸の添加、それに続く30℃かまたは37℃での6時間のインキュベーションによって、遺伝子発現を誘導する。IL-1ra-Rポリペプチドの発現を、培養物の遠心分離、細菌ペレットの再懸濁および溶解、ならびに、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動による宿主細胞タンパク質の分析によって評価する。

【0326】

IL-1ra-Rポリペプチドを含有する封入体を、以下の通り精製する。細菌細胞を遠心分離によってペレット化し、そして水中に再懸濁する。この細胞懸濁液を超音波処理によって溶解し、そして195,000×gでの5~10分間の遠心分離によってペレット化する。この上清を廃棄し、そしてペレットを洗浄してホモジナイザーに移す。このペレットを、均一に懸濁されるまで、5mLのPercoll溶液(75%液体Percollおよび0.15M NaCl)中にホモジナイズし、次いで希釈して21,600×gで30分間遠心分離する。封入体を含む勾配画分を回収してプールする。単離した封入体をSDS-PAGEによって分析する。

【0327】

E. coli が産生したIL-1ra-Rポリペプチドに相当する、SDSポリアクリル

10

20

30

40

50

アミドゲル上の単一のバンドを、ゲルから切り出し、そしてN末端アミノ酸配列を、本質的にMatsudairaら、1987, J. Biol. Chem. 262:10~35に記載のように決定する。

【0328】

(B. 哺乳動物細胞におけるIL-1ra-Rポリペプチドの発現)

PCRを用いて、IL-1ra-RポリペプチドをコードするテンプレートDNA配列を増幅する。このPCRには、この配列の5'および3'末端に対応するプライマーを用いる。増幅したDNA産物を改変して、発現ベクター内への挿入を可能にするために制限酵素部位を含むようにし得る。PCR産物をゲル精製し、そして標準的組み換えDNA方法論を用いて発現ベクター中に挿入する。Epstein-Barrウイルス複製起点を含む代表的な発現ベクターであるpCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を、293-EBNA-1細胞におけるIL-1ra-Rポリペプチドの発現のために用い得る。増幅およびゲル精製したPCR産物を、pCEP4ベクターに連結し、そしてリポフェクチンによって293-EBNA細胞中に導入する。トランスフェクトした細胞を、100 μ g/mLのハイグロマイシン中で選択し、そして得られた薬物耐性培養物をコンフルエンスになるまで増殖する。次いで、この細胞を無血清培地中で72時間培養する。馴化培地を取り出し、IL-1ra-Rポリペプチド発現をSDS-PAGEによって分析する。

10

【0329】

IL-1ra-Rポリペプチド発現は、銀染色によって検出できる。あるいは、IL-1ra-Rポリペプチドを、ペプチドタグに対する抗体を用いてウエスタンブロット分析によって検出可能である、エピトープタグ（例えば、IgG定常ドメインまたはFLAGエピトープ）を有する融合タンパク質として生成する。IL-1ra-Rポリペプチドを、SDS-ポリアクリルアミドゲルから切り出し得、またはIL-1ra-R融合タンパク質を、エピトープタグに対するアフィニティークロマトグラフィーによって精製し、そして本明細書に記載のようなN末端アミノ酸配列分析に供する。

20

【0330】

(C. 哺乳動物細胞におけるIL-1ra-Rポリペプチドの発現および精製)

リポフェクチンまたはリン酸カルシウムプロトコルのいずれかを用いて、293 EBNA細胞またはCHO細胞中に、IL-1ra-Rポリペプチド発現構築物を導入する。

30

【0331】

生成されるIL-1ra-Rポリペプチドに対する機能的研究を行うため、ハイグロマイシン選択293 EBNAクロニングのプールから大量の馴化培地を生成する。この細胞を500 cm Nunc Triple Flasks中で、80%コンフルエンスになるまで培養し、その後、培地を回収する1週間前に無血清培地に切り換える。馴化培地を回収し、そして精製まで-20℃に凍結する。

【0332】

馴化培地を下記のとおり、アフィニティークロマトグラフィーによって精製する。この培地を解凍し、次いで0.2 μ mフィルターに通す。プロテインGカラムをPBSでpH7.0に平衡化し、次いで濾過した培地をロードした。このカラムをA₂₈₀の吸収がベースラインに達するまでPBSで洗浄する。0.1M Glycine-HClを用いてpH7.2でIL-1ra-Rポリペプチドを、カラムから溶出し、直ちに1M Tris-HClを用いてpH8.5で中和する。IL-1ra-Rポリペプチドを含有する画分をプールし、PBS中で透析し、そして-70℃で貯蔵した。

40

【0333】

ヒトIL-1ra-Rポリペプチド-Fc融合ポリペプチドの第Xa因子切断について、アフィニティークロマトグラフィー精製したタンパク質を、50mM Tris-HCl、100mM NaCl、2mM CaCl₂中でpH8.0で透析する。制限プロテアーゼ第Xa因子を、透析したタンパク質に1/100 (w/w)で添加し、そしてこのサンプルを室温で一晩消化する。

50

【0334】

(実施例6：抗IL-1ra-Rポリペプチド抗体の生成)

IL-1ra-Rポリペプチドに対する抗体を、生物学的合成または化学的合成によって生成した、精製タンパク質またはIL-1ra-Rペプチドを用いて免疫することによって獲得し得る。抗体を生成するための適切な手順は、HudsonおよびBay、Practical Immunology (第二版、Blackwell Scientific Publication)に記載の手順を含む。

【0335】

抗体生成のための1つの手順において、動物(代表的には、マウスまたはウサギ)に、IL-1ra-R抗原(例えば、IL-1ra-Rポリペプチド)を注射し、そして、ハイブリドーマ産生のため、ELISAによって決定した十分な血清力価レベルを有する動物を、選択する。免疫した動物の脾臓を回収し、そして単一細胞懸濁液として調製し、これから脾臓細胞を回収する。脾臓細胞をマウスミエローマ細胞(例えば、Sp2/0-Ag14細胞)に融合し、DMEM(200U/mLペニシリン、200μg/mL硫酸ストレプトマイシン、および4mMグルタミン含有)中でまずインキュベートし、次いで、HAT選択培地(ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン)中でインキュベートする。選択後、組織培養上清を各融合ウェルから取り出し、そしてELISAによって、抗IL-1ra-R抗体産生について試験する。

【0336】

抗IL-1ra-R抗体を得るため、別の手順をまた、使用し得る。この手順は例えば、ヒト抗体の生成のためのヒトIg遺伝子座を保有するトランスジェニックマウスの免疫、および合成抗体ライブラリー(例えば、抗体可変ドメインの変異誘発によって生成されるライブラリーなど)のスクリーニングである。

【0337】

IL-1ra-Rポリペプチドに対する抗体は、E. coli中で生成され、そして単離された全長IL-1ra-Rポリペプチドを用いてNew Zealand White rabbitを免疫することによって得られた。粗ポリクローナル免疫血清を回収し、そして組み換えIL-1ra-Rポリペプチド(図11A~11B、レーン1、4、および7)、組み換えIL-1ra-Rポリペプチド改変体(図11A~11B、レーン2、5、および8)、および組み換えIL-1ra(図11A~11B;レーン3、6、および9)を用いる免疫沈澱分析に用いた。10ng(図11A、レーン4~6)もしくは0.6μg(図11B、レーン7~9)のいずれかの組み換えポリペプチドを、18%Tris-グリシンゲル上に直接ロードすること、またはゲル上にサンプルをロードする前に、0.2μlの粗抗血清(図11A、レーン1~3)を用いて1μgの組み換えポリペプチドを免疫沈降することによって、ゲルを調製した。SDS-PAGE分離後、ゲルをPVDF膜上にブロットし、そして粗抗IL-1ra-R血清の1:1000希釈を用いて発色させ、続いて、HRP結合体化プロテインAおよびECLで検出した。図11Bに示すゲルを、ブロッティング後、Gelcode Blue(Pierce)で染色した。

IL-1ra-Rポリペプチドに対する抗体は、膜固定IL-1ra-RポリペプチドおよびIL-1ra-Rポリペプチド改変体の両方を検出するが、IL-1raは検出しないことが示された。溶液中で、IL-1ra-Rポリペプチドは、IL-1ra-Rポリペプチド改変体よりも効率的に認識された。

【0338】

(実施例7：トランスジェニックマウスにおけるIL-1ra-Rポリペプチドの発現)

IL-1ra-Rポリペプチドの生物学的活性を評価するため、肝臓特異的ApoEプロモーターの制御下で、IL-1ra-Rポリペプチド/Fc融合タンパク質をコードする構築物を調製する。この構築物の送達により、IL-1ra-Rポリペプチドの機能に関する情報である、病理的变化を生じることが期待される。同様に、βアクチンプロモーターの制御下で、全長IL-1ra-Rポリペプチドを含む構築物を調製する。この構築物の送達により、遍在性発現を生じることが期待される。

10

20

30

40

50

【0339】

これらの構築物を生成するために、PCRを用いて、IL-1ra-RポリペプチドをコードするテンプレートDNA配列を増幅する。このPCRには、所望の配列の5'および3'末端に対応するプライマーを用いる。そしてこの配列は、発現ベクター内への増幅産物の挿入を可能にするために制限酵素部位を組み込む。増幅後、PCR産物をゲル精製し、適切な制限酵素で消化し、そして標準的組み換えDNA技術を用いて発現ベクター中に連結する。例えば、増幅したIL-1ra-Rポリペプチド配列を、Grahamら、1997、Nature Genetics, 17:272~74およびRayら、1991 Genes Dev. 5:2265~73に記載のように、ヒトβアクチンプロモーターの制御下で発現ベクター中にクローニングし得る。

10

【0340】

連結（ライゲーション）後、反応混合物を用いて、E. coli 宿主株をエレクトロポレーションによって形質転換し、そして形質転換体を、薬物耐性で選択する。選択したコロニー由来のプラスミドDNAを単離して、DNA配列決定に供し、適切なインサートの存在および変異が存在しないことを確認する。IL-1ra-Rポリペプチド発現ベクターを、2回のCsCl密度勾配遠心分離を通じて精製し、適切な制限酵素で切断し、そして、IL-1ra-Rポリペプチド導入遺伝子を含む直線フラグメントを、ゲル電気泳動によって精製する。精製したフラグメントを、5mM Tris (pH 7.4) および0.2mM EDTA中で、2mg/mLの濃度で、再懸濁する。

【0341】

BDF1×BDF1交配マウス由来の単一細胞胚を、記載（PCT公開番号WO97/23614）のように注射する。胚を、CO₂ インキュベーター中で一晚培養し、そして15~20の2細胞胚を偽妊娠CD1雌性マウスの卵管に移す。マイクロインジェクションした胚の着床から得た子孫を、以下のように、ゲノムDNAサンプル中に取り込んだ導入遺伝子のPCR増幅でスクリーニングする。耳切片を20mLの耳緩衝液（20mM Tris, pH 8.0, 10mM EDTA, 0.5% SDS、および500mg/mL プロテイナーゼK）中で、55℃で一晩消化する。次いで、このサンプルを200mLのTEで希釈し、そして2mLの耳サンプルを、適切なプライマーを用いるPCR反応中で用いる。

20

【0342】

8週齢で、トランスジェニック創始動物およびコントロール動物を、剖検および病理分析のため、屠殺する。脾臓の一部を取り出し、そしてTotal RNA Extraction Kit (Qiagen)を用いて、脾臓から、総細胞RNAを単離し、そして導入遺伝子発現を、RT-PCRによって決定する。脾臓から回収したRNAを、以下のように、SuperScriptTM Preamplification System (Gibco-BRL)を用いてcDNAに変換する。適切なプライマー（発現ベクター配列に位置し、そしてIL-1ra-Rポリペプチド導入遺伝子の3'である）を用いて、導入遺伝子転写物からcDNA合成をプライムする。トランスジェニック創始動物およびコントロール由来の10mgの総脾臓RNAを、1mMのプライマーとともに、10分間70℃でインキュベートし、そして氷上に置く。次いで、反応物に、10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 2.5mM MgCl₂, 10mMの各dNTP, 0.1mM DTT、および200UのSuperScript II逆転写酵素を補充する。42℃で50分間のインキュベーション後、72℃で15分間加熱することによって反応を停止し、2UのRNase Hを用いて20分間37℃で消化する。次いで、サンプルをIL-1ra-Rポリペプチドに特異的なプライマーを用いるPCRによって増幅する。

30

40

【0343】

（実施例8：トランスジェニックマウスにおけるIL-1ra-Rポリペプチドの生物学的活性）

安楽死の前に、トランスジェニック動物を計量し、イソフルオロラン (isofluror

50

ane) によって麻酔し、そして心臓穿刺によって採血する。サンプルを、血液学および血清化学分析に供する。X線撮影を、最終的な放血後に行う。肉眼解剖の際に、主な内臓器官を、重量分析に供する。

【0344】

肉眼解剖後、組織（すなわち、肝臓、脾臓、膵臓、胃、胃腸管全体、腎臓、生殖器官、皮膚および乳腺、骨、脳、心臓、肺、胸腺、気管、食道、甲状腺、副腎、膀胱、リンパ節および骨格筋）を取出し、そして10%緩衝化Zn-ホルマリン中で組織学的検査のために固定する。固定後、組織をパラフィンブロック中で処理し、そして3mmの切片を得る。全ての切片を、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色し、次いで組織学的分析に供する。

【0345】

トランスジェニックマウスおよびコントロールマウスの両方の脾臓、リンパ節およびパイアー斑を、以下の通りにB細胞特異的抗体およびT細胞特異的抗体についての免疫組織学的分析に供する。ホルマリンで固定したパラフィン包埋切片を脱パラフィン処理し、そして脱イオン水中で水和する。切片を3%過酸化水素でクエンチし、Protein Block (Lipshaw, Pittsburgh, PA) でブロックし、そしてラットモノクローナル抗マウスB220およびCD3 (Harlan, Indianapolis, IN) 中でインキュベートする。抗体結合を、色素原 (chromagen) としてDAB (BioTek, Santa Barbara, CA) を用いて、ビオチン化ウサギ抗ラット免疫グロブリンおよびペルオキシダーゼ結合体化ストレプトアビジン (BioGenex, San Ramon, CA) によって検出する。切片を、ヘマトキシリンで対

10

20

【0346】

剖検後、トランスジェニック動物およびコントロールの同腹仔由来の脾臓および胸腺のMLNおよび切片を取出す。シリンジの平らな末端を用いて100mmナイロン性細胞ストレーナー (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) の底に対してこの組織を穏やかに粉砕することによって単細胞懸濁物を調製する。細胞を2回洗浄し、計数し、次いで各組織由来の約 1×10^6 細胞を、20 μ L 容量において0.5 μ g CD16/32 (Fc γ II/III) Fcブロックで10分間インキュベートする。次いで、サンプルを、FITCまたはPEに結合体化した、CD90.2 (Thy-1.2)、CD45R (B220)、CD11b (Mac-1)、Gr-1、CD4またはCD8に対するモノクローナル抗体 (PharMingen, San Diego, CA) の0.5 μ g 抗体を有する、100 μ L 容量のPBS (Ca⁺ およびMg⁺ を欠く)、0.1%ウシ血清アルブミンおよび0.01%アジ化ナトリウム中で2~8℃で30分間染色する。抗体結合後、細胞を洗浄し、次いでFACSscan (Becton Dickinson) でのフローサイトメトリーによって分析する。

30

【0347】

(実施例9: IL-1ra-Rポリペプチドの機能化)

IL-1ra-Rポリペプチドが、IL-1、IL-18または他のサイトカインに対する細胞応答に影響を与えるか否かを評価するために、以下の実験を行った。最初に、マウスの骨髓細胞を、以前に記載されたとおりのレトロウイルス感染 (Yanら, 1999, Exp. Hematol. 27: 1409-17) によってIL-1ra-R遺伝子で形質導入した。次いで、形質導入された骨髓を用いて、致死的に照射されたレシピエントマウスに移植した。造血が回復したら、IL-1ra-R形質導入マウスおよびコントロールマウス（すなわち、空のレトロウイルスベクターで形質導入したマウス）由来の骨髓および脾臓細胞を、一連の分析 (FACS分析 (図12)、コロニーアッセイ (図13A~13B) およびIL-12 (図14) またはIL-12+IL-18 (図15) のいずれかに応じた γ -インターフェロン産生を含む) に供した。

40

【0348】

このデータは、IL-1ra-R遺伝子の発現が、脾臓中の造血前駆体の特定のサブセット（最も顕著にはG-CSFはGM-CFCを誘導した; SCF/EpoはBFU-E/

50

C F U - M i x を誘導した；そして C S F - 1 は M - C F C を誘導した）および骨髄中の造血前駆体の特定のサブセット（I L - 3 および G - C S F は G M - C F C を誘導した；S C F / E p o は B F U - E / C F U - M i x を誘導し、そして I L - 3 / E p o は G M - C F C / C F U - M i x を誘導した）の相対量および／またはサイトカイン応答に影響を与えることを示唆する。

【0349】

I L - 1 r a - R ポリペプチドの発現はまた、脾細胞上での C D 4 および N K 1 . 1 の表面発現の減少と、ならびに脾細胞が I L - 1 2 単独または I L - 1 2 + I L - 1 8 に応じて γ - インターフェロンを産生する能力の減少と相関する。

【0350】

本発明を好ましい実施形態に関して記載してきたが、改変および修飾が当業者に思い浮かぶことが理解される。それゆえ、添付の特許請求の範囲が、本願発明の範囲内に入る全てのこのような均等な改変物を包含することが意図される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1A～1Bは、ヒト I L - 1 r a - R 遺伝子のヌクレオチド配列（配列番号1）、およびヒト I L - 1 r a - R ポリペプチドの推定のアミノ酸配列（配列番号2）を示す。

【図2】 図2A～2Bは、ヒト I L - 1 r a - R 遺伝子改変体のヌクレオチド配列（配列番号3）、およびこの改変体によりコードされるヒト I L - 1 r a - R ポリペプチドの推定のアミノ酸配列（配列番号4）を示す。

【図3】 図3は、ヒト I L - 1 r a - R スプライス改変体のヌクレオチド配列（配列番号5）、およびこのスプライス改変体によりコードされるヒト I L - 1 r a - R ポリペプチドの推定のアミノ酸配列（配列番号6）を示す。

【図4】 図4A～4Bは、ヒト I L - 1 α (I L - 1 _ _ a l p h a ; 配列番号7)、ヒト I L - 1 β (I L - 1 _ _ b e t a ; 配列番号8)、ヒト I L - 1 レセプターアンタゴニスト (I L - 1 R A ; 配列番号9)、ヒト I L - δ (I L - 1 _ _ d e l t a ; 配列番号10)、ヒト I L - 1 r a - R ポリペプチド (I L - 1 r a - R ; 配列番号2)、ヒト T a n g o - 7 7 (T a n g o - 7 7 ; 配列番号11)、ヒト Z i l l a 4 (Z i l l a 4 ; 配列番号12)、ヒト I L - 1 ζ (I L - 1 _ _ z e t a ; 配列番号13)、ヒト I L - 1 レセプターアンタゴニスト β (I L - 1 R A _ _ b e t a ; 配列番号14)、ヒト S P O I L I I (s p o i l _ _ I I ; 配列番号15)、ヒト I L - 1 ϵ (I L - 1 _ _ e p s i l o n ; 配列番号16)、およびヒト I L - 1 η (I L - 1 _ _ e t a ; 配列番号17) のアミノ酸アライメントを示す。

【図5】 図5は、I L - r a 遺伝子ファミリーの系統学的相関を図で示す。

【図6】 図6は、ヒト I L - 1 r a - R ポリペプチド (M a t u r e C S 3 2 9) と、ヒト I L - 1 r a - R ポリペプチドの配列改変体 (M a t u r e C S 3 2 9 改変体タンパク質) と、ヒト I L - 1 r a - R ポリペプチドのスプライス改変体 (O m e g a 3 2 9 タンパク質) との間の相関を図で示す。

【図7】 図7は、マウス I L - 1 r a - R 遺伝子のヌクレオチド配列（配列番号35）およびマウス I L - 1 r a - R ポリペプチドの推定アミノ酸配列（配列番号36）を示す。

【図8】 図8は、ヒト I L - 1 r a - R ポリペプチド (h u I L - 1 r a - R ; 配列番号2) と、マウス I L - 1 r a - R ポリペプチド (m u I L - 1 r a - R ; 配列番号36) とのアミノ酸配列アライメントを示す。

【図9】 図9A～9Iは、マウス I L - 1 r a - R 遺伝子（配列番号37）についてのゲノムヌクレオチド配列を示す。エキソン1～4のコード部分の位置を示す（下線）。

【図10】 図10A～10Cは、ノーザンブロット分析により検出される、マウス（図10A）およびヒト（図10B～10C）の I L - 1 r a - R m R N A 発現を示す。

【図11】 図11A～11Bは、抗 I L - 1 r a - R 抗体を用いるウェスタンブロット分析の結果を示す。

10

20

30

40

50

【図12】 図12は、IL-1ra-R遺伝子を含むレトロウイルスベクターを用いて形質導入したマウス骨髓細胞を移植した、致死照射したレシピエントマウスから回収した脾細胞および骨髓細胞のFACS分析の結果を示す。リンパ球の画分中の細胞の割合を、示された細胞表面マーカーを用いる標準的FACS分析に供した細胞について示す。

【図13A】 図13Aは、IL-1ra-R遺伝子を含むレトロウイルスベクターを用いて形質導入したマウス骨髓細胞を移植した、致死照射したレシピエントマウスから回収した脾細胞および骨髓細胞で行われたコロニーアッセイの結果を示す。形質導入マウスおよびコントロールマウス由来の骨髓細胞および脾細胞を、標準的コロニーアッセイ条件下で培養し、そしてコロニーを14日目に計数した。

【図13B】 図13Bは、IL-1ra-R遺伝子を含むレトロウイルスベクターを用いて形質導入したマウス骨髓細胞を移植した、致死照射したレシピエントマウスから回収した脾細胞および骨髓細胞で行われたコロニーアッセイの結果を示す。形質導入マウスおよびコントロールマウス由来の骨髓細胞および脾細胞を、標準的コロニーアッセイ条件下で培養し、そしてコロニーを14日目に計数した。

【図14】 図14は、IL-1ra-R遺伝子を含むレトロウイルスベクターを用いて形質導入したマウス骨髓細胞を移植した、致死照射したレシピエントマウスから回収した脾細胞におけるIL-12処置に対する応答としての γ -インターフェロンの産生を示す。馴化培地のサンプルを、IL-12 (1 ng/ml) の存在下で48時間増殖させた培地 (2×10^6 細胞/ウェル/ml) から取り出し、そしてIFN- γ をELISAにより定量した。

【図15】 図15は、IL-1ra-R遺伝子を含むレトロウイルスベクターを用いて形質導入したマウス骨髓細胞を移植した、致死照射したレシピエントマウスから回収した脾細胞におけるIL-12およびIL-18処置に対する応答としての γ -インターフェロンの産生を示す。馴化培地のサンプルを、IL-12 (1 ng/ml) およびIL-18 (10 ng/ml) の存在下で48時間増殖させた培地 (2×10^6 細胞/ウェル/ml) から取り出し、そしてIFN- γ をELISAにより定量した。

【配列表】

10

20

SEQUENCE LISTING

<110> Saris, Christiaan M.
 Giles, Jennifer
 Mu, Sharon X.
 Xia, Min
 Bass, Michael B.
 Craveiro, Roger

<120> Interleukin-1 Receptor Antagonist-Related Molecules and
 Uses Thereof

<130> 00-1213

<140>

<141>

10

<150> 60/170,191

<151> 1999-12-10

<150> 60/188,053

<151> 2000-03-09

<150> 60/194,521

<151> 2000-04-04

<150> 60/195,910

<151> 2000-04-10

<160> 37

20

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1020

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (64)..(522)

<400> 1

cagggatcag ggttcagga actcaggatc tgcagtgagg accagacacc actgattgca 60

gga atg tgt tcc ctc ccc atg gca aga tac tac ata att aaa tat gca 108

Met Cys Ser Leu Pro Met Ala Arg Tyr Tyr Ile Ile Lys Tyr Ala

1 5 10 15

30

gac cag aag gct cta tac aca aga gat ggc cag ctg ctg gtg gga gat 156

Asp Gln Lys Ala Leu Tyr Thr Arg Asp Gly Gln Leu Leu Val Gly Asp

20 25 30

cct gtt gca gac aac tgc tgt gca gag aag atc tgc aca ctt cct aac 204

Pro Val Ala Asp Asn Cys Cys Ala Glu Lys Ile Cys Thr Leu Pro Asn

35 40 45

aga ggc ttg gac cgc acc aag gtc ccc att ttc ctg ggg atc cag gga 252

Arg Gly Leu Asp Arg Thr Lys Val Pro Ile Phe Leu Gly Ile Gln Gly

50 55 60

ggg agc cgc tgc ctg gca tgt gtg gag aca gaa gag ggg cct tcc cta 300
 Gly Ser Arg Cys Leu Ala Cys Val Glu Thr Glu Glu Gly Pro Ser Leu
 65 70 75

cag ctg gag gat gtg aac att gag gaa ctg tac aaa ggt ggt gaa gag 348
 Gln Leu Glu Asp Val Asn Ile Glu Glu Leu Tyr Lys Gly Gly Glu Glu
 80 85 90 95

gcc aca cgc ttc acc ttc ttc cag agc agc tca ggc tcc gcc ttc agg 396
 Ala Thr Arg Phe Thr Phe Phe Gln Ser Ser Ser Gly Ser Ala Phe Arg
 100 105 110

ctt gag gct gct gcc tgg cct ggc tgg ttc ctg tgt ggc ccg gca gag 444
 Leu Glu Ala Ala Ala Trp Pro Gly Trp Phe Leu Cys Gly Pro Ala Glu
 115 120 125

ccc cag cag cca gta cag ctc acc aag gag agt gag ccc tca gcc cgt 492
 Pro Gln Gln Pro Val Gln Leu Thr Lys Glu Ser Glu Pro Ser Ala Arg
 130 135 140

acc aag ttt tac ttt gaa cag agc tgg tag ggagacagga aactgcgttt 542
 Thr Lys Phe Tyr Phe Glu Gln Ser Trp
 145 150

tagccttggtg cccccaaacc aagctcatcc tgctcagggt ctatggtagg cagaataatg 602

tcccccgaaa tatgtccaca tcctaattccc aagatctgtg catatgttac catacatgtc 662

caaagagggt ttgcaaatgt gattatgtta aggatcttga aatgaggaga caatcctggg 722

ttatccttgt gggctcagtt taatcacaag aaggaggcag gaagggagag tcagagagag 782

aatggaagat accatgcttc taattttgaa gatggagtga ggggccttga gccaacaaat 842

gcaggtgttt ttagaagggtg gaaaagccaa gggaacggat tctcctctag agtctccgga 902

aggaacacag ctcttgacac atggatttca gctcagtgac acccatttca gacttctgac 962

ctccacaact ataaaataat aaacttgtgt tattgttaac ctctaaaaaa aaaaaaaaa 1020

<210> 2

<211> 152

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Cys Ser Leu Pro Met Ala Arg Tyr Tyr Ile Ile Lys Tyr Ala Asp
 1 5 10 15

Gln Lys Ala Leu Tyr Thr Arg Asp Gly Gln Leu Leu Val Gly Asp Pro
 20 25 30

Val Ala Asp Asn Cys Cys Ala Glu Lys Ile Cys Thr Leu Pro Asn Arg
 35 40 45

Gly Leu Asp Arg Thr Lys Val Pro Ile Phe Leu Gly Ile Gln Gly Gly
 50 55 60

Ser Arg Cys Leu Ala Cys Val Glu Thr Glu Glu Gly Pro Ser Leu Gln
 65 70 75 80

10

20

30

Leu Glu Asp Val Asn Ile Glu Glu Leu Tyr Lys Gly Gly Glu Glu Ala
 85 90 95

Thr Arg Phe Thr Phe Phe Gln Ser Ser Ser Gly Ser Ala Phe Arg Leu
 100 105 110

Glu Ala Ala Ala Trp Pro Gly Trp Phe Leu Cys Gly Pro Ala Glu Pro
 115 120 125

Gln Gln Pro Val Gln Leu Thr Lys Glu Ser Glu Pro Ser Ala Arg Thr
 130 135 140

Lys Phe Tyr Phe Glu Gln Ser Trp
 145 150

<210> 3
 <211> 1020
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (64)..(522)

<400> 3
 cagggatcag ggttcagga actcaggatc tgcagtgagg accagacacc actgattgca 60

gga atg tgt tcc ctc ccc atg gca aga tac tac ata att aaa tat gca 108
 Met Cys Ser Leu Pro Met Ala Arg Tyr Tyr Ile Ile Lys Tyr Ala
 1 5 10 15

gac cag aag gct cta tac aca aga gat ggc cag ctg ctg gtg gga gat 156
 Asp Gln Lys Ala Leu Tyr Thr Arg Asp Gly Gln Leu Leu Val Gly Asp
 20 25 30

cct gtt gca gac aac tgc tgt gca gag aag atc tgc ata ctt cct aac 204
 Pro Val Ala Asp Asn Cys Cys Ala Glu Lys Ile Cys Ile Leu Pro Asn
 35 40 45

aga ggc ttg gcc cgc acc aag gtc ccc att ttc ctg ggg atc cag gga 252
 Arg Gly Leu Ala Arg Thr Lys Val Pro Ile Phe Leu Gly Ile Gln Gly
 50 55 60

ggg agc cgc tgc ctg gca tgt gtg gag aca gaa gag ggg cct tcc cta 300
 Gly Ser Arg Cys Leu Ala Cys Val Glu Thr Glu Glu Gly Pro Ser Leu
 65 70 75

cag ctg gag gat gtg aac att gag gaa ctg tac aaa ggt ggt gaa gag 348
 Gln Leu Glu Asp Val Asn Ile Glu Glu Leu Tyr Lys Gly Gly Glu Glu
 80 85 90 95

gcc aca cgc ttc acc ttc ttc cag agc agc tca ggc tcc gcc ttc agg 396
 Ala Thr Arg Phe Thr Phe Phe Gln Ser Ser Ser Gly Ser Ala Phe Arg
 100 105 110

ctt gag gct gct gcc tgg cct ggc tgg ttc ctg tgt ggc ccg gca gag 444
 Leu Glu Ala Ala Ala Trp Pro Gly Trp Phe Leu Cys Gly Pro Ala Glu
 115 120 125

10

20

30

ccc cag cag cca gta cag ctc acc aag gag agt gag ccc tca gcc cgt 492
 Pro Gln Gln Pro Val Gln Leu Thr Lys Glu Ser Glu Pro Ser Ala Arg
 130 135 140

acc aag ttt tac ttt gaa cag agc tgg tag ggagacagga aactgcgttt 542
 Thr Lys Phe Tyr Phe Glu Gln Ser Trp
 145 150

tagccttggtg cccccaaacc aagctcatcc tgctcagggg ctatggtagg cagaataatg 602
 tccccgaaa tatgtccaca tccaatccc aagatctgtg catatgttac catacatgtc 662
 caaagagggt ttgcaaatgt gattatgtta aggatcttga aatgaggaga caatcctggg 722
 ttatccttgt gggctcagtt taatcacaag aaggaggcag gaaggagagag tcagagagag 782
 aatggaagat accatgcttc taattttgaa gatggagtga ggggccttga gccacaacaa 842
 gcagggtgtt ttagaagggt gaaaagccaa gggaacggat tctcctctag agtctccgga 902
 aggaacacag ctcttgacac atggatttca gctcagtgac acccatttca gacttctgac 962
 ctccacaact ataaaaataat aaacttgtgt tattgtaaac ctctaaaaaa aaaaaaaa 1020

<210> 4
 <211> 152
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Met Cys Ser Leu Pro Met Ala Arg Tyr Tyr Ile Ile Lys Tyr Ala Asp
 1 5 10 15

Gln Lys Ala Leu Tyr Thr Arg Asp Gly Gln Leu Leu Val Gly Asp Pro
 20 25 30

Val Ala Asp Asn Cys Cys Ala Glu Lys Ile Cys Ile Leu Pro Asn Arg
 35 40 45

Gly Leu Ala Arg Thr Lys Val Pro Ile Phe Leu Gly Ile Gln Gly Gly
 50 55 60

Ser Arg Cys Leu Ala Cys Val Glu Thr Glu Glu Gly Pro Ser Leu Gln
 65 70 75 80

Leu Glu Asp Val Asn Ile Glu Glu Leu Tyr Lys Gly Gly Glu Glu Ala
 85 90 95

Thr Arg Phe Thr Phe Phe Gln Ser Ser Ser Gly Ser Ala Phe Arg Leu
 100 105 110

Glu Ala Ala Ala Trp Pro Gly Trp Phe Leu Cys Gly Pro Ala Glu Pro
 115 120 125

Gln Gln Pro Val Gln Leu Thr Lys Glu Ser Glu Pro Ser Ala Arg Thr
 130 135 140

Lys Phe Tyr Phe Glu Gln Ser Trp
 145 150

10

20

30

<210> 5
 <211> 744
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (58)..(573)

<400> 5
 gctcccgccca ggagaaagga acattctgag gggagtctac accctgtgga gctcaag 57
 atg gtc ctg agt ggg gcg ctg tgc ttc cgt gag gac cag aca cca ctg 105
 Met Val Leu Ser Gly Ala Leu Cys Phe Arg Glu Asp Gln Thr Pro Leu
 1 5 10 15
 att gca gga atg tgt tcc ctc ccc atg gca aga tac tac ata att aaa 153
 Ile Ala Gly Met Cys Ser Leu Pro Met Ala Arg Tyr Tyr Ile Ile Lys
 20 25 30
 tat gca gac cag aag gct cta tac aca aga gat ggc cag ctg ctg gtg 201
 Tyr Ala Asp Gln Lys Ala Leu Tyr Thr Arg Asp Gly Gln Leu Leu Val
 35 40 45
 gga gat cct gtt gca gac aac tgc tgt gca gag aag atc tgc ata ctt 249
 Gly Asp Pro Val Ala Asp Asn Cys Cys Ala Glu Lys Ile Cys Ile Leu
 50 55 60
 cct aac aga ggc ttg gcc cgc acc aag gtc ccc att ttc ctg ggg atc 297
 Pro Asn Arg Gly Leu Ala Arg Thr Lys Val Pro Ile Phe Leu Gly Ile
 65 70 75 80
 cag gga ggg agc cgc tgc ctg gca tgt gtg gag aca gaa gag ggg cct 345
 Gln Gly Gly Ser Arg Cys Leu Ala Cys Val Glu Thr Glu Glu Gly Pro
 85 90 95
 tcc cta cag ctg gag gat gtg aac att gag gaa ctg tac aaa ggt ggt 393
 Ser Leu Gln Leu Glu Asp Val Asn Ile Glu Glu Leu Tyr Lys Gly Gly
 100 105 110
 gaa gag gcc aca cgc ttc acc ttc ttc cag agc agc tca ggc tcc gcc 441
 Glu Glu Ala Thr Arg Phe Thr Phe Phe Gln Ser Ser Ser Gly Ser Ala
 115 120 125
 ttc agg ctt gag gct gct gcc tgg cct ggc tgg ttc ctg tgt ggc ccg 489
 Phe Arg Leu Glu Ala Ala Ala Trp Pro Gly Trp Phe Leu Cys Gly Pro
 130 135 140
 gca gag ccc cag cag cca gta cag ctc acc aag gag agt gag ccc tca 537
 Ala Glu Pro Gln Gln Pro Val Gln Leu Thr Lys Glu Ser Glu Pro Ser
 145 150 155 160
 gcc cgt acc aag ttt tac ttt gaa cag agc tgg tag ggagacagga 583
 Ala Arg Thr Lys Phe Tyr Phe Glu Gln Ser Trp
 165 170
 aactgcgttt tagccttggtg cccccaacc aagctcatcc tgctcagggt ctatggtagg 643
 cagaataatg tccccgaaa tatgtccaca tccaatccc aagatctgtg catatgttac 703

10

20

30

catacatgtc caaagagggtt ttgcaaatgt gattatgtta a

744

<210> 6
 <211> 171
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

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

10

20

<210> 7
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 7
 Met Ala Glu Val Pro Lys Leu Ala Ser Glu Met Met Ala Tyr Tyr Ser
 1 5 10 15
 Gly Asn Glu Asp Asp Leu Phe Phe Glu Ala Asp Gly Pro Lys Gln Met
 20 25 30
 Lys Cys Ser Phe Gln Asp Leu Asp Leu Cys Pro Leu Asp Gly Gly Ile
 35 40 45
 Gln Leu Arg Ile Ser Asp His His Tyr Ser Lys Gly Phe Arg Gln Ala
 50 55 60

Ala Ser Val Val Val Ala Met Asp Lys Leu Arg Lys Met Leu Val Pro
65 70 75 80

Cys Pro Gln Thr Phe Gln Glu Asn Asp Leu Ser Thr Phe Phe Pro Phe
85 90 95

Ile Phe Glu Glu Glu Pro Ile Phe Phe Asp Thr Trp Asp Asn Glu Ala
100 105 110

Tyr Val His Asp Ala Pro Val Arg Ser Leu Asn Cys Thr Leu Arg Asp
115 120 125

Ser Gln Gln Lys Ser Leu Val Met Ser Gly Pro Tyr Glu Leu Lys Ala
130 135 140

Leu His Leu Gln Gly Gln Asp Met Glu Gln Gln Val Val Phe Ser Met
145 150 155 160

Ser Phe Val Gln Gly Glu Glu Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu
165 170 175

Gly Leu Lys Glu Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Asp
180 185 190

Lys Pro Thr Leu Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys
195 200 205

Lys Lys Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Ile Asn Asn
210 215 220

Lys Leu Glu Phe Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr
225 230 235 240

Ser Gln Ala Glu Asn Met Pro Val Phe Leu Gly Gly Thr Lys Gly Gly
245 250 255

Gln Asp Ile Thr Asp Phe Thr Met Gln Phe Val Ser Ser
260 265

<210> 8
<211> 153
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Ala Pro Val Arg Ser Leu Asn Cys Thr Leu Arg Asp Ser Gln Gln Lys
1 5 10 15

Ser Leu Val Met Ser Gly Pro Tyr Glu Leu Lys Ala Leu His Leu Gln
20 25 30

Gly Gln Asp Met Glu Gln Gln Val Val Phe Ser Met Ser Phe Val Gln
35 40 45

Gly Glu Glu Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu Gly Leu Lys Glu
50 55 60

Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Asp Lys Pro Thr Leu
65 70 75 80

10

20

30

Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys Lys Lys Met Glu
 85 90 95

Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Ile Asn Asn Lys Leu Glu Phe
 100 105 110

Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln Ala Glu
 115 120 125

Asn Met Pro Val Phe Leu Gly Gly Thr Lys Gly Gly Gln Asp Ile Thr
 130 135 140

Asp Phe Thr Met Gln Phe Val Ser Ser
 145 150

10

<210> 9
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 Met Glu Ile Cys Arg Gly Leu Arg Ser His Leu Ile Thr Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Phe Leu Phe His Ser Glu Thr Ile Cys Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser
 20 25 30

Ser Lys Ile Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe
 35 40 45

Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn
 50 55 60

Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala
 65 70 75 80

Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys
 85 90 95

Ser Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp
 100 105 110

Leu Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser
 115 120 125

Asp Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp
 130 135 140

Phe Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn
 145 150 155 160

Met Pro Asp Glu Gly Val Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp
 165 170 175

20

30

Glu

<210> 10
 <211> 155

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

```
Met Val Leu Ser Gly Ala Leu Cys Phe Arg Met Lys Asp Ser Ala Leu
  1           5           10           15

Lys Val Leu Tyr Leu His Asn Asn Gln Leu Leu Ala Gly Gly Leu His
          20           25           30

Ala Gly Lys Val Ile Lys Gly Glu Glu Ile Ser Val Val Pro Asn Arg
  35           40           45

Trp Leu Asp Ala Ser Leu Ser Pro Val Ile Leu Gly Val Gln Gly Gly
  50           55           60

Ser Gln Cys Leu Ser Cys Gly Val Gly Gln Glu Pro Thr Leu Thr Leu
  65           70           75           80

Glu Pro Val Asn Ile Met Glu Leu Tyr Leu Gly Ala Lys Glu Ser Lys
          85           90           95

Ser Phe Thr Phe Tyr Arg Arg Asp Met Gly Leu Thr Ser Ser Phe Glu
          100          105          110

Ser Ala Ala Tyr Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Val Pro Glu Ala Asp
          115          120          125

Gln Pro Val Arg Leu Thr Gln Leu Pro Glu Asn Gly Gly Trp Asn Ala
  130          135          140

Pro Ile Thr Asp Phe Tyr Phe Gln Gln Cys Asp
 145          150          155
```

10

20

<210> 11
<211> 178
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

```
Met Ser Phe Val Gly Glu Asn Ser Gly Val Lys Met Gly Ser Glu Asp
  1           5           10           15

Trp Glu Lys Asp Glu Pro Gln Cys Cys Leu Glu Asp Pro Ala Gly Ser
          20           25           30

Pro Leu Glu Pro Gly Pro Ser Leu Pro Thr Met Asn Phe Val His Thr
          35           40           45

Lys Ile Phe Phe Ala Leu Ala Ser Ser Leu Ser Ser Ala Ser Ala Glu
          50           55           60

Lys Gly Ser Pro Ile Leu Leu Gly Val Ser Lys Gly Glu Phe Cys Leu
          65           70           75           80

Tyr Cys Asp Lys Asp Lys Gly Gln Ser His Pro Ser Leu Gln Leu Lys
          85           90           95

Lys Glu Lys Leu Met Lys Leu Ala Ala Gln Lys Glu Ser Ala Arg Arg
          100          105          110
```

30

Pro Phe Ile Phe Tyr Arg Ala Gln Val Gly Ser Trp Asn Met Leu Glu
 115 120 125

Ser Ala Ala His Pro Gly Trp Phe Ile Cys Thr Ser Cys Asn Cys Asn
 130 135 140

Glu Pro Val Gly Val Thr Asp Lys Phe Glu Asn Arg Lys His Ile Glu
 145 150 155 160

Phe Ser Phe Gln Pro Val Cys Lys Ala Glu Met Ser Pro Ser Glu Val
 165 170 175

Ser Asp

10

<210> 12
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Met Ser Phe Val Gly Glu Asn Ser Gly Val Lys Met Gly Ser Glu Asp
 1 5 10 15

Trp Glu Lys Asp Glu Pro Gln Cys Cys Leu Glu Asp Pro Ala Gly Ser
 20 25 30

Pro Leu Glu Pro Gly Pro Ser Leu Pro Thr Met Asn Phe Val His Thr
 35 40 45

Ser Pro Lys Val Lys Asn Leu Asn Pro Lys Lys Phe Ser Ile His Asp
 50 55 60

Gln Asp His Lys Val Leu Val Leu Asp Ser Gly Asn Leu Ile Ala Val
 65 70 75 80

Pro Asp Lys Asn Tyr Ile Arg Pro Glu Ile Phe Phe Ala Leu Ala Ser
 85 90 95

Ser Leu Ser Ser Ala Ser Ala Glu Lys Gly Ser Pro Ile Leu Leu Gly
 100 105 110

Val Ser Lys Gly Glu Phe Cys Leu Tyr Cys Asp Lys Asp Lys Gly Gln
 115 120 125

Ser His Pro Ser Leu Gln Leu Lys Lys Glu Lys Leu Met Lys Leu Ala
 130 135 140

Ala Gln Lys Glu Ser Ala Arg Arg Pro Phe Ile Phe Tyr Arg Ala Gln
 145 150 155 160

Val Gly Ser Trp Asn Met Leu Glu Ser Ala Ala His Pro Gly Trp Phe
 165 170 175

Ile Cys Thr Ser Cys Asn Cys Asn Glu Pro Val Gly Val Thr Asp Lys
 180 185 190

Phe Glu Asn Arg Lys His Ile Glu Phe Ser Phe Gln Pro Val Cys Lys
 195 200 205

20

30

Ala Glu Met Ser Pro Ser Glu Val Ser Asp
 210 215

<210> 13
 <211> 192
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 Met Ser Gly Cys Asp Arg Arg Glu Thr Glu Thr Lys Gly Lys Asn Ser
 1 5 10 15

Phe Lys Lys Arg Leu Arg Gly Pro Lys Val Lys Asn Leu Asn Pro Lys
 20 25 30

Lys Phe Ser Ile His Asp Gln Asp His Lys Val Leu Val Leu Asp Ser
 35 40 45

Gly Asn Leu Ile Ala Val Pro Asp Lys Asn Tyr Ile Arg Pro Glu Ile
 50 55 60

Phe Phe Ala Leu Ala Ser Ser Leu Ser Ser Ala Ser Ala Glu Lys Gly
 65 70 75 80

Ser Pro Ile Leu Leu Gly Val Ser Lys Gly Glu Phe Cys Leu Tyr Cys
 85 90 95

Asp Lys Asp Lys Gly Gln Ser His Pro Ser Leu Gln Leu Lys Lys Glu
 100 105 110

Lys Leu Met Lys Leu Ala Ala Gln Lys Glu Ser Ala Arg Arg Pro Phe
 115 120 125

Ile Phe Tyr Arg Ala Gln Val Gly Ser Trp Asn Met Leu Glu Ser Ala
 130 135 140

Ala His Pro Gly Trp Phe Ile Cys Thr Ser Cys Asn Cys Asn Glu Pro
 145 150 155 160

Val Gly Val Thr Asp Lys Phe Glu Asn Arg Lys His Ile Glu Phe Ser
 165 170 175

Phe Gln Pro Val Cys Lys Ala Glu Met Ser Pro Ser Glu Val Ser Asp
 180 185 190

<210> 14
 <211> 169
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 Met Arg Gly Thr Pro Gly Asp Ala Asp Gly Gly Gly Arg Ala Val Tyr
 1 5 10 15

Gln Ser Met Cys Lys Pro Ile Thr Gly Thr Ile Asn Asp Leu Asn Gln

10

20

30

20 25 30
 Gln Val Trp Thr Leu Gln Gly Gln Asn Leu Val Ala Val Pro Arg Ser
 35 40 45
 Asp Ser Val Thr Pro Val Thr Val Ala Val Ile Thr Cys Lys Tyr Pro
 50 55 60
 Glu Ala Leu Glu Gln Gly Arg Gly Asp Pro Ile Tyr Leu Gly Ile Gln
 65 70 75 80
 Asn Pro Glu Met Cys Leu Tyr Cys Glu Lys Val Gly Glu Gln Pro Thr
 85 90 95
 Leu Gln Leu Lys Glu Gln Lys Ile Met Asp Leu Tyr Gly Gln Pro Glu
 100 105 110
 Pro Val Lys Pro Phe Leu Phe Tyr Arg Ala Lys Thr Gly Arg Thr Ser
 115 120 125
 Thr Leu Glu Ser Val Ala Phe Pro Asp Trp Phe Ile Ala Ser Ser Lys
 130 135 140
 Arg Asp Gln Pro Ile Ile Leu Thr Ser Glu Leu Gly Lys Ser Tyr Asn
 145 150 155 160
 Thr Ala Phe Glu Leu Asn Ile Asn Asp
 165

<210> 15
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 Met Arg Gly Thr Pro Gly Asp Ala Asp Gly Gly Gly Arg Ala Val Tyr
 1 5 10 15
 Gln Ser Ser Glu Ser Asn Ala Val Gly Met Gly Leu Trp Arg Leu Arg
 20 25 30
 Pro Ser Ala Leu Thr Leu Ser Pro Val Glu Ala Pro Ala Phe Ser Ala
 35 40 45
 Pro Leu Cys Thr Leu Pro Phe Pro Pro Val Cys Lys Pro Ile Thr Gly
 50 55 60
 Thr Ile Asn Asp Leu Asn Gln Gln Val Trp Thr Leu Gln Gly Gln Asn
 65 70 75 80
 Leu Val Ala Val Pro Arg Ser Asp Ser Val Thr Pro Val Thr Val Ala
 85 90 95
 Val Ile Thr Cys Lys Tyr Pro Glu Ala Leu Glu Gln Gly Arg Gly Asp
 100 105 110
 Pro Ile Tyr Leu Gly Ile Gln Asn Pro Glu Met Cys Leu Tyr Cys Glu
 115 120 125
 Lys Val Gly Glu Gln Pro Thr Leu Gln Leu Lys Glu Gln Lys Ile Met

10

20

30

130	135	140
Asp Leu Tyr Gly Gln Pro Glu Pro Val Lys Pro Phe Leu Phe Tyr Arg		
145	150	155
Ala Lys Thr Gly Arg Thr Ser Thr Leu Glu Ser Val Ala Phe Pro Asp		
	165	170
Trp Phe Ile Ala Ser Ser Lys Arg Asp Gln Pro Ile Ile Leu Thr Ser		
	180	185
Glu Leu Gly Lys Ser Tyr Asn Thr Ala Phe Glu Leu Asn Ile Asn Asp		
	195	200
		205

10

<210> 16
 <211> 158
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
Met Glu Lys Ala Leu Lys Ile Asp Thr Pro Gln Gln Gly Ser Ile Gln
1 5 10 15
Asp Ile Asn His Arg Val Trp Val Leu Gln Asp Gln Thr Leu Ile Ala
20 25 30
Val Pro Arg Lys Asp Arg Met Ser Pro Val Thr Ile Ala Leu Ile Ser
35 40 45
Cys Arg His Val Glu Thr Leu Glu Lys Asp Arg Gly Asn Pro Ile Tyr
50 55 60
Leu Gly Leu Asn Gly Leu Asn Leu Cys Leu Met Cys Ala Lys Val Gly
65 70 75 80
Asp Gln Pro Thr Leu Gln Leu Lys Glu Lys Asp Ile Met Asp Leu Tyr
85 90 95
Asn Gln Pro Glu Pro Val Lys Ser Phe Leu Phe Tyr His Ser Gln Ser
100 105 110
Gly Arg Asn Ser Thr Phe Glu Ser Val Ala Phe Pro Gly Trp Phe Ile
115 120 125
Ala Val Ser Ser Glu Gly Gly Cys Pro Leu Ile Leu Thr Gln Glu Leu
130 135 140
Gly Lys Ala Asn Thr Thr Asp Phe Gly Leu Thr Met Leu Phe
145 150 155

20

30

<210> 17
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17

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

10

<210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 1

20

<400> 18
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10

<210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: internalizing
 domain derived from HIV tat protein

30

<400> 19
 Gly Gly Gly Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10 15

<210> 20
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide 2349-98

<400> 20
cacacgcttc accttctttc cag 23

<210> 21
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide 2349-99

10

<400> 21
taaaacttgg tacgggctga ggg 23

<210> 22
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide 1572-36

<400> 22
gtgtggaatt gtgagcggat aac 23

20

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

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide 2328-91

<400> 23
ctatgaccat gattacgcc aac 23

<210> 24
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

30

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide 2351-47

<400> 24
gctgtactgg ctgctggggc 20

<210> 25
<211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide 2351-48

<400> 25
 ccttcaggct tgaggctgct g 21

<210> 26
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 10

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide 2329-93

<400> 26
 cgggcctctt cgctattacg c 21

<210> 27
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: 20
 Oligonucleotide 2363-04

<400> 27
 cctggctggt tcctgtgtgg c 21

<210> 28
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide 2329-94

<400> 28 30
 tggcgaaagg gggatgtgct g 21

<210> 29
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide AP-1

<400> 29
 ccatacctaatac gactcact atagggc 27

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

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide 2353-87

<400> 30
ccttggtgag ctgtactggc tg 22

<210> 31
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide 2349-52

<400> 31
ccgggccaca caggaacca 19

<210> 32
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide 2349-51

<400> 32
aagaggccac acgcttcacc ttct 24

<210> 33
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide 2557-95

<400> 33
aagccttttt cttctttggc tcagtg 26

<210> 34
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:

10

20

30

Oligonucleotide 2557-96

<400> 34
tgccatttaa tgtaacacgg tcacag

26

<210> 35
<211> 459
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(459)

<400> 35
atg tgc tcc ctt ccc atg gca aga tac tac ata atc aag gat gca cat 48
Met Cys Ser Leu Pro Met Ala Arg Tyr Tyr Ile Ile Lys Asp Ala His
1 5 10 15
caa aag gct ttg tac aca cgg aat ggc cag ctc ctg ctg gga gac cct 96
Gln Lys Ala Leu Tyr Thr Arg Asn Gly Gln Leu Leu Leu Gly Asp Pro
20 25 30
gat tca gac aat tat agt cca gag aag gtc tgt atc ctt cct aac cga 144
Asp Ser Asp Asn Tyr Ser Pro Glu Lys Val Cys Ile Leu Pro Asn Arg
35 40 45
ggc cta gac cgc tcc aag gtc ccc atc ttc ctg ggg atg cag gga gga 192
Gly Leu Asp Arg Ser Lys Val Phe Leu Gly Met Gln Gly Gly
50 55 60
agt tgc tgc ctg gcg tgt gta aag aca aga gag gga cct ctc ctg cag 240
Ser Cys Cys Leu Ala Val Lys Thr Arg Glu Gly Pro Leu Leu Gln
65 70 75 80
ctg gag gat gtg aac atc gag gac cta tac aag gga ggt gaa caa acc 288
Leu Glu Asp Val Asn Ile Glu Asp Leu Tyr Lys Gly Gly Glu Gln Thr
85 90 95
acc cgt ttc acc ttt ttc cag aga agc ttg gga tct gcc ttc agg ctt 336
Thr Arg Phe Thr Phe Phe Gln Arg Ser Leu Gly Ser Ala Phe Arg Leu
100 105 110
gag gct gct gcc tgc cct ggc tgg ttt ctc tgt ggc cca gct gag ccc 384
Glu Ala Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Gly Pro Ala Glu Pro
115 120 125
cag cag cca gtg cag ctc acc aaa gag agt gaa ccc tcc acc cat act 432
Gln Gln Pro Val Gln Leu Thr Lys Glu Ser Glu Pro Ser Thr His Thr
130 135 140
gaa ttc tac ttt gag atg agt cgg taa 459
Glu Phe Tyr Phe Glu Met Ser Arg
145 150

10

20

30

<210> 36
<211> 152
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 36
 Met Cys Ser Leu Pro Met Ala Arg Tyr Tyr Ile Ile Lys Asp Ala His
 1 5 10 15
 Gln Lys Ala Leu Tyr Thr Arg Asn Gly Gln Leu Leu Leu Gly Asp Pro
 20 25 30
 Asp Ser Asp Asn Tyr Ser Pro Glu Lys Val Cys Ile Leu Pro Asn Arg
 35 40 45
 Gly Leu Asp Arg Ser Lys Val Pro Ile Phe Leu Gly Met Gln Gly Gly
 50 55 60
 Ser Cys Cys Leu Ala Cys Val Lys Thr Arg Glu Gly Pro Leu Leu Gln
 65 70 75 80
 Leu Glu Asp Val Asn Ile Glu Asp Leu Tyr Lys Gly Gly Glu Gln Thr
 85 90 95
 Thr Arg Phe Thr Phe Phe Gln Arg Ser Leu Gly Ser Ala Phe Arg Leu
 100 105 110
 Glu Ala Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Gly Pro Ala Glu Pro
 115 120 125
 Gln Gln Pro Val Gln Leu Thr Lys Glu Ser Glu Pro Ser Thr His Thr
 130 135 140
 Glu Phe Tyr Phe Glu Met Ser Arg
 145 150

10

20

<210> 37
 <211> 13017
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> exon
 <222> (8025)..(8054)

<220>
 <221> exon
 <222> (9548)..(9631)

<220>
 <221> exon
 <222> (9967)..(10092)

30

<220>
 <221> exon
 <222> (10358)..(10570)

<400> 37
 actagtctcc catagacaac agctgaatgt acgaggtcag aagcaaggcc tgccccagaa 60
 ccattgcaag ccagggtgctg tcttgattgt agcctcataa aaaactgatg cagaattgcc 120
 ccaccaacat gctccagatt cctgctccac agaaaccctg tgaactaacc atgttgcttt 180

tagattctgc agtaagttga taatctgcag taaataacat tcgatgaaag agaaacatgt 240
gtagttactt tattatgac aaaactttat ttctccactc ttcccathtt ccttctcaga 300
attgacacca gcctttcact aacccaaata gcctatttaa atgctgatca tacttctctt 360
gttaactgtt acctgttccc aaaaggtaca attccctttc gaccatagct gcctctccca 420
cctgcacacc aggatgtttc tcatatttct acctaaaaca ttggggacta caagtgaaag 480
caaaagaggg ggtccatata agaaccacag gtatttagct gtaaaactca cttgtcaggg 540
cagcttgaca ggtttacagt ttgtagaagg accagaaaga aggtagccaa gacagaagag 600
gcaacctctg cttgtcctag aaccttcagt ccatatacat ctaagctccc cagcaccatt 660
tctaccacag acctctcaga gttctgagg atgcagaccc caggacactg acctcagttt 720
ccaggcaggg tttctgcaca ccccttccac actgcctgac tgggagttag tctcatggtg 780
caacactact ttgggacact gtacccatcc cctcgaccta cagaaaccat tcacttttca 840
aggtcacctc ctataggaag tatttgaaaa gatgagagtc atggtcattt gctatgataa 900
tattctgtgc ttatctccct gtaaaaagtt ggcttggggc ctctggcatg catctgacct 960
taaggttgga gctgcaccaa tatgttttta agcaccgggc ataagtcttc gcaaaatttc 1020
agaacatggt ttgtacagaa tgtactttcc tccactcata caaaccttg taaaagagta 1080
gtttgaatcc caactcattc ttgaaggcca cctttttagt ggtgacagaa tttaaaaata 1140
cagaatttaa aaatacttta tcccaggga gctcacactt ctaaatccag aatgaaagaa 1200
gaaatagaaa cacacttgtg gtggcggtgg tgggtggtgat ggtggtcgtg gtggtggtgg 1260
tgggtggtgt ggtgatggtg gtggtggtgg tgggtggtgt ggtcgtggtg gtgtaatgat 1320
cacagtaaa tgaggcatca tggcctgaga gagtcaggca tcacagctat tcaagtgaag 1380
actacctact actgatttta gagttctata attttagtag cagccacagg cctggggcct 1440
gggcctatat tttcagagag gaaatgttca cagcaggta actgcagaca gtgaagatca 1500
gaaatgtttc ataatacagg catcagagaa aaggcaaaag agctgatgga ctttatcctg 1560
aaaaagcaaa atccaacca cctcatgctt aatgcattca aaggtctgcg ggcagaagaa 1620
tacattttgc tttttattat tataaattac ctggagaata tttttgtctg aattatctcc 1680
caaataattaa ccataaaaat aaaaaattcc atgtgtgctt ctcccagggg ctataaagcc 1740
cctggtctta gagttgttgg ggcaaaacct gacctttgaa gtagttactt ttgaagatgc 1800
cataccatac atttgccac ttggagagag tctaatgtca catctaaagg gttactctga 1860
tgctctgttt tctcatatgc ccttggttta cagctaacta tggctccagc taaactataa 1920
agttccttgg caacagagat ggtacgctat gtgtcttga cacagcagaa taaatgctta 1980
gtgaacatta ctgattgcct gacaggacac ctacacttt ggtactttca acagagggat 2040

10

20

30

gtaaacttat gaagaacaat gaagaatgaa tattggcaat aaaagcaaaa attggttaac 2100
ccaattctag ctctgaaatc attttttaggt agtgggaagt ctttttggtt tgtttattca 2160
ctttacatcc caattgctgt cctccctcca agttccccac caccaccaca gtcctttttc 2220
cctccccctt cctctgaga gaatggagaa cctcctgga tattccccca tcatgaaaca 2280
ttaagtctct gcagggctag acacttcccc cagtgaggcc agtcagggca gccagctag 2340
aaaaagcata tcccacagac agacaacagc ttttgggata gccccgttcc agttgttttag 2400
gatccacatg aaggctgagc tgcacatctg ctacatatga atgaggaggc ctagggtccag 2460
cctgtgtatg ttcttttggtt ggtggttcag actctgagag ccccaagggt ccaggtcagt 2520
tgactctggt ggtcttctctg tggacacctt gtccccctcc agcccacaat ccttccccta 2580
atccttctcc ttctcacttc cataagagtg tgaggagtct ttaaaaacat gaagcatttt 2640
atctccccag ggcaacacat ggaaatgaaa gattgtgaaa agtaatttaa agaaaaagaa 2700
aaaaaaattt aacaaggaat aagaatcttg tttctctgaa aatgcttaag agtgtggaaa 2760
acataaactg gattctaata gaatgcaatt ggattgtaat gaaaacctat caaagttatg 2820
aaatagcttt cactaccttg cacaaaatct cttggcatgt gtgtgtgttg caaattttct 2880
tgttagttta aaaccacaac aataacaaca aaatagcaaa aattgggtct cagcctcatt 2940
cattttttct catttcttgc tctgtgatcg tctgggtctt aagctgacac ctcaccaatt 3000
cctcatcaag acctttgttg aaatttgcaa atgtcccaa aaggagaatt acaataagtc 3060
agagaacgtt ctgtccaatt ctttatccct agtgatggat gagtaaagga tgtataagag 3120
atggataaat ggactgatgt acagataaat gaaggaatat gtacatggtt aggtggatag 3180
atgacttact caacagatga gtagaaggat gagaaataga tggacagctg gactgaggca 3240
tgcaaagtca actggagaac tgagtctctt gaccatgcac tgtccagggt ctcatattcc 3300
ctagagtcca gggcccatgg ctctgtgcc atcccatgc aaatctaagg ttaatacgtt 3360
ctacagctga gtttccttac atatgtgtct cagtaagttt gtatcaacta attaaatctg 3420
aaaggagttc cttctgatct tcccaaacag agccacactc gtgatgaagt cagccctgct 3480
tcatttgtgt tctctggatg catctggctt ccatacagat aatctttcta ttcttgatcc 3540
ttccaacctc ttcaggcttc agacagaacc ccatggagca tcaaagaggt ttgaccccag 3600
cattgtttat gtagctgcaa aaccactaat aacacagtca atgacagtag ctacagagac 3660
agcaggctcag tgtctggcct ctgtcaaggc tttatgagtg actctctccc cttcccgcaa 3720
atactcatta atctccccac ctcttatta tttggactgt gttgaagata ttatgaaatc 3780
tctgggctct tcttcccga tctagagcca attacagatt ctgtaggttt gaccaccct 3840

10

20

30

gaccagacat tataaacaca gtgctggtgc cctgaagaaa acagttggag actccaggca 3900
ttagaatcca ggcaccagga actacaggtc agtggtgaca gtcggtctct ctgtgtatct 3960
cttacacaca cacacataca cacacacaac acaacataca cacacataca acacacaaca 4020
catcacata caacacatac acacacacaa cacttttctg taatgtctcc aaaattctca 4080
ggctctaggg aagaagaaat gtctttttaga gaatgcggtg tgatgttcta taagtctagg 4140
aatacttgat agaatttaat gagaagtata gattagggtca aagcaagggt actacatatt 4200
tggaaccaca gagttttgaa agtcattctca aaagaaatta tttaggccag agatgttcaa 4260
aaaatgtttt gtttgtgaca tatggaagct cccatggaga cattctgtga ttctcatcaa 4320
tagacagtag ggatgccacc aagggtgctaa cgtcttcac accccatcat ctatcataca 4380
tccaaatggt ttctttgaaa acaatctcct tgtgaaactt aaagtagcct tgaaaatata 4440
ataatcttgt ccagcctctc atttcaatgg gaatagattg aaggcctaag gaccaaaca 4500
aaaaacaaaa caaacaaaat aaaaacacca aaaaaaaac ccataaaatg aatgagtagc 4560
taagttattt ttagaatcca gcctttcagt caaagcttga ttcatgcata tctgtgttct 4620
gatcttaagg tgctgtgtct gtcagttgta tagttggata gaggtacaga tgagctatat 4680
acatcatgct tcaagatttc aggatcttat aacttttata aagcaaataa tttgtcttaa 4740
tgcacactaa taaacaatat agcaaagttt gacaggagtt cagagtactg ttagagaagt 4800
gaagggaaga attttgttat gatagtaaag gggaaaatca aattttgagt catggaatca 4860
tacatagttt gacatagaaa gaaccttggc aaccacataa tctaatgcat gagcccaaga 4920
actggcctgt gtttttaaga tctcattctc agctgttatg taactgaaca gacaagatac 4980
taagcccaag tatagtgaag ccatgtccag tgatcttaat aggagtgaaca ggaatggttg 5040
gtgatgaaga ggggtggatt ttgagcagga ataccaaaag caatgctgac tgtgcccttg 5100
gagagaatta gcatgagtc ttgagagaaa aatgagatgc tattgcacaa gcaacctagg 5160
gccagatggt gtcaagatag gtggccatcg tggactttag aaccaggcag gaatgtgatc 5220
agagatgtac tttatgtagg ttaggtttga ttcagaaacc aggagggtta gcatgtttac 5280
aatggtgact aaaaacaagc acaaggttat actttaaga aataatctct gaaaagaagg 5340
gaggtatatt ttcagtgccg gaaagaggaa tattacaaaa gtgagaggag tagatttgag 5400
aaagagaagt ggattgtgga ggagcagatg ctcaccacgc cttacactc acttgaactg 5460
acacccaaag atgaaggtgt gctgtggact gctgaagctc agcctgtggc tgggaagcag 5520
taaacaaaat tgctcatcac agctgtacaa gatattccat agcatataaa aataaaagtg 5580
cttaggctat tctcttaca ctctcagcct tatgaatgac ccggaaggaa aagaactcta 5640
caatgtgcct gtgtctgttc ttacttctc tgccacaagc aaaagagcct tgggaattgg 5700

10

20

30

ctacagagga acgtcatcaa acaggctggc cttgaggctg ggctgttatt cgtctacctg 5760
 ggatagagga attcgtctatt cttttataat ccaagtgtgg cctggggacc agcagcatta 5820
 ttaagacctg gttgcatgtt tgaaatgcag tctcagattt catcccagac ctaaagagta 5880
 aactgtttt catgaggata caagattaag aaatatgcat tagagagtaa ttggctaaat 5940
 gggtaaatgt catgcaagca ggaggatctg attgactccc caggaccac acagttccca 6000
 tgccgtagag cacatctgta atcacagtag gcgtatgatg aaatgggagg tgaatcaaga 6060
 gaatctctag cagctacggg ctggccagcc tcccatgcac agcactaaat aaggcaagga 6120
 ccaataacctg aagttgtccc attaccttca catatacacc acggcatgtg tgtacttgta 6180
 ctcacacata caaacaata cacacgtgca cacatacaa actcagagat taaggacaat 6240
 tggcctgaca tatcagttcc taagcctggc tcattgcttg taacactaca agcagtatta 6300
 aataaggata ggcgagagaa cagttacoga atgggttcaga agtggggcca tgcctgtgac 6360
 ttttaacaaa tgtttcatat ttttaataa taacacttag attacaaaat aaatttacta 6420
 caggaaaatg ttaagaacta tcaacaacca ttgactatcc tgtcggccac aaatgagtgt 6480
 tataacaagc accagccgtc cttgtccaca tgtgtgtgtg tctacacagc tatgaattta 6540
 attgggataa taatgtgcac attctttacg gcctgcagtt tttacttcat gtatttgaat 6600
 tgtttgtgcc acaaatgtca tctttaagga gcatactctt atttctctga tttatcattc 6660
 cctttcagcc gactggacat tgacagcatt tocaactttt caaccttgta aaaataacta 6720
 attgaactat tttataacta agcatttggg caatcaatta cctctgctg gaatgggggc 6780
 aacaacacat gcaatcatgg gaaagccagg atgctgctgt ctgatcccta gccctggcat 6840
 tcgtgcagaa cctcactctc atctgtgccc tgatatctt cactctcaag tcttttccca 6900
 gtgactttta aaggcaacag aatcatatag ccaataatga aagctacttg gtctacagtt 6960
 gtgtggcgtt ttttatagat attttcttca tttacatttc aaatgctatc ccaaaagtcc 7020
 cctataacct cccccacct gctccccac ccaactcctc ccacttcttg gccctggctt 7080
 tcccccttac tggggcatat aaagtttgct agaccaaggg gcctctcttc ccaatgatgg 7140
 ccaactaggc cattttctgc tacatatgca gctagagaca ccagttctgg ggttactggt 7200
 tagttcatat tgttgttcta cctatggggt tgcagacccc ttcagctctt gactacttct 7260
 tctagctcct ccattgggag ccctgtgttc catcctatag atgactgtga gcacccactt 7320
 ctgtatttgc caggcactgg catatgaaat agtatctgca tttgggtggc gattatggga 7380
 tggacccccg ggtggggcag tctctggatg gtccatcctt tcatcttagc tccaaacttt 7440
 gtctctgcaa cttcttccat ggatatttta gtccctaact tagggagaaa tgaagtatcc 7500

10

20

30

acaagttgat cttccttctt gattttctta tgttttagaa gttgtatctt ggatattcta 7560
ggtttctggg ctaatatcca cttatcagtg agtacatata aagtgaattc ttttgtgatt 7620
aggttacctc actcaagatg atattctcca ctatgttcat agcagcccta tttatagtag 7680
ccagaagctg gaaagaacct agtccctcaa cagaggaatg gatacagaaa atgtggcaca 7740
tttatgcaat ggagtaccac tcagatatta aaaacaacga atttatgaaa ttctcgggca 7800
aaacctatc taaagaccag gaataaggaa aagatggact gcctgcctgc agctgggaga 7860
gctggggaga cttttgtgga ttctgtaata cttaggggta cggaacagct tgtggctgga 7920
taattctgag ctccagcatg tctgcccccc aaaaaacatt ctgtttttct gaaagccttt 7980
ttcttctttt cctcagtgaa gaccagacac tcccaactgc agga atg tgc tcc ctt 8036
ccc atg gca aga tac tac atgtaagtaa tottaacgat cgctcaatca 8084
aggggccttg agatcacatg agaagggaaa aggctgagtc aaagggacaa agctccctct 8144
agccacagaa atctcaaaca ctgaataatt gatcttcatc tttgtcaatc acaacagccc 8204
tctttccttg tgacagaatg gaacaactgt aagagtggta ttgcttagtc cattttacag 8264
acccggaac tcaacctcca cgaggttata caattttcct catgtcatgc aattacccaa 8324
aagcagagag tgggatcgga ctctctgttc tctaaactga ttagctagt tcttagaaag 8384
ctcaaaacaat cttgagtcac aaggacagca cttttatggc cacctggatt gatactata 8444
tcaaaaaaaaa aaaaaggctc cactagatag ccctggctac cctgaaactc tcaactgtgta 8504
catttaggtg accacgaact cacagagatc tgccttccaa gtgctgggat taaagtatgt 8564
accaccacac ctgcatcttt gacaataact gagtggatc taaattcttc cagtggctaa 8624
acagttaagt ccagttccc aaagtctgag aaaaatgccg ggtggtgaaa tctgtacaga 8684
cctttgttct taatgtacaa gtgagcctgc tttaaaaaca atacgcaagc tgtttttgct 8744
attgctaagt gttgcagaga cagaaaaggc tcccagaagt ggtaactttg gtccagaggt 8804
tctgttctca aactcattgt gagctctgaa agcaactgat gggcagctct gaaatcagct 8864
gggcaattag gctaataaca ggcataatct taatgtttca cacgcatgac agttcctccc 8924
cagctgccct agtacatact taccctccta ggcacgtcat tagaccata ggtataacca 8984
gtgactaatc aggccttggc ctaattctaa gttggcctcc tatataagtg ccactcagag 9044
tgtacctcat catggctgta gtgggcccag agtctagggc catagacttt totattgtcc 9104
aatttctgat ttgtgaattt tctacaaaaa gaattttttt taattttaca aatcaaatca 9164
cagttactac atcttcagtt ccttcattaa ttagtggtac tatttaaaaa aataaaataa 9224
atcaagctca gaaacatcat ggataggggt cattgtatct ccagggtacc tgagcttcaa 9284
agcaactcct cagacagcca tgaaaacatc ctcaattacc tcatgagaag acactattgt 9344

10

20

30

catttctgga gcctctgata atcctgagcc taggcagctt tgggatgaaa caatttctac 9404
 ccttattgga acagtgtccc tctcctgtct ggaaacaatt caccaaaggc tccatgtggt 9464
 tgtccagtaa ggtggtatgg ggacagaaat ggacaatgat cctgagggc agtgatccat 9524
 taaccttgcc ctctatttc aga atc aag gat gca cat caa aag gct ttg tac 9577
 aca cgg aat ggc cag ctg ctg gga gac cct gat tca gac aat tat 9625
 agt cca ggtgatcttc cgggtggggg ggtgggggag tggaggggag ggtgtggggg 9681
 gggctctctt ccagaagttg cttagtgtcc atctgccaca aggccttgat tctttccttc 9741
 aattgtgtct ctgagacat gagaatattg tcacagtgat aaggagaaga ggtaggggca 9801
 gttttctctt gtaaaaaatg aattccattt accctgcagt ctccatacag aaacaggcca 9861
 gaggggggca gaccagtaa cttctagctg agccctacct tgcttaaaac ctgccatctg 9921
 tggccccctc actgtctgaa ttgcattctg tcttacctcc cagag aag gtc tgt atc 9978
 ctt cct aac cga ggc cta gac cgc tcc aag gtc ccc atc ttc ctg ggg 10026
 atg cag gga gga agt tgc tgc ctg gcg tgt gta aag aca aga gag gga 10074
 cct ctg ctg cag ctg gag gtgagacacc cctcctcatt gcagtcagta 10122
 ctgccactgg aacatagtga catctttgaa cccacatgtc cctctcttg tttcccatct 10182
 atctctcttt gcctccagct gagggactct agcctttggg gatgtacaga aagaacatgg 10242
 ctccggaaaa ctcttccta ttgagtccct ctttgccaa gcctctgagg cactaagggc 10302
 tgacgtccca accaaacact catttcatct cacagctgtc tccctttccc cacag gat 10360
 gtg aac atc gag gac cta tac aag gga ggt gaa caa acc acc cgt ttc 10408
 acc ttt ttc cag aga agc ttg gga tct gcc ttc agg ctt gag gct gct 10456
 gcc tgc cct ggc tgg ttt ctg tgt ggc cca gct gag ccc cag cag cca 10504
 gtg cag ctg acc aaa gag agt gaa ccc tcc acc cat act gaa ttc tac 10552
 ttt gag atg agt cgg taa agagacataa ggctggggcc tcgtctagt 10600
 cccccagtct gagatcttct tgctcagcat ctctggaaag cagaataagg aagataccaa 10660
 agatgttttg gtcttaatcc ccagaatctg tgaccgtgtt acattaaatg gcaaagggat 10720
 ttttttttct ctcatggtc catttgggccc cattggaatc atctgaggcc tcatgaggag 10780
 aaggaagagg tcagagggag actggggcaa actttgggtac taaaagtaac aatggagaca 10840
 gggaccataa gctgatgggt aacagtgggt tctagaaacc ggaaatgatg agagctctcc 10900
 tgacacaggt tctggatttt tctggactga agaattgtga aataatacag ctccattatt 10960
 ttaagccact gagtttgaga tcattcaatg aagctgtcat aataaacct gtgcttcaca 11020

10

20

30

tacaattcaa tattggtagg caccocgggtg atttcttgga aagacatcta gggattctcc 11080
 tggatgctga ttccagggtc cagtggagtc cctgggttga agagatttca caaccagaa 11140
 catcagggtc gactcttcta aaagtccgtc gttgcacccc ttgcctgaga gcattagcaa 11200
 tttctatttc ataggaaatc tgtgtccctg cccttgctaa agcaggaggc ctggaccgtc 11260
 ctgatttagt gaggggtgag ctgctggcac ttttttgtgt caccagtgtc ttaagcagt 11320
 atggagcaca aaagatcttt actgagaaga tggccatgaa gctctggcta gacaccaaga 11380
 atatgatata agcagagcta cagcacaaga tgagccaatg aggaaagcca ttcaggagg 11440
 ctaagcccag cttcccaaag ggacagctaa ccctggactc aatgaatag gggttttcct 11500
 ggagagaaac atagggtcaag cattctaggt agaatcagca attcagaaag gtgtgagaga 11560
 ggcatggaga gctccaggca tgtctgggtc atgggtgtgtc attcttggg caagaatcca 11620
 acgtctgtgg ttaaggagtt gctgaaaatt aaaataggaa aatgggtaga gtctaattgt 11680
 gaatgacttg caaaggagtt tagcccataa gtggggagct cagaggagtc atctaaggat 11740
 tgcaagcagg ggccctgtga tcattgctgg accagcctag gtgctacaga gcctaccttc 11800
 agctctgcat cctcactcac atccaggtag ctccagaggt caatttctgt gctctgggtc 11860
 tatgggttagc ctgaccctgt ttcattctct tgtataactt aggcacataa gcttagggac 11920
 tggtagagtt tacttgagtg attggtgaat caggcagcac caaactacaa gttgttcagg 11980
 gctttaccaaa gggggcactg attggagaat tggaatgagg gtggttagaa tgcattcaga 12040
 aaacaagggg aagaaaaatt tgattgctta aagtggaaag tcccaactta aatgttagtc 12100
 agtagtttct aattacttga gtctctaatt agaggtagt tggcagtttc tggtagtta 12160
 atctaagttt cattttctta ggctatgacc attctctgag tcgcatgtta gcaatgcagt 12220
 aagaactcaa gaccagaat agcctctgtt aattatttta gcaatgatca ctcatctctg 12280
 ttgcctccta ttgagatctg ttcccatgga ccaccaggc acatcaggcc tcctagtacc 12340
 aacataataa tgattgctgc acagacaaaa tatttttttt cagtatctgg tatttgctac 12400
 atttccatta gtgctggagg gaaggctaca acgaccatga aggcattggc cctgccttct 12460
 aaggacttac aatgtaatag gagccctgac attataaagt gggtcacctt gtttcaaact 12520
 gagccaaact gaggtgagg gcttagatta gtggtaggtc actttccaga catgttcagt 12580
 gctaagaaaa acacattctg gggtagtta gatgttttag ttcatttgat aagaagcca 12640
 atgattggac tttcaacttc tggaacccat gtggtggaag agagaacca cttctgacca 12700
 ttgggtcat ggcacatccc ctaccatcac aagaactcac caaaataaat tagaaaaatc 12760
 aagaaaaact catatcctat agacctctgg tagaattagc agaacgctgc tgtggcactt 12820
 gggatttgaa actcaaaaat ggaagaagct acttgtagc gttcaagact ccaggaggc 12880
 tctctgaca catccacga ctgaggctta aattccttct tctccctaga aggcacgccc 12940
 atcttctcaa ccaggccaca gatgtataa ttatgtaa atgtgtggaga ggcacacttt 13000
 agatcttatc cactagt 13017

10

20

30

40

【図 1 A】

FIG. 1A

```

cagggatcag ggttccagga actcaggatc tgcaagttag accagacacc actgattgca 60
gga atg tgt tcc ctc ccc atg gca aga tac tac ata att aaa tat gca 108
Met Cys Ser Leu Pro Met Ala Arg Tyr Tyr Ile Ile Lys Tyr Ala
1 5 10 15
gac cag aag gct cta tac aca aga gat ggc cag ctg ctg gta gga gat 156
Asp Gln Lys Ala Leu Tyr Thr Arg Asp Gly Gln Leu Leu Val Gly Asp
20 25 30
cct gtt gca gac aac tgc tgt gca gag aag atc tgc aca ctt cct aac 204
Pro Val Ala Asp Asn Cys Cys Ala Glu Lys Ile Cys Thr Leu Pro Asn
35 40 45
aga ggc ttg gac cgc acc aag gtc ccc att ttc ctg ggc atc cag gga 252
Arg Gly Leu Ala Arg Thr Lys Val Pro Ile Phe Leu Gly Ile Gln Gly
50 55 60
ggg agc cgc tgc ctg gca tgt gta gag aca gaa gag ggg cct tcc cta 300
Gly Ser Arg Cys Leu Ala Cys Val Glu Thr Glu Glu Gly Pro Ser Leu
65 70 75
cag ctg gag gat gta aac att gag gaa ctg tac aaa ggt ggt gaa gag 348
Gln Leu Glu Asp Val Asn Ile Glu Glu Leu Tyr Lys Gly Gly Glu Glu
80 85 90 95
gcc aca cgc ttc acc ttc ttc cag agc agc tca ggc tcc gcc ttc agg 396
Ala Thr Arg Phe Thr Phe Phe Gln Ser Ser Gly Ser Ala Phe Arg
100 105 110
ctt gag gct gct gcc tgg cct ggc tgg ttc ctg tgt ggc ccg gca gag 444
Leu Glu Ala Ala Trp Pro Gly Trp Phe Leu Cys Gly Pro Ala Glu
115 120 125
ccc cag cag cca gta cag ctc acc aag gag agt gag ccc tca gcc cgt 492
Pro Gln Gln Pro Val Gln Leu Thr Lys Glu Ser Glu Pro Ser Ala Arg
130 135 140
acc aag ttt tac ttt gaa cag agc tgg tag ggagacagga aactgcgttt 542
Thr Lys Phe Tyr Phe Glu Gln Ser Trp
145 150
tagccttggt cccccaacc aagctcatcc tgctcagggt ctatgtagg cagaataatg 602
tccccgaaa tatgtccaca tccataatccc aagatctgtg catatgttac catacatgtc 662
caagagggtt ttgcaaatgt gattatgtta aggatcttga aatgaggaga caatcctggg 722
ttatccttgt gggctcagtt taatcacaa aagaggcgag gaaggagagag tcagagagag 782
aatggaagat accatgcttc taattttgaa gatggagtga ggggcttga gccacaatat 842
gcaggtgttt ttagaagggt gaaaagccaa gggaacggat tctctctag agtctccgga 902

```

【図 1 B】

FIG. 1B

```

aggaacacag cttctgacac atggatttca gctcagtgac accattttca gacttttgac 962
ctccacaact ataaaaaat aaacttggtg tattgtaaac ctctaaaaaa aaaaaaaa 1020

```

【図 3】

FIG. 3

```

gtccccgcca ggagaagga acattctgag gggagtctac accctgtgga gctcaag 57
atg gtc ctg agt ggg ggc ctg tgc ttc cgt gag gac cag aca coa ctg 105
Met Val Leu Ser Gly Ala Leu Cys Phe Arg Glu Asp Gln Thr Pro Leu
1 5 10 15
att gca gga atg tgt tcc ctc ccc atg gca aga tac tac ata att aaa 153
Ile Ala Gly Met Cys Ser Leu Pro Met Ala Arg Tyr Tyr Ile Ile Lys
20 25 30
tat gca gac cag aag gct cta tac aca aga gat ggc cag ctg ctg gta 201
Tyr Ala Asp Gln Lys Ala Leu Tyr Thr Arg Asp Gly Gln Leu Leu Val
35 40 45
gga gat cct gtt gca gac aac tgc tgt gca gag aag atc tgc ata ctt 249
Gly Asp Pro Val Ala Asp Asn Cys Cys Ala Glu Lys Ile Cys Ile Leu
50 55 60
cct aac aga ggc ttg gcc cgc acc aag gtc ccc att ttc ctg ggc atc 297
Pro Asn Arg Gly Leu Ala Arg Thr Lys Val Pro Ile Phe Leu Gly Ile
65 70 75 80
cag gga ggg agc cgc tgc ctg gca tgt gta gag aca gaa gag ggc cct 345
Gln Gly Gly Ser Arg Cys Leu Ala Cys Val Glu Thr Glu Glu Gly Pro
85 90 95
tcc cta cag ctg gag gat gta aac att gag gaa ctg tac aaa ggt ggt 393
Ser Leu Gln Leu Glu Asp Val Asn Ile Glu Glu Leu Tyr Lys Gly Gly
100 105 110
gaa gag gcc aca cgc ttc acc ttc ttc cag agc agc tca ggc tcc gcc 441
Glu Glu Ala Thr Arg Phe Thr Phe Gln Ser Ser Ser Gly Ser Ala
115 120 125
ttc agg ctt gag gct gct gcc tag cct gcc tgg ttc ctg tgt ggc ccg 489
Phe Arg Leu Glu Ala Ala Trp Pro Gly Trp Phe Leu Cys Gly Pro
130 135 140
gca gag ccc cag cag cca gta cag ctc acc aag gag agt gag ccc tca 537
Ala Glu Pro Gln Gln Pro Val Gln Leu Thr Lys Glu Ser Glu Pro Ser
145 150 155 160
gcc cgt acc aag ttt tac ttt gaa cag agc tgg tag ggagacagga 583
Ala Arg Thr Lys Phe Tyr Phe Glu Gln Ser Trp
165 170
aactgogttt tagccttggt cccccaacc aagctcatcc tgctcagggt ctatgtagg 643
cagaataatg tccccgaaa tatgtccaca tccataatccc aagatctgtg catatgttac 703
catacatgtc caaagggtt ttgcaaatgt gattatgtta a 744

```

【図 2 A】

FIG. 2A

```

cagggatcag ggttccagga actcaggatc tgcaagttag accagacacc actgattgca 60
gga atg tgt tcc ctc ccc atg gca aga tac tac ata att aaa tat gca 108
Met Cys Ser Leu Pro Met Ala Arg Tyr Tyr Ile Ile Lys Tyr Ala
1 5 10 15
gac cag aag gct cta tac aca aga gat ggc cag ctg ctg gta gga gat 156
Asp Gln Lys Ala Leu Tyr Thr Arg Asp Gly Gln Leu Leu Val Gly Asp
20 25 30
cct gtt gca gac aac tgc tgt gca gag aag atc tgc ata ctt cct aac 204
Pro Val Ala Asp Asn Cys Cys Ala Glu Lys Ile Cys Thr Leu Pro Asn
35 40 45
aga ggc ttg gcc cgc acc aag gtc ccc att ttc ctg ggc atc cag gga 252
Arg Gly Leu Ala Arg Thr Lys Val Pro Ile Phe Leu Gly Ile Gln Gly
50 55 60
ggg agc cgc tgc ctg gca tgt gta gag aca gaa gag ggg cct tcc cta 300
Gly Ser Arg Cys Leu Ala Cys Val Glu Thr Glu Glu Gly Pro Ser Leu
65 70 75
cag ctg gag gat gta aac att gag gaa ctg tac aaa ggt ggt gaa gag 348
Gln Leu Glu Asp Val Asn Ile Glu Glu Leu Tyr Lys Gly Gly Glu Glu
80 85 90 95
gcc aca cgc ttc acc ttc ttc cag agc agc tca ggc tcc gcc ttc agg 396
Ala Thr Arg Phe Thr Phe Phe Gln Ser Ser Gly Ser Ala Phe Arg
100 105 110
ctt gag gct gct gcc tgg cct ggc tgg ttc ctg tgt ggc ccg gca gag 444
Leu Glu Ala Ala Trp Pro Gly Trp Phe Leu Cys Gly Pro Ala Glu
115 120 125
ccc cag cag cca gta cag ctc acc aag gag agt gag ccc tca gcc cgt 492
Pro Gln Gln Pro Val Gln Leu Thr Lys Glu Ser Glu Pro Ser Ala Arg
130 135 140
acc aag ttt tac ttt gaa cag agc tgg tag ggagacagga aactgcgttt 542
Thr Lys Phe Tyr Phe Glu Gln Ser Trp
145 150
tagccttggt cccccaacc aagctcatcc tgctcagggt ctatgtagg cagaataatg 602
tccccgaaa tatgtccaca tccataatccc aagatctgtg catatgttac catacatgtc 662
caagagggtt ttgcaaatgt gattatgtta aggatcttga aatgaggaga caatcctggg 722
ttatccttgt gggctcagtt taatcacaa aagaggcgag gaaggagagag tcagagagag 782
aatggaagat accatgcttc taattttgaa gatggagtga ggggcttga gccacaatat 842
gcaggtgttt ttagaagggt gaaaagccaa gggaacggat tctctctag agtctccgga 902

```

【図 2 B】

FIG. 2B

```

aggaacacag cttctgacac atggatttca gctcagtgac accattttca gacttttgac 962
ctccacaact ataaaaaat aaacttggtg tattgtaaac ctctaaaaaa aaaaaaaa 1020

```

【図 4 A】

FIG. 4A

```

1 50
IL-1_alpha MAEVPKLASE MMATYSGNED DLFFEADGPK QMKCSPQDL LCPDLGGTLQ
IL-1_beta -----
IL-1RA -----
IL-1_delta -----
CS329 -----
Tango-77 -----
Zilla4 -----
IL-1_zeta -----
IL-1RA_beta -----
Spoil_II -----
IL-1_epsilon -----
IL-1_eta -----

51 100
IL-1_alpha RISDHYHSGK FRQAASVVVA MKELEMLVP CPQTFQENDL STFFPIFEE
IL-1_beta -----
IL-1RA -----
IL-1_delta -----
CS329 -----
Tango-77 -----
Zilla4 -----
IL-1_zeta -----
IL-1RA_beta -----
Spoil_II -----
IL-1_epsilon -----
IL-1_eta -----

101 150
IL-1_alpha EPIFFDTWEN EAYVHDAPVR SLNCTLRDSQ QKSLVMSGPY ELKALHLQGG
IL-1_beta -----
IL-1RA -----
IL-1_delta -----
CS329 -----
Tango-77 -----
Zilla4 -----
IL-1_zeta -----
IL-1RA_beta -----
Spoil_II -----
IL-1_epsilon -----
IL-1_eta -----

151 200
IL-1_alpha DMEQVVFSM ...SPVQGE SNDKIPVALG LKEKNLYLSC VLKDDK..PT
IL-1_beta DMEQVVFSM ...SPVQGE SNDKIPVALG LKEKNLYLSC VLKDDK..PT
IL-1RA NVNLEKIDV VP.....IEP ...HALFLG IGGKMLCLSC VKSGDE..TR
IL-1_delta KYIGERISV VPMRLDASL ...SPVILG VQGGSCQLSC GVQGE..PT
CS329 NC.CARKICT LPMRLDRTE ...VFPLG IQGSGRLCLC VETBEG..FS
Tango-77 ....KIFPA LASSLSA.S AEKGSPIILG VSKGEFCLYC DKDKGQSHPS
Zilla4 NYIRPEIFFA LASSLSA.S AEKGSPIILG VSKGEFCLYC DKDKGQSHPS
IL-1_zeta NYIRPEIFFA LASSLSA.S AEKGSPIILG VSKGEFCLYC DKDKGQSHPS
IL-1RA_beta DSVTPVTAV ITCYFEALE QGRGDPYILG IQNFMCLYC EKVGEO..PT
Spoil_II DSVTPVTAV ITCYFEALE QGRGDPYILG IQNFMCLYC EKVGEO..PT
IL-1_epsilon DRMSFVTIAL ISCRHVFELS KDRGNPYILG INGLNCLMC ARVQGO..PT
IL-1_eta RSIKPVTLHL IACRDTFSD KEGKNMYILG IKGKDLCLFC AEIQGK..PT

```

【図 4 B】

FIG. 4B

201	250
IL-1_alpha LQLESVDPKN Y..PKKKMEK RFVFNKIEIN NKLEFESAQF PNWYISTSQ	
IL-1_beta LQLESVDPKN Y..PKKKMEK RFVFNKIEIN NKLEFESAQF PNWYISTSQ	
IL-1RA LQLEAVITD LSENKQDKP..PFIYRSDG FTSFESAAC PGWFLCTVPE	
IL-1_delta LTLEPNVIME LYIGAKESKS..FTFYRDMG LTSSFESAAY PGWFLCTVPE	
CS329 LQLEDVNIEE LYKGEEATK..FTFYQSSG SAFLEAAAV PGWFLCTVPE	
Tango-77 LQLEKEKIMK LAAQESARF PFIFYRAQVG SWNMLESAAH PGWFLCTVPE	
Zilla4 LQLEKEKIMK LAAQESARF PFIFYRAQVG SWNMLESAAH PGWFLCTVPE	
IL-1_zeta LQLEKEKIMK LAAQESARF PFIFYRAQVG SWNMLESAAH PGWFLCTVPE	
IL-1RA_beta LQLEKEKIMD LYQOPEPV.K PFLFYRAKTG RTSTLESVAF PDWFIA.SSK	
Spoil_II LQLEKEKIMD LYQOPEPV.K PFLFYRAKTG RTSTLESVAF PDWFIA.SSK	
IL-1_epsilon LQLEKEKIMD LYQOPEPV.K SFLFYHSGG RNSTFESVAF PGWFLCTVPE	
IL-1_eta LQLEKEKIMD LYVEKKAQ.K PFLFYHSGG STSVPGQSVY PGWFLCTVPE	
251	290
IL-1_alpha ENMEVFL...GOTKGGQDI TDFTMQFVSS	
IL-1_beta ENMEVFL...GOTKGGQDI TDFTMQFVSS	
IL-1RA ADQPVSLTQM PEGSGWNAPI TDFTMQFVSS	
IL-1_delta ADQPVSLTQM PEGSGWNAPI TDFTMQFVSS	
CS329 ADQPVSLTQM PEGSGWNAPI TDFTMQFVSS	
Tango-77 CNEPVGVDIK FENRKH...IEFSPQVCK AEMSPSEVSD	
Zilla4 CNEPVGVDIK FENRKH...IEFSPQVCK AEMSPSEVSD	
IL-1_zeta CNEPVGVDIK FENRKH...IEFSPQVCK AEMSPSEVSD	
IL-1RA_beta RDQPIILTSE LGKSYN...TAFELMIND	
Spoil_II RDQPIILTSE LGKSYN...TAFELMIND	
IL-1_epsilon GQPLILTQE LGKANT...TDFLMLF	
IL-1_eta GQPIILTQE LGITNN...TDFLMLF	

【図 5】

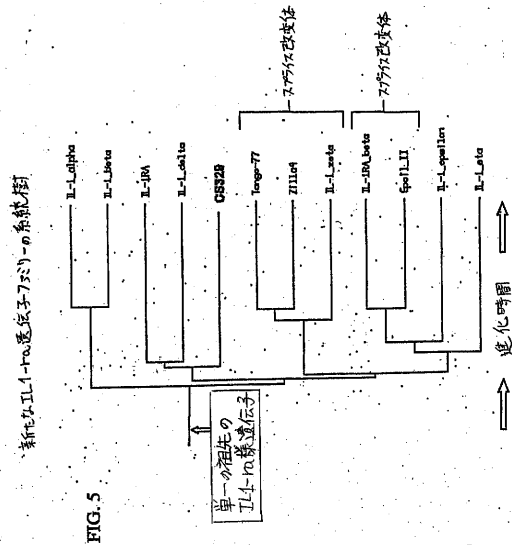


FIG. 5

【図 6】

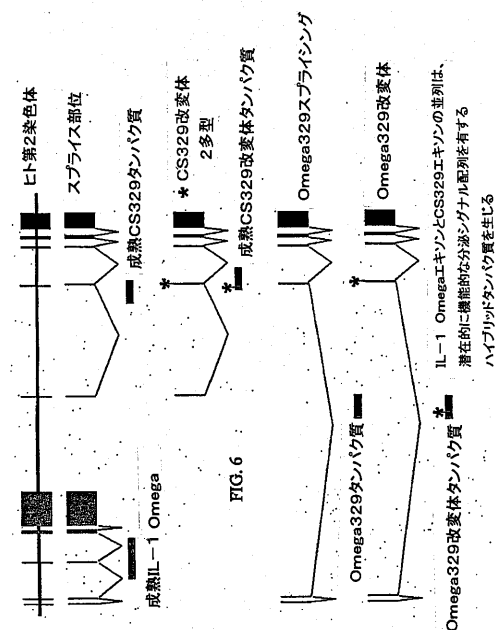


FIG. 6

【図 7】

FIG. 7

atg tgc tcc ctt ccc atg gca aga tac tac ata atc aag gat gca cat	48
Met Cys Ser Leu Pro Met Ala Arg Tyr Ile Ile Lys Asp Ala His	
1 5 10 15	
caa aag gct ttg tac aca cgg aat ggc cag ctc ctg ctg gga gac cct	96
Gln Lys Ala Leu Tyr Thr Arg Asn Gly Gln Leu Leu Leu Gly Asp Pro	
20 25 30	
gat tca gac aat tat agt cca gag aag gtc tgt atc ctt cct aac cga	144
Asp Ser Asp Asn Tyr Ser Pro Glu Lys Val Cys Ile Leu Pro Asn Arg	
35 40 45	
ggc cta gac cgc tcc aag gtc ccc atc ttc ctg ggg atg cag gga gga	192
Gly Leu Asp Asp Arg Ser Lys Val Pro Ile Phe Leu Gly Met Gln Gly Gly	
50 55 60	
agt tgc tgc ctg gcg tgt gta aag aca aga gag gga cct ctc ctg cag	240
Ser Cys Cys Leu Ala Cys Val Lys Thr Arg Glu Gly Pro Leu Leu Gln	
65 70 75 80	
ctg gag gat gtg aac atc gag gac cta tac aag gga ggt gaa caa acc	288
Leu Glu Asp Val Asn Ile Glu Asp Leu Tyr Lys Gly Gly Glu Gln Thr	
85 90 95	
acc cgt ttc acc ttt ttc cag aga agc ttg gga tct gcc ttc agt ctt	336
Thr Arg Phe Thr Phe Phe Gln Arg Ser Leu Gly Ser Ala Phe Arg Leu	
100 105 110	
gag gct gct gcc tgc cct gcc tgg ttt ctc tgt gcc cca gct gag ccc	384
Glu Ala Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Gly Pro Ala Glu Pro	
115 120 125	
cag cag cca gtg cag ctc acc aaa gag agt gaa ccc tcc acc cat cat	432
Gln Gln Pro Val Gln Leu Thr Lys Glu Ser Glu Pro Ser Thr His Thr	
130 135 140	
gaa ttc tac ttt gag atg agt cgg taa	459
Glu Phe Tyr Phe Glu Met Ser Arg	
145 150	

【図 8】

FIG. 8

1 MCSLFMARRYIIKIDOKALYTRDQALLWGPVADNCCAEKICTLENRGL	50
1 MCSLFMARRYIIKIDOKALYTRDQALLWGPVADNCCAEKICTLENRGL	50
51 DRTEKVPILPLGIGGGRCLACVETEDGSLQLEDVNIEELYKGGEATRT	100
51 DRTEKVPILPLGIGGGRCLACVETEDGSLQLEDVNIEELYKGGEATRT	100
101 FFQSSSSGSAFRLEAAANPGWFLGPAEPQOPVOLTKESEPSARTKPYEQ	150
101 FFQSSSSGSAFRLEAAANPGWFLGPAEPQOPVOLTKESEPSARTKPYEQ	150
151 SW	152
151 SR	152

【図 9 A】

FIG. 9A

actagtctcc catagacac agctgaatgt acgaggtcag aagcaaggcc tgcgccagaa 60
 coattgcaag coaggtgctg tcttgatgt agctcctaaa aaaactgatg cagaattgcc 120
 ccaccaacat gctccagatt cctgctccac agaaccctcg tgaactaacc atgttgcttt 180
 tagattctgc agtaagtga taatctgcag taataaacat tgcgtgaaag agaacaatgt 240
 gtagtctact tattatgatc aaaactttat ttcccaactc ttccattttt ccttctcaga 300
 attgacacca gcccttcaat aacccaataa gctattttaa atgctgatca taactctctt 360
 gttactgttt aactgttccc aaaggttaca attccctttc gacctagctt gcatctccca 420
 cctgcacacc aggatgtttc tcatatttct acctaaaaa ttggggacta caagtgaag 480
 caaaagaggg ggtccatc acgaacccag gtatttagct gtaaaactca cttgtcagc 540
 cagcttgaca ggtttacagt ttgtagaag accagaaaga aggtagccaa gacagaagag 600
 gcaacctctg cttgtcctag aaccttcaat ccatatacat ctaagctccc cagcaccatt 660
 tctaccacag acctctcaga gttcctgag atgcagaccc caggacactg acctcagttt 720
 ccaggcaggg ttctctgaca ccccttccac actcctgcag tggggagttg tctcatgggt 780
 caacactact ttgggacact tgacccatcc cctcgacctc cagaaccat tcaactttca 840
 aggtcacctc ctataggaag tatttgaaaa gatgagagtc atggtcattt gctatgataa 900
 tatctctgtc ttatctccct gtaaaaagtt gcttgggggt cctcgccatg catctgacct 960
 taaggttgga gctgcacaa tatgttttta agcaccocgc ataactgttc gcaaaatttc 1020
 agaacatggt ttgtacagaa tgtactttcc ttcaactcata caaaccttg taaaagagta 1080
 gtttgaatcc caactcattc ttgaaggcca ccttttgtag ggtgacagaa tttaaaaaa 1140
 cagaattttaa aaatatttta tcccaggaa gctccacact ctaaatccag aatgaaagaa 1200
 gaataagaaa cacacttggt gtggcggtgg tgggtgtgat ggtgtctgtg gtggtgggtg 1260
 tgggtgtgtg ggtgtgtgtg gtggtgtgtg tgggtgtgtg ggtgtgtgtg gtgtaatgat 1320
 ccagtaaaag tgagctcaga tggcctgaga gactcaggca caccagctat tcaagtgaaa 1380
 actacctact actgatatta gagttctata attttagtag cagccacagc cctggggcct 1440
 gggcctatat ttccagagag gaaatgttca cagcaggtca actgcagaca gtgaagatca 1500
 gaaatgtttc ataactcagt catcagagaa aaggcaaaag agctgatgga ctttatccctg 1560
 aaaaagcaaa atccaaacca cctcatgctt aatgcattca aaggtctgcg ggcagaagaa 1620

【図 9 C】

FIG. 9C

tgcgaagtca actggagaa tgagtctctt gacctgcac tgtccaggtt ctcatatccc 3300
 ctatagttca gggccatagg ctccgtgtcc atcccatgc aaatctaaag ttaatacgtt 3360
 ctacagctga gtttcttacc atatgtgtct cagtaagttt gtatcaacta attaaacttg 3420
 aaaggagttc cttctgatct tcccacaacg agcccaactc gtgatgaatg cagccctgct 3480
 tcaattgtgt tctctggatg catctggctt ccatcagcat aatcttctta ttcttgatcc 3540
 ttccaaactc ttcaaggttc agacagaacc ccatggagca tcaaaagagt ttgaccocag 3600
 cattgtttat gtatgtgcaa aaccactaat aacacagtc aatgacagtg ctacagagac 3660
 agcaggtcag tctctggctt ctgtcaagcg ttatgagtg actctctccc cttcccgcaa 3720
 atactcatta atctccccc ctcttatta ttggactgtt gttgaagata ttatgaaatc 3780
 tctgggctct tcttcccgga tctagagcca attacagatt ctgtaggttt gaccacccct 3840
 gaccagacat tataaacaca gtgctggctg cctgaagaaa acagtggag actccagcca 3900
 ttagaatcca ggcaccagga actacaggtc agtgggtgca gtgctgtctt ctgtgtatct 3960
 cttacacaca cacacatata cacacacac aacacatata cacacatata acacacaaca 4020
 catcacata caacacatac acacacacaa cactttctgt taatgtctcc aaaattctca 4080
 ggctctaggy aagaagaat gctctttaga gaatgggtg tgatgttcta taagtctagg 4140
 aatacttgat agaattaat gagaagtata gattaggtca aagcaagggt actacatatt 4200
 tggaaaccaca gagttttgaa agtcatctca aaagaattta tttaggcag agatgttcaa 4260
 aaaatgtttt gtttggaca tatggaagct ccatgggaga cattctgtga ttctatcaca 4320
 tagacagtag ggtgcgccac aaggtgtgaa gctcttcatc acccatcat ctatcatata 4380
 tccaaatggt ttctttgaaa acaactctct tgtgaaactt aaagttagct tgaatatata 4440
 ataactctgt ccagctcttc atttcaatgg gaatagattg aaggocctaa gaccacacaa 4500
 aaaaacaaaa caaacaaat aaaaacacca aaaaataaac cctataaatg aatgagttag 4560
 taagtttatt ttagaatcca gcccttcaat caaagcttga ttcatgcata tctgtgttct 4620
 gatcttaagy tgcgtgtctt gtcaagttgta tagtttgata gaggtacaga tgaactatat 4680
 acatcatgct tcaagatttc aggatcttat aacttttata aagcaataaa ttgtcttaa 4740
 tgcacactaa taaacatat agcaagttt gacagaggt cagagtactg tttagaagat 4800
 gaagggaaga attttgttat gatagtaag gggaaaatca aatttgagt catggaatca 4860

【図 9 B】

FIG. 9B

tacattttgc tttttattat tataaattac ctggagaata tttttgtctg aattatctcc 1680
 caaatattaa ccataaaaat aaaaaattcc atgtgtgctt ctcccagggg ctataagcc 1740
 cctggtctta gattgtgtgg ggcaaaacct gacctttgaa gtatttactt ttgaagatgc 1800
 cataccatac atttggccac ttggagagag tctaatgtca catctaaagg gttactctga 1860
 tgcctgtttt tctcatatgc ccttgctta cagtaacta tggctccagc taaactataa 1920
 agttccttgg caacagagat ggtacgtat gtgtctttga cacagcagaa taaatgctta 1980
 gtgaacatta ctgattgctt gacaggacac ctcaactttt ggtactttca acagagggat 2040
 gtaaccttat gaagaacaa gaagaatgaa tattggcaat aaaaacaaa atttggttaac 2100
 ccaattctag ccttgaatc atttttaggt agtgggaagt cttttgtttt tgtttattca 2160
 ctttaccatc caattgtctg cctccctcca agtctccccc caccaccaca gtctttttc 2220
 cctcccttcc tctcttgaga gaatggagaa cctcctgga tattccccca tcatgaaaa 2280
 ttaagtctct gcagggttag acacttcccc cagttaggac agtcagggca gccagctag 2340
 aaaaagcata tcccacagac agacaacagc ttttgggata gccccgttcc agttgtttag 2400
 gatccacatg aaggtcgagc tgcacatctg ctacatatga atgaggaggc ctaggctcag 2460
 cctgtgtatg ttctttggtt ggtgtgtcag actctgagag ccccaagggt ccaggtcagt 2520
 tgactctgtt ggttctctg ttgacacctt gtccccttcc agcccaaat ccttccctta 2580
 atcttctccc ttctcacttc cataagagtg tgaggagctt ttaaaaaaat gaagcattt 2640
 atctcccag ggcaacacat ggaatgaaa gatttgtaaa agtaatttaa agaaaaagaa 2700
 aaaaaattt aacaagaaat aagaatcttg ttctctgata aatgcttaag agtgtggaaa 2760
 acataaactg gattcttaata gaatgcaatt ggtatgtaat gaaacactat caaagttag 2820
 aaatagcttt cactaccttg cacaaaactc cttggcatgt ggtgtgttgg caaattttct 2880
 tgttagttta aaaccacac aataacaca aaatagcaaa aattgggtct cagctccat 2940
 catttttctt catctcttgc tctgtgatcg tctgggtctt aagctgacac ctcaacaaat 3000
 cctcatcaag acctttgttg aaatttgcaa atgtcccaa aaggagaatt acaataagtc 3060
 agagaactgt ctgtccaatt cttatccct agtgatgag gatgaagga tgaataagag 3120
 atggataaat ggactgatg acagataaat gaaggaaat gtacatggtt aggtgtagat 3180
 atgacttact caacagatga gtagaaggat gagaataga tggacagctg gactgaggca 3240

【図 9 D】

FIG. 9D

tacatagttt gacatagaaa gaaccttggc aaccacataa tctaagcat gagcccaaga 4920
 actggcctgt gtttttaaga tctacttcc agctgttatg taactgaaca gcaagataga 4980
 taagcccaag tatagtgaag ccatgtccag tgactttaat aggatgaca ggaatggtg 5040
 gtgatgaaga ggggtggatt ttgagcagga ataccaaaag caatgctgac tgtgccctg 5100
 gagagaatta gcatgaagtc ttgagagaaa aatgagatgc tattgcacaa gcaacctagg 5160
 gccagatggt gtcaagatag gtggccatcg tggactttag aaccagcgag gaatgtatc 5220
 agagatgac tttatgtagg ttaggtttga ttcaagaacc aggagggtta gcatgtttac 5280
 aatggtgact aaaaacaagc acaagttat actttaaga aataatctct gaaaagaag 5340
 gaggtatatt ttcatgtccg gaaagaggaa tattacaaa gtgagaggag tagatttgag 5400
 aaagagaagt ggattgtgga ggagcagatg ctaccacgc ctttcaactc acttgaactg 5460
 acaccaag atgaaggtgt gctgtggaact gctgaagctc agcctgtgac tgggaagcag 5520
 taacaaaaat tgctctcac agctgtaca gatattccat agcatataa aataaaagt 5580
 cttaggttat tctttacaa ctctcagct tatgaatgac ccggaaggaa aagaactota 5640
 caatgtgctt gtgtctgttc ttacttctc tgcacaagc aaaaagcct tgggaattg 5700
 ctgagaggga agctcatcaa acaggctggc cttgaggctg ggtctgtatt cgtctacotg 5760
 ggatagagga attcgtatt cttttataat ccaagtgtg cctggggacc agcagcata 5820
 ttaagacctg gttgcatgtt tgaatgcag tctcagattt catccagac ctaagagata 5880
 acactgttt catgagata caagattaag aaatagcat tagagagtaa ttggctaaat 5940
 gggtaaatgt catgcaagca ggaggatctg attactccc caggacccc acagttccc 6000
 tgcgttagag cacatctgta atcacagtag gctatgatg aaatgggagg tgaatcaaga 6060
 gaatctctag cagctacggg ctggccagcc tccatgca agcactaaat aaggcaagga 6120
 ccaatacctg aagttgtccc attacttca catatacacc acggcatgtg tgaacttga 6180
 ctacacata caaacaata cacactgca cacatacaa actcagagat taaggacaa 6240
 tggcctgaca tatcagttcc taagcctggc tcaatgctt taacactaca agcagtata 6300
 aataaggata ggogagagaa cagttacga atggttca agtgggcca tgcctgtgac 6360
 ttttaacaaa tgtttcatat ttttaataa taacacttag attacaaat aaatttacta 6420
 caggaaaaatg ttaagaacta tcaacaacca ttgaactccc tgcgtcccac aaatgagtg 6480

【図 9 E】

FIG. 9E

tataacaagc accagccgtc ctgtgccaca tgtgtgtgtg tctacacagc tatgaattta 6540
 attgggataa taatgtgcac attctttacg gctgtcagtt ttacttctat gtatttgaaa 6600
 tgtttgtgcc acaaatgtca tctttaagga gcatactctt atttctcgga ttatcattc 6660
 cctttcagcc gactggacat tgacagcatt tccaattttt caacttgta aaaataacta 6720
 attgaactat ttataacta agcatttggc caataacta cctctgctg gaatgggggc 6780
 aacaacacat gcaatcatgg gaaagccagg atgctgtctg ctgactccca gccctggcat 6840
 tctgtcagaa cctcactctc atctgtgcc tgatactctt cacttcaag tctttccca 6900
 gtgactttta aaggcaacag aatcatatag ccaataatga aagctacttg gtctacagtt 6960
 gtgtggcggt ttttatagat attttctcca tttaacttcc aaatgctatc ccaaaagtc 7020
 cctataccct ccccccactt gctcccctac ccaactcact ccaactcttg gccctggctt 7080
 tcccccttac tggggcatat aaagtgtgct agaccaaagg gctctcttc ccaatgatgg 7140
 ccaactagcc cattttctgc tacatatgca gctagagaca ccagttctgg ggttactggt 7200
 tagttcatat tgtttctta cctatggggt tgacagcccc tcaactctt gagtacttcc 7260
 tctagctcct ccattggggg cctgtgttcc catctctatg atgactgtga gcatccactt 7320
 ctgtatttgc caggcactgg catatgaaat agtatctgca ttgtgggtt gattatggga 7380
 tggacccccc ggtggggcag tctctggatg gtccactctt tcatcttagc tccaaacttt 7440
 gtctctgcaa ctctctccat ggaatttita gtcccaatc tagggagaaa tgaagtatcc 7500
 acaagttgat ctctctctt gatttcttta tgttttagaa gtgtatctt ggaatttota 7560
 ggttctctgg ctaatacca cttatcagtg agtactatc aagtgaattc ttttgtatt 7620
 aggttacttc actcaagatg atattctcca ctatgttcat agcagcccta tttatagtag 7680
 ccagaagctg gaagaaaccc agtccctcaa cagaggaatg gatacagaaa atgtggcaca 7740
 tttatgcaat ggagtaacc tcagatatta aaacaacga gctttatgaa ttctggggca 7800
 aaaccctatc taagacccga gaataagaa aagatggact gctttaaacc ctgctggaga 7860
 gctggggaga ccttttgga ttctgtaata cttaggggta cggaaacagct tgtgctgga 7920
 taattctgag ctccagatg tctgcccccc aaaaacactt ctgttttct gaaagccttt 7980
 tcttctcttg cctcagtgaa gaaccagcac tcccaactgc agga atg tgc tcc ctt 8036
 ccc atg qca aga tac tac at gtaagtaa tcttaacgt cgtccaatca 8084

【図 9 G】

FIG. 9G

gggtctcttt ccagaagttg cttagtgctc atctgccca aggccttgat tctttcttc 9741
 aattgtgtct ctagagacat gagaatattg tcaactgat aaggagaaga ggtaggggca 9801
 gtttctctct gtaaaaaatg aattccattt accctgcagt ctccatagac aaacaggcca 9861
 gaggggggca gaccagtaa ctcttagctg agccttacct gtcttaaac ctgcatctg 9921
 tggctccctc actgtctgaa ttgcattctg tcttaacctc cag ag aag gtc tct atc 9978
 ctt cct aac qca qcc cta qac cgc tcc aag gtc ccc atc ttc ctg qqq 10026
 atg cag qqa qga agt tgc tgc ctg qcg tct gta aag aca aga qag qaa 10074
 cct ctc ctg cag ctg qag gtgagacac cctctcatt gcagtcagta 10122
 ctgccactgg aacatagtga cctcttgaa cccacatgc cctctcttg ttcccatct 10182
 atctctcttt gctccagct gagggactct agcctttggg gatgtacaga aagaacatgg 10242
 cttoggaaaa cttctcccta tggatctct ctttggccaa gctctgagg cactaagggc 10302
 tgaactccca accaaacact catttcatct cacagctgc tcccttccc cacag gat 10360
 atg aac atc gag qac cta tac aag qqa qgt qaa caa acc acc cgt ttc 10408
 acc ttt ttc cag aga agc ttg qga tct qcc ttc agq ctt gag qct qct 10456
 qcc tgc cct ggc tgg ttt ctc tct qcc cca cct gag ccc cag cag cca 10504
 atg cag ctc acc aaa gag agt qaa ccc tcc acc cat act qaa tac ttc 10552
 ttt gag atg agt cag taa agagacataa ggtggggccc tgcctagtg 10600
 cccccagctt gagatctct tgcctagcat ctctggaaag cagaataagg aagataccaa 10660
 agatgtttgg gtcttaaac ccagaacttg tgaactgttt acattaaatg gcaaagggat 10720
 ttttttttct cttcatggct caattgggac cattggaatc atctgagccc tcatgaggag 10780
 aaggaagagg tcaaggggag actggggcaa actttgttca taaaagtaac aatggagaca 10840
 gggaccataa gctgatgggt aacagtgttt tctagaacc ggaatgatg agagctctcc 10900
 tgacacaggt tctgatttt tctggactga agaatggta aataatacag ctocattatt 10960
 ttaagccact gagtttgaga tcaattcaatg aagctgtcat aataaaactt gtgttca 11020
 tacaattcaa tattgttagg caccocgggt atttcttga aagactatca gggattctcc 11080
 tggatgctga ttccagggtc cagtgagtc cctgggttga agagatttca caaccagaa 11140
 catcaggctc gacttctta aaagtctgc gtgcacccc tgcctgaga gcattagcaa 11200

【図 9 F】

FIG. 9F

aggggctgg agatcacatg agaagggaaa aggctgagtc aaagggacaa agtccctct 8144
 agccacagaa atctcaaaa ctgaataatt gatcttcatc ttgttcaatc acacagccc 8204
 tcttctctgg tgacagaatg gaacaactgt aagagtgtga ttgcttagtc cattttacag 8264
 acccgaaac tcaactcca cgaagtata caatttctct catgtcatgc aattaccocaa 8324
 aagcagagag tgggactgga ctctctgttc tctaaactga ttagctagtc tcttagaaag 8384
 ctcaaaacat cttgagtcac aaggacagca cctttatggt cacttggatt gatacctata 8444
 tcaaaaaaaa aaaaaggtct cactagatag cctgtgctac cctgaaactc tcaactgtga 8504
 catttagtgg accacgaact cacagagatc tgcttccaa gtgtctggat taaagtatgt 8564
 accaccacac ctgcactctt gacaataact gactgttacc taatttctc cagtggctaa 8624
 acagttaagt cccagttccc aaagtctgag aaaaatgcca ggtgtgaaa tctgtacaga 8684
 cctttgtctt taatgtacaa gtgagctgc tttaaaaa atacgaagc tgttttgtct 8744
 attgctaagt gtgacagaga cagaaaaggc tccagaagt ggtacatttg gtccagaggt 8804
 tctgttcca aactcattgt gagctctgaa agcaactgat gggcagctct gaaatcagct 8864
 gggcaattag gctaataaca ggcataatt taatgttcca cagcatgac agttctccc 8924
 cagctgacct agtacactt taccctcta ggcagctcat tagaccata ggtataacca 8984
 gtgactaatc aggcctctgt ctaattctaa gttgctccc tatataagt ccactcagag 9044
 tgtactcatc catggctgta gtgggcccag agtctaggga catagacttt tctattgtcc 9104
 aatttctgat ttgtgaattt tctcaaaaa gaatttttt taattttaca aatacaatca 9164
 cagttactac atcttcaagt cttctattaa ttatgttacc tatttaaaa aataaataa 9224
 atcaagctca gaacatcat ggaatgggtt cattgtatct ccagggtacc tgagttcaa 9284
 agcaactctc cagacagcca tgaacaatc ctcaattacc tcatgagaag acactactgt 9344
 cattttcgga gctctgata atcctgagcc taggcagctt tgggtgaaa caatttctac 9404
 ccttatgga acagtgtccc tctctgtct cacaacaatt caccaaagc tcatgtggt 9464
 tctccagtaa ggtgttatgg ggacagaaat ggacaatgat cctgagggc agtgcattc 9524
 taacttgc cctcatttc ag a atc aag gat qca cat caa aag qct ttg tac 9577
 aca cag aat qcc cag ctc ctg cta qga qac cct gat tca qac aat tat 9625
 agt cca g gtgactct cgtgtgtgg ggtgggggag tggaggggag ggtgtgggg 9681

【図 9 H】

FIG. 9H

ttcttatttc ataggaaatc tgtgtccctg cccctgctaa agcagggagc ctggaccctc 11260
 ctgatttagt gaggggtgag ctgctggcac ttttttgtt caccagctc ttaagcagtg 11320
 atggagcaca aaagatcttt actgagaaga tggccatgaa gctctggcta gacaccaaga 11380
 atatgatata agcagagcta cagcacaga tgagccaatg aggaagcca ttcagggag 11440
 ctaagccagc cttcccaaa ggacagctaa ccttggaact aaatgaatg ggttttctc 11500
 ggacagaac ataggtcaag cattctaggt agaactcaga attcagaag gtgtgagaga 11560
 ggcatggaga gctccaggca tgtctgggct atggtgtgto attctgttg caagaatcca 11620
 acgtctgttg ttaaggagtt gctgaaatt aaaaaggaa aatgggtaga gtctaattgt 11680
 gaatgacttg caaaggagtt tagccataa gtggggagct cagaggagtc atctaaggat 11740
 gtcaagcagg ggcctctgta tcaattgttg accagctag gtgctacaga gctaccttc 11800
 agctctgcat cctcactcac attcaggtac cttcagaggt caattctgt gctctgttc 11860
 tatgggtagc ctgacctgt ttcattctct tgtataact aggcacataa gctaggagac 11920
 tggtagagtt taactgagtg atgtgtgaat cagcgacac caaactcaa gtgtctcag 11980
 gctttacca gggggcactg attgagaaat tgaatgag gtgttagaa tgcattcaga 12040
 aaacaagggg aagaaaaatt tgaattgcta aagtggaaag tcccaacta aatgttagtc 12100
 agtagtttct aattacttga gtctctaatt agaggttagt tggcagttc tggtagtta 12160
 atctaagttt cattttotta ggctatgacc attctctgag tgcctagtta gcaatgcagt 12220
 aagaactcaa gaccagaat agcctctgtt aattatttta gcaatgatca ctcattctg 12280
 ttgctccta ttgagatctg ttcccatgga ccccccagc acactaggcc tctagtacc 12340
 aacataataa tgaattgtgc acagacaaaa tatttttttt cagtatctgg tattgtgac 12400
 atttccatta gtgctggagg gaaggctaca acgaccatga aggcattggc cctgcttct 12460
 aaggacttac aatgtaatg gagccctgac attataaagt gggtaacctt gtttcaact 12520
 gagccaaact gaggtgagg gcttagatta gtgttagtg accttcaga catgttcagt 12580
 gctagaagaa acacattctg ggttagtta gatgttttag tcaatttag aagaagcca 12640
 atgattggac tttaacttc tggaaaccaa gtgttggag agagaacca cttctgacca 12700
 ttgggtctat ggcactccc ctaccatcac aagaactcac caaataaat tagaaaaac 12760
 aagaaaaact catatctat agacctctg tagaattagc agaacctgc tgtggcactt 12820

【図 9 I】

FIG. 9I

gggatttga actcaaaat ggaagaagct actgtgacc gtccaagact ccaggaggc 12880
 tctctgaca catccaca ctcaggctta aattcttct tctcctaga aggcacgccc 12940
 atcttccaa ccaggccaca gatgctataa ttatgtaaat tctgtggaga ggcacacttt 13000
 agatcttacc cactagt 13017

【図 10】

FIG. 10C

CD3+ NK1.1+
CD3+ NK1.1+
CD3+ NK1.1+
CD3+ NK1.1+
CD3+ NK1.1+



FIG. 10B

CD3+ NK1.1+
CD3+ NK1.1+
CD3+ NK1.1+
CD3+ NK1.1+
CD3+ NK1.1+

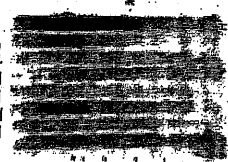


FIG. 10A

CD3+ NK1.1+
CD3+ NK1.1+
CD3+ NK1.1+
CD3+ NK1.1+
CD3+ NK1.1+



【図 12】

FIG. 12

CD4+	CD8+	CD4+CD8+	CD3+	NK1.1+	CD3+ NK1.1+
20.18	3.72	1.67	24.07	3.06	1.4
15.89	3.99	0.37	22.9	2.08	1.1
-4.29	0.27	-1.3	-1.17	-0.98	-0.3
差:					

CD4+	CD8+	CD4+CD8+	CD3+	NK1.1+	CD3+ NK1.1+
2.82	2.54	0.49	3.88	1.26	0.49
2.46	2.35	0.41	4.42	1.53	0.57
0.16	0.19	0.08	0.54	0.27	0.08
差:					

【図 11】

FIG. 11A

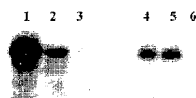
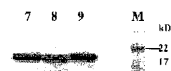
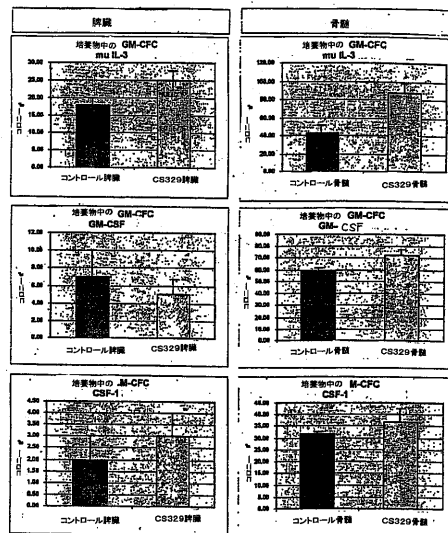


FIG. 11B



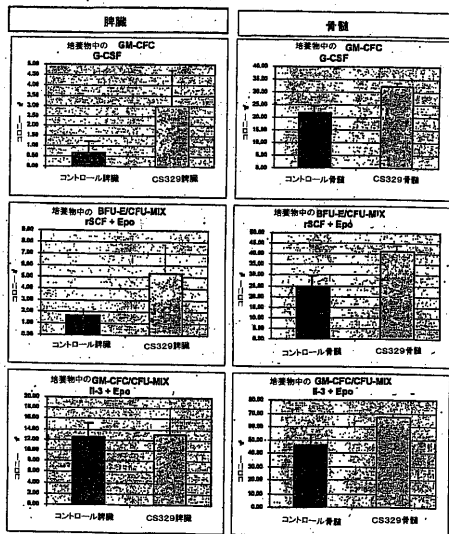
【図 13 A】

FIG. 13A



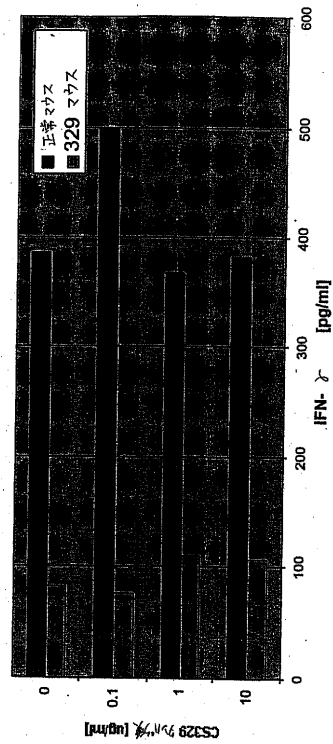
【図 13 B】

FIG. 13B



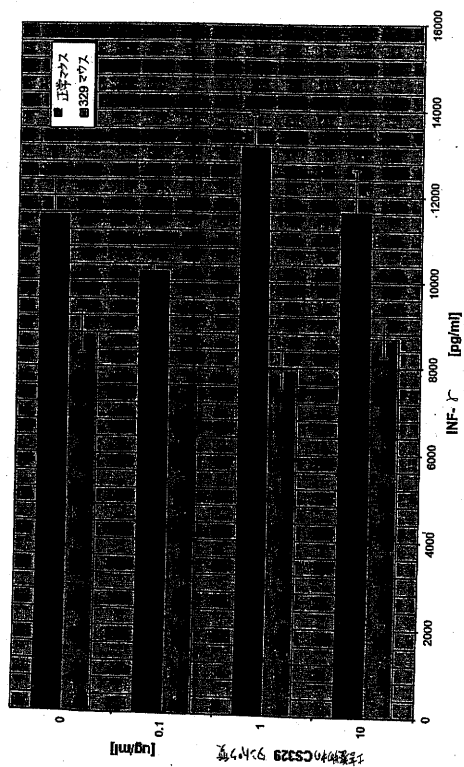
【図 14】

FIG. 14



【図 15】

FIG. 15



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	3/04	(2006.01)	A 6 1 P	3/04	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/02	
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	37/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/12	
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	A 6 1 P	37/00	
C 0 7 K	16/18	(2006.01)	C 0 7 K	14/47	
C 0 7 K	16/42	(2006.01)	C 0 7 K	16/18	
C 0 7 K	17/08	(2006.01)	C 0 7 K	16/42	
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	17/08	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	A
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	B
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
			G 0 1 N	33/53	D
			C 1 2 P	21/08	

(31)優先権主張番号 60/194,521

(32)優先日 平成12年4月4日(2000.4.4)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/195,910

(32)優先日 平成12年4月10日(2000.4.10)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 09/724,583

(32)優先日 平成12年11月28日(2000.11.28)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ジレス, ジェニファー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 3 2 0, ニューベリー パーク, シャルロット ストリート 3 0 3 1

(72)発明者 ム, シャロン エックス.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 3 6 2, サウザンド オークス, リッカー ドライブ 2 9 5 4

- (72)発明者 シア, ミン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 91320, ニューベリー パーク, カジェ プエナ ヴ
ィスタ 3946
- (72)発明者 バス, マイケル ブライアン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 91360, サウザンド オークス, エヌ. マリアン
アベニュー 1743
- (72)発明者 クラヴェイロ, ロジャー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 91360, サウザンド オークス, イースト ウィルバ
ー ロード 384, アパートメント 203

審査官 斎藤 真由美

(56)参考文献 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991年, Vol.88, p.5232-5236

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-90
C12N 1/00-5/28
C12P 21/00-08
C12Q 1/00-70
G01N 33/00-98
A61k 31/00-48/00
A61P 1/00-43/00
PubMed、MEDLINE(STN)
BIOSIS/WPI(DIALOG)
GenBank/DDBJ/EMBL/GeneSeq
SwissProt/PIR/GeneSeq

专利名称(译)	白细胞介素-1受体拮抗剂相关分子及其用途		
公开(公告)号	JP3842647B2	公开(公告)日	2006-11-08
申请号	JP2001543599	申请日	2000-12-04
[标]申请(专利权)人(译)	安姆根有限公司		
申请(专利权)人(译)	安进公司		
当前申请(专利权)人(译)	安进公司		
[标]发明人	サリスクリスティアーンエム ジレスジェニファー ムシャロンエックス シアミン バスマイケルブライアン クラヴェイロロジャー		
发明人	サリス, クリスティアーン エム. ジレス, ジェニファー ム, シャロン エックス. シア, ミン バス, マイケル ブライアン クラヴェイロ, ロジャー		
IPC分类号	C12N15/09 A01K67/027 A61K31/711 A61K39/39 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/16 A61P3/04 A61P3/10 A61P11/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P37/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/42 C07K17/08 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 C12P21/08 A61K38/00 A61K39/00 C07K14/54 C07K16/24		
CPC分类号	C07K14/54 A61K38/00 A61K39/00 A61K48/00 C07K16/244 C07K2319/00 C07K2319/30 C12N2799/021		
FI分类号	C12N15/00.A A01K67/027 A61K31/711 A61K39/39 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/16 A61P3/04 A61P3/10 A61P11/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P31/04 A61P31/12 A61P37/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/42 C07K17/08 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12N5/00.B C12P21/02.C C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12P21/08		
代理人(译)	夏木森下		
审查员(译)	斋藤真由美		
优先权	60/170191 1999-12-10 US 60/188053 2000-03-09 US 60/194521 2000-04-04 US 60/195910 2000-04-10 US 09/724583 2000-11-28 US		
其他公开文献	JP2003518371A		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

本发明提供了新的白介素-1受体拮抗剂相关 (IL-1ra-R) 多肽和编码该多肽的核酸分子。本发明还提供选择性结合剂，载体，宿主细胞和产生IL-1ra-R多肽的方法。本发明进一步提供了用于诊断，治疗，改善和/或预防与IL-1ra-R多肽有关的疾病，病症和病状的药物组合物和方法。本发明还包括含有编码IL-1ra-R多肽的核酸分子的转基因非人动物。

元の残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu	Norleucine, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 シニアミノ酸, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu