[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int.Cl[7]
C12N 15/24
C07K 14/54 C07K 16/24
C12Q 1/68 G01N 33/68

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 98809375.8

[43]公开日 2000年10月25日

[11]公开号 CN 1271387A

[22]申请日 1998.7.24 [21]申请号 98809375.8
[30]优先权
[32]1997.7.25 [33]US [31]08/900,905
[86]国际申请 PCT/US98/15423 1998.7.24
[87]国际公布 WO99/05280 英 1999.2.4
[85]进入国家阶段日期 2000.3.21
[71]申请人 先灵公司
地址 美国新泽西州
[72]发明人 J·F·巴赞
[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 谭明胜

权利要求书4页 说明书74页 附图页数0页

[54]发明名称 哺乳动物细胞因子:白介素-B30和相关试剂

[57]摘要

提供了编码哺乳动物细胞因子的纯化基因、与其相关的试剂,包括纯化的蛋白、特异性抗体和编码该分子的核酸。也提供了使用所述试剂的方法和诊断试剂盒。

ISSN1008-4274

权 利 要 求 书

1. 编码抗原多肽的分离的或重组的多核苷酸，包含:

a) SEQ ID NO: 2 的成熟编码部分的至少 17 个连续氨基酸;

b) SEQ ID NO: 4 的成熟编码部分的至少 17 个连续氨基酸;

c) SEQ ID NO: 5 的成熟编码部分的至少 17 个连续氨基酸。

2. 权利要求 1 的多核苷酸，编码以下成熟多肽:

a) SEQ ID NO: 2；或

b) SEQ ID NO: 4 。

3. 权利要求 1 的多核苷酸，它于 55 ℃、低于 500 mM 盐和 50% 甲酰胺下与以下编码部分杂交:

a) SEQ ID NO: 1 的编码部分；或

b) SEQ ID NO: 3 的编码部分。

4. 权利要求 3 的多核苷酸，包含:

a) SEQ ID NO: 1 的编码部分的至少 35 个连续核苷酸；或

b) SEQ ID NO: 3 的编码部分的至少 35 个连续核苷酸。

5. 包含权利要求 1 的多核苷酸的表达载体。

6. 含权利要求 5 的表达载体的宿主细胞，包括真核细胞。

7. 制备抗原多肽的方法，包括表达权利要求 1 的重组多核苷酸。

8. 检测权利要求 1 的多核苷酸的方法，包括使所述多核苷酸与一探针接触，所述探针在严格条件下与以下编码部分的至少 25 个连续核苷酸杂交:

a) SEQ ID NO: 1 的编码部分；或

b) SEQ ID NO: 3 的编码部分;

以形成双链体，其中所述双链体的检测显示存在所述多核苷酸。

9. 用于检测权利要求 1 的多核苷酸的试剂盒，包括含探针的区室，所述探针在严格条件下与权利要求 1 的多核苷酸的至少 17 个连续核苷酸杂交形成双链体。

10. 权利要求 9 的试剂盒，其中所述探针为可检测标记的。

11. 包含抗体结合位点的结合化合物，所述化合物与以下氨基酸特异性结合:

a) SEQ ID NO: 2 的至少 17 个连续氨基酸;

b) SEQ ID NO: 4 的至少 17 个连续氨基酸; 或

c) SEQ ID NO: 5 的至少 17 个连续氨基酸。

12. 权利要求 11 的结合化合物，其中:

a) 所述抗体结合位点为:

1) 与 SEQ ID NO: 2 的多肽特异性免疫反应;

2) 与 SEQ ID NO: 4 的多肽特异性免疫反应;

3) 与 SEQ ID NO: 5 的多肽特异性免疫反应;

4) 针对纯化或重组产生的人 IL-B30 蛋白而产生的;

5) 针对纯化或重组产生的小鼠 IL-B30 而产生的;

6) 在单克隆抗体、 Fab 或 F(ab)2 中;

或

b) 所述结合化合物为:

1) 抗体分子;

2) 多克隆抗血清;

3) 可检测标记的;

4) 无菌的; 或

5) 在缓冲组合物中。

13. 使用权利要求 11 的结合化合物的方法，包括使所述结合化合物与包含抗原的生物样品接触，其中所述接触导致形成结合化合物:抗原复合物。

14. 权利要求 13 的方法，其中所述生物样品来自人，并且其中所述结合化合物为抗体。

15. 检测试剂盒，包含权利要求 12 的所述结合化合物，和:

a) 使用所述结合化合物用于所述检测的说明材料; 或

b) 提供分隔所述结合化合物的区室。

16. 大致纯或分离的抗原多肽，它结合于权利要求 11 的所述结合组合物，并且还包含:

a) SEQ ID NO: 2 的至少 17 个连续氨基酸;

b) SEQ ID NO: 4 的至少 17 个连续氨基酸; 或

c) SEQ ID NO: 5 的至少 17 个连续氨基酸。

17. 权利要求 16 的多肽，它:

a) 包含至少一种来自灵长类 IL-B30 蛋白的至少 25 个连续氨基酸残基的片段;

b) 包含至少一种来自啮齿动物 IL-B30 蛋白的至少 25 个连续氨基酸残基的片段;

c) 为可溶性多肽;

d) 为可检测标记的;

e) 在无菌组合物中;

f) 在缓冲组合物中;

g) 结合于细胞表面受体;

h) 为重组产生的，或;

i) 具有天然存在的多肽序列。

18. 权利要求 17 的多肽，它:

a) 包含 SEQ ID NO: 2 的至少 17 个连续氨基酸;

b) 包含 SEQ ID NO: 4 的至少 17 个连续氨基酸; 或

c) 包含 SEQ ID NO: 5 的至少 17 个连续氨基酸。

19. 调节细胞或组织培养细胞生理或发育的方法，包括使所述细胞与哺乳动物 IL-B30 的激动剂或拮抗剂接触。

20. 权利要求 19 的方法，其中:

a) 所述接触为与 G-CSF 和/或 IL-6 的激动剂或拮抗剂联合接触; 或

b) 所述接触为与包括结合组合物的拮抗剂接触，所述结合组合

物包含特异性结合 IL-B30 的抗体结合位点。

说　明　书

哺乳动物细胞因子：白介素-B30 和相关试剂

发明领域

本发明涉及在控制哺乳动物细胞(例如哺乳动物免疫系统细胞)生物学和生理学中起作用的蛋白质相关的组合物。具体地说，提供纯化的基因、蛋白质、抗体和相关的有用试剂，例如用以调节各种细胞类型(包括造血细胞)的活化、发育、分化和功能。

发明背景

重组 DNA 技术一般是指这些技术，所述技术通过将来自供体源的遗传信息整合到载体中用于后续加工，诸如通过引入到宿主中，由此使所转移的遗传信息在该新环境中复制和/或表达。通常，该遗传信息以互补 DNA (cDNA)的形式存在，所述互补 DNA 衍生自编码所需蛋白产物的信使 RNA (mRNA)。该载体通常是一种质粒，该质粒具有将用于随后复制的 cDNA 加入宿主中的能力，在某些情况下，实际控制该 cDNA 的表达，并由此指导所编码的产物在该宿主中合成。

一段时间以来，已经知道哺乳动物的免疫应答基于称为“免疫网络”的一系列复杂的细胞相互作用。最近的研究已经提供了对该网络内部运作的新的了解。尽管已经清楚许多免疫应答实际上确实围绕淋巴细胞、巨噬细胞、粒细胞和其它细胞的网络样相互作用运转，但免疫学家现在一般坚持这样一种观点：称为淋巴因子、细胞因子或单核因子的可溶性蛋白，在控制这些细胞相互作用中起关键作用。因此，人们对细胞调节因子的分离、特征鉴定和作用机制相当感兴趣，对这些信息的了解将导致在许多医学异常(例如免疫系统失调)的诊断和治疗方面取得相当大的进展。这些因子中的某些因子是造血生长因子，例如粒细胞集落刺激因子(G-CSF)。参见例如 Thomson (1994 编辑) The

Cytokine Handbook (第 2 版) Academic Press, San Diego; Metcalf 和 Nicola (1995) The Hematopoietic Colony Stimulating Factors Cambridge University Press; 和 Aggarwal 和 Gutterman (1991) Human Cytokines Blackwell Pub .

淋巴因子显然以多种方式介导细胞活性。已经表明，它们支持多能造血干细胞的增殖、生长并分化为大量的祖细胞(progenitor)，所述祖细胞包括构成复杂的免疫系统的多样化的细胞谱系。细胞组分之间适当和平衡的相互作用是健康的免疫应答所必需的。当结合其它因子给予淋巴因子时，不同的细胞谱系常常以不同方式应答。

对免疫应答尤其重要的细胞谱系包括两类淋巴细胞： B 细胞，它们可以产生和分泌免疫球蛋白(具有识别并结合外源物质以实现将其去除的能力的蛋白)；和各种亚群的 T 细胞，它们分泌淋巴因子，并诱导或抑制 B 细胞和构成免疫网络的各种其它细胞(包括其它 T 细胞)。这些淋巴细胞与许多其它细胞类型相互作用。

另一种重要的细胞谱系是肥大细胞(在所有哺乳动物物种中尚未被明确鉴定)，这是一种含颗粒的结缔组织细胞，邻近遍布机体的毛细血管定位。发现这些细胞在肺、皮肤以及胃肠道和生殖泌尿道中的浓度尤其高。肥大细胞如下在变态反应相关的病症(特别是过敏反应)中起中心作用： 当选定的抗原与结合于肥大细胞表面上受体的一类免疫球蛋白交联时，该肥大细胞脱颗粒并释放引起变态反应(例如过敏反应)的介质，例如组胺、 5-羟色胺、肝素和前列腺素。

一般不能在体外维持免疫系统的细胞，这已经阻碍了为更好地了解和治疗各种免疫失调而进行的研究。免疫学家已经发现，通过使用 T 细胞和其它细胞的上清液，可以完成对这些细胞的培养，所述上清液含有各种生长因子，包括许多淋巴因子。

根据以上所述，可明显看出，新的淋巴因子(例如与 G-CSF 和/或 IL-6 相关的淋巴因子)的发现和研制，应该有助于用于范围广泛的直接或间接涉及免疫系统和/或造血细胞的退行性病症或异常病症的新疗

法。特别是，对于增加或增强已知淋巴因子有益活性的淋巴因子的发现和研制应该是非常有利。本发明提供新的白介素组合物和相关的化合物以及它们的使用方法。

发明概述

本发明涉及哺乳动物(例如啮齿动物、犬科动物、猫科动物、灵长类动物)的白介素-B30 (IL-B30)及其生物活性。它包括编码多肽本身的核酸和它们的生产和使用方法。根据与本文包含的所克隆的互补 DNA (cDNA)序列的同源性和/或应用于通常由这些核酸编码的多肽例如 G-CSF (参见 Nagata (1994)载于 Thomson The Cytokine Handbook 第 2 版, Academic Press, San Diego)和/或 IL-6 (参见 Hirano (1994)载于 Thomson The Cytokine Handbook 第 2 版, Academic Press, San Diego)的生长因子样活性或细胞因子样活性的功能测定，部分特征鉴定出本发明的核酸。提供调节或干扰依赖于生长因子的生理学或免疫应答的控制的方法。

本发明部分基于一种新细胞因子序列的发现，所述新细胞因子序列表现出与 G-CSF 和 IL-6 显著的序列和结构相似性。具体地说，它提供灵长类动物(例如人类)其编码的蛋白质成熟大小约 168 个氨基酸的基因以及猪和鼠类(例如小鼠)的序列。表现出显著序列同源性的功能相当物可得自其它哺乳动物，例如乳牛、马和大鼠以及非哺乳动物物种。

在各种蛋白质实施方案中，本发明提供：大致纯的或重组的 IL-B30 蛋白或肽，它在至少约 12 个氨基酸的长度内，表现出与 SEQ ID NO: 2 的序列同一性至少约 85%； SEQ ID NO: 2 的天然序列 IL-B30；和包含 IL-B30 序列的融合蛋白。在某些实施方案中，所述同源性为至少约 90%的同一性，而所述部分至少约 9 个氨基酸；所述同源性为至少约 80%的同一性，而所述部分至少约 17 个氨基酸；或所述同源性为至少约 70%的同一性，而所述部分至少约 25 个氨基酸。在其它实施方案

中，所述 IL-B30：包含表 1 的成熟序列；或表现出与天然 IL-B30 不同的翻译后修饰模式；或所述蛋白或肽：来自选自哺乳动物(包括灵长类动物)的温血动物：包含 SEQ ID NO: 2 的至少一个多肽区段；表现出多个部分表现出同一性；为 IL-B30 的天然等位基因变异体；其长度至少约 30 个氨基酸；表现出至少两个非重叠表位为哺乳动物 IL-B30 特异性的；在至少约 20 个氨基酸的长度内，表现出与哺乳动物 IL-B30 的序列同一性至少约 90%；为糖基化的；其天然糖基化的分子量至少约 10 kD；为合成多肽；连接至固体基质上；缀合于另一化学部分；为对天然序列进行 5 重或 5 重以下的置换；或为天然序列的缺失或插入变异体。优选实施方案包括的组合物包含：无菌 IL-B30 蛋白或肽；或所述 IL-B30 蛋白或肽和一种载体，其中所述载体为：水性化合物，包括水、盐水和/或缓冲液；和/或配制用于经口、直肠、鼻、局部或胃肠外给药。在融合蛋白实施方案中，所述蛋白可以具有：表 1 的成熟蛋白序列；一种检测或纯化标记，包括 FLAG、His6 或 Ig 序列；和/或另一细胞因子或趋化因子的序列。

试剂盒实施方案包括的试剂盒具有 IL-B30 蛋白或多肽，和：包含所述蛋白或多肽的区室；和/或使用或处理该试剂盒中试剂的说明。

在结合化合物实施方案中，所述化合物可以具有来自特异性地结合于天然 IL-B30 蛋白的抗体的抗原结合位点，其中：所述 IL-B30 为哺乳动物蛋白；所述结合化合物为 Fv、Fab 或 Fab2 片段；所述结合化合物与另一化学部分缀合；或所述抗体：针对表 1 成熟多肽的肽序列而产生；针对成熟的 IL-B30 而产生；针对纯化的啮齿动物 IL-B30 而产生；为免疫选择性的；为多克隆抗体；结合于变性的 IL-B30；表现出的 Kd 至少为 30 μM；连接至固体基质，包括珠粒或塑料膜；在无菌组合物中；或进行了可检测标记，包括放射性标记或荧光标记。含结合化合物的试剂盒包括具有以下物质的试剂盒：包含所述结合化合物的区室；和/或使用或处理该试剂盒中试剂的说明。该试剂盒通常能够进行定性或定量分析。优选的组合物包含：无菌结合化合物；或

所述结合化合物和一种载体，其中所述载体为：水性化合物，包括水、盐水和/或缓冲液；和/或配制用于经口、直肠、鼻、局部或胃肠外给药。

核酸的实施方案包括分离的或重组的核酸，它编码 IL-B30 蛋白或肽或融合蛋白，其中：所述 IL-B30 来自哺乳动物；和/或所述核酸：编码表 1 的抗原肽序列；编码多个表 1 的抗原肽序列；表现出与编码所述区段的天然 cDNA 的同一性至少约 80%；为一种表达载体；还包含一个复制起点；来自天然来源；包含一种可检测标记；包含合成的核苷酸序列；小于 6 kb，最好小于 3 kb；来自哺乳动物，包括灵长类；包含一种天然的全长编码序列；为编码所述 IL-B30 的基因的杂交探针；或为一种 PCR 引物、PCR 产物或诱变引物。本发明也提供包含这样一种重组核酸的细胞、组织或器官，而所述细胞最好是：原核细胞；真核细胞；细菌细胞；酵母细胞；昆虫细胞；哺乳动物细胞；小鼠细胞；灵长类细胞；或人细胞。

试剂盒实施方案包括的试剂盒具有这类核酸，和：包含所述核酸的区室；还包含所述 IL-B30 蛋白或多肽的区室；和/或使用或处理该试剂盒中试剂的说明。通常，该试剂盒能够进行定性或定量分析。

在某些实施方案中，所述核酸：在 30 ℃和低于 2M 盐、或 45 ℃和/或 500 mM 盐、或 55 ℃和/或 150 mM 盐的洗涤条件下，与 SEQ ID NO: 1 杂交；或表现与灵长类 IL-B30 的的同一性至少约 85%和/或所述一段序列至少约 30 个核苷酸，或表现至少约 90%的同一性和/或所述一段序列至少约 55 个核苷酸，或表现至少约 95%的同一性和/或所述一段序列至少约 75 个核苷酸。

本发明包括调节细胞或组织培养细胞生理学或发育的方法，该方法包括使所述细胞与哺乳动物 IL-B30 的激动剂或拮抗剂接触。所述方法为其中：所述接触为联合 G-CSG 和/或 IL-6 的激动剂或拮抗剂的接触；或所述接触为与拮抗剂的接触，所述拮抗剂包括结合组合物，所述组合物包含特异性结合 IL-B30 的抗体结合位点。

优选实施方案的详细描述

本文引用的所有参考文献均通过引用结合到本文中，其程度与具体和单独地表明每个单独的出版物或专利申请通过引用结合到本文中的程度一样。

I. 一般描述

本发明提供编码为细胞因子的各种哺乳动物蛋白的氨基酸序列和 DNA 序列，所述细胞因子例如为分泌分子，可以介导免疫细胞或其它细胞之间的信号。参见例如 Paul (1994) Fundamental Immunology (第 3 版) Raven Press, N.Y.。所述全长细胞因子和片段或拮抗剂可用于表达受体的细胞的生理学调节。对造血细胞，包括例如淋巴细胞，诸如 T 细胞、 B 细胞、天然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、树突细胞、造血祖细胞等， IL-B30 可能具有或者刺激效应或者抑制效应。所述蛋白也可用作抗原，例如免疫原，用于针对该蛋白上各种表位(线状表位和构象表位)产生抗体。

从人细胞系中鉴定出编码 IL-B30 的 cDNA。该分子命名为 huIL-B30 。也鉴定出相应于猪序列的相关基因。也描述了来自小鼠的啮齿动物序列。

所述人基因编码约 168 个氨基酸的小的可溶性细胞因子样蛋白。所述信号序列可能为约 21 个残基，可能从 Met 至约 Ala。参见表 1 和 SEQ ID NO: 1 和 2。 IL-B30 表现出长链细胞因子成员特征性的结构基元。比较例如可得自 GenBank 的 IL-B30 、 G-CSF 和 IL-6 的序列。也参见表 2。

表 1：编码灵长类(例如人) IL-B30 的核酸(SEQ ID NO: 1). 翻译的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 2。

```
ATG CTG GGG AGC AGA GCT GTA ATG CTG CTG TTG CTG CTG CCC TGG ACA
48
Met Leu Gly Ser Arg Ala Val Met Leu Leu Leu Leu Pro Trp Thr
-21 -20                 -15                 -10

GCT CAG GGC AGA GCT GTG CCT GGG GGC AGC AGC CCT GCC TGG ACT CAG
96
Ala Gln Gly Arg Ala Val Pro Gly Gly Ser Ser Pro Ala Trp Thr Gln
 -5                   1               5                  10

TGC CAG CAG CTT TCA CAG AAG CTC TGC ACA CTG GCC TGG AGT GCA CAT
144
Cys Gln Gln Leu Ser Gln Lys Leu Cys Thr Leu Ala Trp Ser Ala His
              15                  20                  25

CCA CTA GTG GGA CAC ATG GAT CTA AGA GAA GAG GGA GAT GAA GAG ACT
192
Pro Leu Val Gly His Met Asp Leu Arg Glu Glu Gly Asp Glu Glu Thr
         30                  35                  40

ACA AAT GAT GTT CCC CAT ATC CAG TGT GGA GAT GGC TGT GAC CCC CAA
240
Thr Asn Asp Val Pro His Ile Gln Cys Gly Asp Gly Cys Asp Pro Gln
     45                  50                  55

GGA CTC AGG GAC AAC AGT CAG TTC TGC TTG CAA AGG ATC CAC CAG GGT
288
Gly Leu Arg Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile His Gln Gly
 60                  65                  70                  75

CTG ATT TTT TAT GAG AAG CTG CTA GGA TCG GAT ATT TTC ACA GGG GAG
336
Leu Ile Phe Tyr Glu Lys Leu Leu Gly Ser Asp Ile Phe Thr Gly Glu
                 80                  85                  90

CCT TCT CTG CTC CCT GAT AGC CCT GTG GCG CAG CTT CAT GCC TCC CTA
384
Pro Ser Leu Leu Pro Asp Ser Pro Val Ala Gln Leu His Ala Ser Leu
             95                  100                 105

CTG GGC CTC AGC CAA CTC CTG CAG CCT GAG GGT CAC CAC TGG GAG ACT
432
Leu Gly Leu Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Gly His His Trp Glu Thr
         110                 115                 120

CAG CAG ATT CCA AGC CTC AGT CCC AGC CAG CCA TGG CAG CGT CTC CTT
480
Gln Gln Ile Pro Ser Leu Ser Pro Ser Gln Pro Trp Gln Arg Leu Leu
     125                 130                 135
```

```
CTC CGC TTC AAA ATC CTT CGC AGC CTC CAG GCC TTT GTG GCT GTA GCC
528
Leu Arg Phe Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Val Ala Val Ala
140                 145                 150                 155

GCC CGG GTC TTT GCC CAT GGA GCA GCA ACC CTG AGT CCC TAA
570
Ala Arg Val Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Ser Pro
                160                 165
```

编码序列:

```
ATGCTGGGGA GCAGAGCTGT AATGCTGCTG TTGCTGCTGC CCTGGACAGC
TCAGGGCAGA GCTGTGCCTG GGGGCAGCAG CCCTGCCTGG ACTCAGTGCC
AGCAGCTTTC ACAGAAGCTC TGCACACTGG CCTGGAGTGC ACATCCACTA
GTGGGACACA TGGATCTAAG AGAAGAGGGA GATGAAGAGA CTACAAATGA
TGTTCCCCAT ATCCAGTGTG GAGATGGCTG TGACCCCCAA GGACTCAGGG
ACAACAGTCA GTTCTGCTTG CAAAGGATCC ACCAGGGTCT GATTTTTTAT
GAGAAGCTGC TAGGATCGGA TATTTTCACA GGGGAGCCTT CTCTGCTCCC
TGATAGCCCT GTGGCGCAGC TTCATGCCTC CCTACTGGGC CTCAGCCAAC
TCCTGCAGCC TGAGGGTCAC CACTGGGAGA CTCAGCAGAT TCCAAGCCTC
AGTCCCAGCC AGCCATGGCA GCGTCTCCTT CTCCGCTTCA AAATCCTTCG
CAGCCTCCAG GCCTTTGTGG CTGTAGCCGC CCGGGTCTTT GCCCATGGAG
CAGCAACCCT GAGTCCCTAA
```

啮齿动物，例如小鼠 IL-B30 (SEQ ID NO: 3 和 4)

```
CGCTTAGAAG TCGGACTACA GAGTTAGACT CAGAACCAAA GGAGGTGGAT AGGGGGTCCA      60

CAGGCCTGGT GCAGATCACA GAGCCAGCCA GATCTGAGAA GCAGGGAACA AG ATG         115
                                                           Met
                                                           -21

CTG GAT TGC AGA GCA GTA ATA ATG CTA TGG CTG TTG CCC TGG GTC ACT       163
Leu Asp Cys Arg Ala Val Ile Met Leu Trp Leu Leu Pro Trp Val Thr
-20                 -15                 -10                  -5

CAG GGC CTG GCT GTG CCT AGG AGT AGC AGT CCT GAC TGG GCT CAG TGC       211
Gln Gly Leu Ala Val Pro Arg Ser Ser Ser Pro Asp Trp Ala Gln Cys
                 1               5                  10

CAG CAG CTC TCT CGG AAT CTC TGC ATG CTA GCC TGG AAC GCA CAT GCA       259
Gln Gln Leu Ser Arg Asn Leu Cys Met Leu Ala Trp Asn Ala His Ala
        15                  20                  25

CCA GCG GGA CAT ATG AAT CTA CTA AGA GAA GAA GAG GAT GAA GAG ACT       307
Pro Ala Gly His Met Asn Leu Leu Arg Glu Glu Glu Asp Glu Glu Thr
     30                  35                  40

AAA AAT AAT GTG CCC CGT ATC CAG TGT GAA GAT GGT TGT GAC CCA CAA       355
Lys Asn Asn Val Pro Arg Ile Gln Cys Glu Asp Gly Cys Asp Pro Gln
 45                  50                  55                  60

GGA CTC AAG GAC AAC AGC CAG TTC TGC TTG CAA AGG ATC CGC CAA GGT       403
Gly Leu Lys Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile Arg Gln Gly
                 65                  70                  75

CTG GCT TTT TAT AAG CAC CTG CTT GAC TCT GAC ATC TTC AAA GGG GAG       451
Leu Ala Phe Tyr Lys His Leu Leu Asp Ser Asp Ile Phe Lys Gly Glu
             80                  85                  90
```

```
CCT GCT CTA CTC CCT GAT AGC CCC ATG GAG CAA CTT CAC ACC TCC CTA        499
Pro Ala Leu Leu Pro Asp Ser Pro Met Glu Gln Leu His Thr Ser Leu
         95                  100                 105

CTA GGA CTC AGC CAA CTC CTC CAG CCA GAG GAT CAC CCC CGG GAG ACC        547
Leu Gly Leu Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Asp His Pro Arg Glu Thr
    110                 115                 120

CAA CAG ATG CCC AGC CTG AGT TCT AGT CAG CAG TGG CAG CGC CCC CTT        595
Gln Gln Met Pro Ser Leu Ser Ser Ser Gln Gln Trp Gln Arg Pro Leu
125                 130                 135                 140

CTC CGT TCC AAG ATC CTT CGA AGC CTC CAG GCC TTT TTG GCC ATA GCT        643
Leu Arg Ser Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Leu Ala Ile Ala
                145                 150                 155

GCC CGG GTC TTT GCC CAC GGA GCA GCA ACT CTG ACT GAG CCC TTA GTG        691
Ala Arg Val Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Thr Glu Pro Leu Val
            160                 165                 170

CCA ACA GCT TAAGGATGCC CAGGTTCCCA TGGCTACCAT GATAAGACTA                740
Pro Thr Ala
        175

ATCTATCAGC CCAGACATCT ACCAGTTAAT TAACCCATTA GGACTTGTGC TGTTCTTGTT      800

TCGTTTGTTT TGCGTGAAGG GCAAGGACAC CATTATTAAA GAGAAAAGAA ACAAACCCCA      860

GAGCAGGCAG CTGGCTAGAG AAAGGAGCTG GAGAAGAAGA ATAAAGTCTC GAGCCCTTGG      920

CCTTGGAAGC GGGCAAGCAG CTGCGTGGCC TGAGGGGAAG GGGGCGGTGG CATCGAGAAA      980

CTGTGAGAAA ACCCAGAGCA TCAGAAAAAG TGAGCCCAGG CTTTGGCCAT TATCTGTAAG     1040

AAAAACAAGA AAAGGGGAAC ATTATACTTT CCTGGGTGGC TCAGGGAAAT GTGCAGATGC     1100

ACAGTACTCC AGACAGCAGC TCTGTACCTG CCTGCTCTGT CCCTCAGTTC TAACAGAATC     1160

TAGTCACTAA GAACTAACAG GACTACCAAT ACGAACTGAC AAA                       1203
```

表 2：与 IL-B30 相比的各种 IL-6 和 G-CSF 实施方案的比较。人 IL-B30 为 SEQ ID NO: 2；小鼠 IL-B30 为 SEQ ID NO: 4；猪 IL-B30 为 SEQ ID NO: 5；牛 G-CSF 为 SEQ ID NO: 6；猫 G-CSF 为 SEQ ID NO: 7；人 G-CSF 为 SEQ ID NO: 8；小鼠 G-CSF 为 SEQ ID NO: 9；水獭 IL-6 为 SEQ ID NO: 10；猫 IL-6 为 SEQ ID NO: 11；人 IL-6 为 SEQ ID NO: 12；绵羊 IL-6 为 SEQ ID NO: 13；小鼠 IL-6 为 SEQ ID NO: 14；鸡 MGF 为 SEQ ID NO: 15；而 KSHV (卡波西肉瘤疱疹病毒)的病毒 IL-6 为 SEQ ID NO: 16。

```
il30_人       .......... ......VPGG SSPVWTQCQQ LSQKLCT.LA WSAHPLVG..
il30_小鼠     .......... ......VPRS SSPDWAQCQQ LSRNLCM.LA WNAHAPAG..
  il30_猪     .......... .......... .......... .......... ..........
gcsf_牛       ......TPLG P.......AR SLPQSFLLKC LEQVRKIQAD GAELQERL..
gcsf_猫       ......TPLG P.......TS SLPQSFLLKC LEQVRKVQAD GTALQERL..
gcsf_人       ......TPLG P.......AS SLPQSFLLKC LEQVRKIQGD GAALQEKLVS
gcsf_小鼠     VPLVTVSALP P.......SL PLPRSFLLKS LEQVRKIQAS GSVLLEQL..
 il6_水獭     .AFPTPGPLG GDSKDDATSN RPPLTSADKM EDFIKFILGK ISALRNEM..
 il6_猫       .AFPTPGPLG G....DATSN RLPLTPADKM EELIKYILGK ISALKKEM..
 il6_人       .AFPAPVPPG EDSKDVAAPH RQPLTSSERI DKQIRYILDG ISALRKET..
 il6_绵羊     .AFPTPGPLG EDFKNDTTPS RLLLTTPEKT EALIKHIVDK ISAIRKEI..
 il6_小鼠     .AFPTSQVRR GDFTEDTTPN R.PVYTTSQV GGLITHVLWE IVEMRKEL..
 mgf_鸡       .......... .APLAELSGD HDFQLFLHKN LEFTRKIRGD VAALQRAV..
  il6_khsv    .......... .......TRG KLPDAPEFEK DLLIQRLNWM LWVIDECFRD

il30_人       .HMD.LREEG DEETTNDVPH I...QCGDGC DPQGLRDNSQ FCLQRIHQGL
il30_小鼠     .HMNLLREEE DEETKNNVPR I...QCEDGC DPQGLKDNSQ FCLQRIRQGL
  il30_猪     .......... .......... .......... .......... SCLQRIHQGL
gcsf_牛       .CAA.HKLCH PEELMLLRHS LGIP.QAPLS SCSSQSLQLR GCLNQLHGGL
gcsf_猫       .CAA.HKLCH PEELVLLGHA LGIP.QAPLS SCSSQALQLT GCLRQLHSGL
gcsf_人       ECAT.YKLCH PEELVLLGHS LGIP.WAPLS SCPSQALQLA GCLSQLHSGL
gcsf_小鼠     .CAT.YKLCH PEELVLLGHS LGIP.KASLS GCSSQALQQT QCLSQLHSGL
 il6_水獭     .CDK.YNKCE DSKEVLAENN LNLPKLAEKD RCFQSRFNQE TCLTRITTGL
 il6_猫       .CDN.YNKCE DSKEALAENN LNLPKLAEKD GCFQSGFNQE TCLTRITTGL
 il6_人       .CNK.SNMCE SSKEALAENN LNLPKMAEKD GCFQSGFNEE TCLVKIITGL
 il6_绵羊     .CEK.NDECE NSKETLAENK LKLPKMEEKD GCFQSGFNQA ICLIKTTAGL
 il6_小鼠     .CNG.NSDCM NNDDALAENN LKLPEIQRND GCYQTGYNQE ICLLKISSGL
 mgf_鸡       .CDT.FQLCT EEELQLVQPD PHLV.QAPLD QCHKRGFQAE VCFTQIRAGL
  il6_khsv    LCYR.TGICK GILEPAAIFH LKLPAINDTD HCGLIGFNET SCLKKLADGF

il30_人       IFYEKLLGSD IFTGE..... .PSLLPDSPV AQLHASLLGL SQLLQPE..G
il30_小鼠     AFYKHLLDSD IFKGE..... .PALLPDSPM EQLHTSLLGL SQLLQPE..D
  il30_猪     VFYEKLLGSD IFTGE..... .PSLHPDGSV GQLHASLLGL RQLLQPE..G
gcsf_牛       FLYQGLLQAL AGIS..... .PELAPTLDT LQLDVTDFAT NIWLQMEDLG
gcsf_猫       FLYQGLLQAL AGIS..... .PELAPTLDM LQLDITDFAI NIWQQMEDVG
gcsf_人       FLYQGLLQAL EGIS..... .PELGPTLDT LQLDVADFAT TIWQQMEELG
gcsf_小鼠     CLYQGLLQAL SGIS..... .PALAPTLDL LQLDVANFAT TIWQQMENLG
 il6_水獭     QEFQIHLKYL ESNYEG...N KDNAHSVYIS TKHLLQTLRP M..NQIEVTT
 il6_猫       QEFQIYLKFL QDKYEG...D KENAKSVYTS TNVLLQMLKR KGKNQDEVTI
 il6_人       LEFEVYLEYL QNRFES...S EEQARAVQMS TKVLIQFLQK KAKNLDAITT
 il6_绵羊     LEYQIYLDFL QNEFEG...N QETVMELQSS IRTLIQILKE KIAGL....I
 il6_小鼠     LEYHSYLEYM KNNLKDN..K KDKARVLQRD TETLIHIFNQ EVKDLHKIVL
 mgf_鸡       HAYHDSLGAV LRLLP..... ..NHTTLVET LQLDAANLSS NIQQQMEDLG
  il6_khsv    FEFEVLFKFL TTEFGKSVIN VDVMELLTKT LGWDIQEELN KLTKTHY..S
```

表 2 (接上页)

il30_人	HHWETQQIP.	.SLSPSQ..P	WQRLLLRFKI	LRSLQAFVAV	AARVFAHGAA
il30_小鼠	HPRETQQMP.	.SLSSSQ..Q	WQRPLLRSKI	LRSLQAFLAI	AARVFAHGAA
il30_猪	HHWETEQTP.	.SPSPSQ..P	WQRLLLRLKI	LRSLQAFVAV	AARVFAHGAA
gcsf_牛	AAPAVQPTQ.	.GAMPTFTSA	FQRRAGGVLV	ASQLHRFLEL	AYRGLRYLAE
gcsf_猫	MAPAVPPTQ.	.GTMPTFTSA	FQRRAGGTLV	ASNLQSFLEV	AYRALRHFTK
gcsf_人	MAPALQPTQ.	.GAMPAFASA	FQRRAGGVLV	ASHLQSFLEV	SYRVLRHLAQ
gcsf_小鼠	VAPTVQPTQ.	.SAMPAFTSA	FQRRAGGVLA	ISYLQGFLET	ARLALHHLA.
il6_水貂	PDPTTDASL.	.QALFKSQDK	WLKHTTIHLI	LRRLEDFLQF	SLRAIRIM..
il6_猫	PVPTVEVGL.	.QLSCSHR.R	VAEAHNNHLT	LRRLEDFLQL	RLRAVRIM..
il6_人	PDPTTNASL.	.LTKLQAQNQ	WLQDMTTHLI	LRSFKEFLQS	SLRALRQM..
il6_绵羊	TTPATHTDM.	.LEKMQSSNE	WVKNAKVIII	LRSLENFLQF	SLRAIRMK..
il6_小鼠	PTPISNALL.	.TDKLESQKE	WLRTKTIQFI	LKSLEEFLKV	TLRSTRQT..
mgf_鸡	LDTVTLPAEQ	RSPPPTFSGP	FQQQVGGFFI	LANFQRFLET	AYRALRHLAR
il6_khsv	P.PKFDRG..	LLGRLQGLKY	WVRHFASFYV	LSAMEKFAGQ	AVRVLDSIPD

il30_人	TLSP....
il30_小鼠	TLTEPLVPTA
il30_猪	TLSQ....
gcsf_牛	P.....
gcsf_猫	P.....
gcsf_人	P.....
gcsf_小鼠	.....
il6_水貂	.....
il6_猫	.....
il6_人	.....
il6_绵羊	.....
il6_小鼠	.....
mgf_鸡	L.....
il6_khsv	VTPDVHDK

IL-B30 与相关细胞因子蛋白的结构同源性提示该分子相关的功能。IL-B30 是一种表现出与 IL-6 和 G-CSF 序列相似性的长链细胞因子。

IL-B30 的激动剂或拮抗剂也可以起功能拮抗剂或受体拮抗剂的作用，例如，它们阻断 IL-6 或 G-CSF 与其相应受体的结合，或阻断 IL-6 或 G-CSF 介导相反的作用。因此，IL-B30 或其拮抗剂可以用于治疗异常的医学病症，包括免疫失调，例如 T 细胞免疫缺陷、慢性炎症或组织排斥，或心血管病症或神经生理学病症。

所述天然抗原能够介导导致靶细胞中生物学反应或生理学反应的各种生化反应。本文特征鉴定的优选实施方案来自人类，但实际上存在其它灵长类或其它物种的天然相应物。例如灵长类、犬科动物、猫科动物和啮齿动物的其它哺乳动物物种中蛋白的其它序列也可以利

用。参见下文。下文的说明的典型目的是涉及人 IL-B30，但同样可应用于来自其它物种的相关实施方案。

II. 纯化的 IL-B30

人 IL-B30 的氨基酸序列作为一个实施方案示于 SEQ ID NO: 2 中。采用所提供的序列，可以用例如 PCR 技术或杂交的标准方法，分离其它天然存在的编码该蛋白的核酸。在提供所述细胞因子的序列信息以便于鉴别该蛋白抗原与其它蛋白并例举多种变异体方面，这些从氨基至羧基提供的氨基酸序列是重要的。此外，所述肽序列使得可以制备肽，以产生识别这类区段的抗体，核苷酸序列使得可以制备寡核苷酸探针，这两种都是检测或分离例如克隆编码这种序列的基因的策略。

当用于蛋白质方面时，本文所用的术语“人可溶性 IL-B30”将包括其氨基酸序列相应于 SEQ ID NO: 2 中所示可溶性多肽的蛋白质、或其有效片段(significant fragment)。优选实施方案包括限定长度的大量不同的(例如非重叠)区段。通常，大多数为至少 2 个、更通常为至少 3 个、优选至少 5 个、7 个或更多个氨基酸。尽管提供了最小的长度，但更长的各种大小的长度可以也是合适的，例如一个 7 个氨基酸长度的区段和两个 12 个氨基酸长度的区段。

例如抗体的结合组分通常以高亲和性结合于 IL-B30，所述高亲和性例如至少约 100 nM，通常优于约 30 nM，优选优于约 10 nM，更优选优于约 3 nM。在非人类的哺乳动物物种(例如其它灵长类、有蹄类动物或啮齿动物)中会发现相应蛋白(counterpart protein)。例如鸟类或两栖类的非哺乳动物物种也应该具有结构上或功能上相关的基因和蛋白。

本文所用的术语“多肽”包括有效片段或区段，包括一段至少约 8 个氨基酸的氨基酸残基，一般至少约 12 个氨基酸，通常至少约 16 个氨基酸，优选至少约 20 个氨基酸，在特别优选的实施方案中，为至

少约 30 个或 30 个以上的氨基酸，例如 35、40、45、50 个氨基酸等。在所有实际的组合中，这类片段可以具有实际上在所有位置开始和/或结束的末端，例如于残基 1、2、3 等开始，和于例如残基 150、149、148 等结束。特别感兴趣的肽具有相应于结构域边界的末端，例如螺旋 A、B、C 和/或 D。参见表 1。

术语“结合组合物”是例如在抗体-抗原相互作用中特异性地与 IL-B30 结合的分子。特异性的范围可以更宽或更窄，例如对特定实施方案特异性，或对数组相关实施方案特异性，例如对灵长类、啮齿动物特异性等。它也包括例如蛋白质的化合物，所述化合物特异性地与 IL-B30 结合，包括在天然的生理学相关蛋白-蛋白相互作用中或者共价结合或者非共价结合。所述分子可以是聚合物或化学试剂。功能类似物可以是具有结构修饰的蛋白质，或它可以是具有与所述合适结合决定簇相互作用的分子形状的分子。所述化合物可以用作受体结合相互作用的激动剂或拮抗剂，参见例如 Goodman 等(编辑) Goodman & Gilman's: The Parmacological Bases of Therapeutics (当前版) Pergamon Press。

例如在蛋白质方面，大致纯通常是指该蛋白没有其它污染蛋白、核酸或由所述原始来源生物衍生的其它生物物质。可以用标准方法，通常通过重量分析纯度，纯度通常为至少约 40%，一般至少约 50%，常常至少约 60%，通常至少约 80%，优选至少约 90%，在最优选实施方案中，纯度至少约 95%。通常加入载体或赋形剂。

多肽或片段的溶解性取决于环境和所述多肽。许多参数影响多肽的溶解性，包括温度、电解质环境、所述多肽的大小和分子特征以及所述溶剂的性质。通常，使用所述多肽的温度范围为约 4 ℃至约 65 ℃。使用时的温度常常高于约 18 ℃。对于诊断目的，所述温度通常约为室温或更高的温度，但低于该测定中组分的变性温度。对于治疗目的，所述温度常常为体温，对于人和小鼠而言通常为约 37 ℃，尽管在某些情况下，在原位或体外下所述温度可以升高或降低。

所述多肽的大小和结构应该一般为大致稳定状态，通常不是变性状态。在四级结构中所述多肽可以与其它多肽结合，例如以赋予溶解性，或与脂质或去污剂结合。

所述溶剂和电解质通常为用于保存生物活性的类型的生物相容的缓冲液，通常接近生理水性溶剂。所述溶剂常常具有中性 pH，通常为约 5 和 10 之间，最好为约 7.5。在某些情况下，加入一种或多种去污剂，通常为温和的非变性去污剂，例如 CHS (胆固醇半柠檬酸酯(cholesteryl hemisuccinate))或 CHAPS (3-[3-胆酰氨基丙基)二甲氨基]-1-丙烷磺酸酯(3-[3-cholamidoprophyl)dimethylammonio]-1-propane sulfonate))，或去污剂的浓度足够低，以避免显著破坏所述蛋白的结构或生理特性。在其它情况下，可以使用强去污剂实现显著变性。

III. 天然变异体

本发明也包括与所述 IL-B30 抗原的氨基酸序列具有大致氨基酸序列同一性的蛋白或肽。所述变异体包括物种变异体、多态或等位基因变异体。

通过使残基匹配最优化，必要时，根据需要引入间隙，确定氨基酸序列的同源性或序列同一性。也参见 Needleham 等 (1970) J. Mol. Biol. 48:443-453; Sankoff 等, (1983) Time Warps, String Edits, and Macromolecules: The Theory and Practice of Sequence Comparsion 的第 1 章, Addison-Wesley, Reading, MA; 和 IntelliGenetics (Mountain View, CA)的软件包; 和 the University of Wisconsin Genetics Computer Group (Madison, WI)的软件包。当将保守取代考虑为匹配时，序列同一性会有变化。保守取代通常包括以下组内的取代：甘氨酸、丙氨酸；缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸；天冬氨酸、谷氨酸；天冬酰胺、谷氨酰胺；丝氨酸、苏氨酸；赖氨酸、精氨酸；和苯丙氨酸、酪氨酸。保守性可以应用于生物学特征、功能特征或结构特征。同源的氨基酸序列通常计划包括蛋白质序列中的天然多态或等位基因变异和种间变异。典型

的同源蛋白或肽与所述 IL-B30 的氨基酸序列的同一性将从 25-100%(如果可以引入间隙)至 50-100%(如果包括保守取代)。同一性测量结果将至少为大约 35%，一般至少为大约 40%，常常至少为大约 50%，典型的至少为大约 60%，通常至少为大约 70%，优选至少为大约 80%，而更优选至少为大约 90%。

通过核苷酸置换、核苷酸缺失、核苷酸插入和短的核苷酸序列倒位，可以容易地修饰分离的 IL-B30 DNA。这些修饰产生编码这些抗原、其衍生物或具有相似生理、免疫原性、抗原性或其它功能活性的蛋白质的新的 DNA 序列。这些修饰的序列可以用来产生突变抗原，或增强表达。增强的表达可以包括基因扩增、转录增加、翻译增加和其它机制。“突变 IL-B30”包括这样的多肽，它们在其它方面属于以上提出的 IL-B30 的序列同一性定义内，但其氨基酸序列无论由于缺失、置换，还是由于插入，均不同于自然界中发现的 IL-B30 的氨基酸序列。这通常包括与具有 SEQ ID NO: 2 序列的蛋白质具有显著同一性、并且与那些序列享有不同的生物活性(例如抗原性或免疫原性)的蛋白，在优选实施方案中，包含天然的全长所公开的序列的大部分。通常最好使用全长序列，尽管也可以使用截短的变体，同样，通常最需要从天然来源发现的基因或蛋白。相似的概念适用于不同的 IL-B30 蛋白，特别是在各种温血动物(例如哺乳动物和鸟类)中发现的那些 IL-B30 蛋白。这些描述一般是指包括所有的 IL-B30 蛋白，但不限于具体讨论的特定的灵长类实施方案。

也可以通过制备氨基酸插入或缺失，进行 IL-B30 诱变。可以产生置换、缺失、插入或任何组合，以得到最终的构成物。插入包括氨基或羧基末端融合。可以于靶密码子进行随机诱变，然后对所表达的突变体筛选所需活性。于序列已知的 DNA 预定位点制备置换突变的方法是本领域众所周知，例如通过 M13 引物诱变或聚合酶链式反应(PCR)技术。参见例如 Sambrook 等(1989); Ausubel 等(1987 和增补本); 和 Kunkel 等(1987) Methods in Enzymol. 154: 367-382。优选实施方案包括

例如 1 重、2 重、3 重、5 重、7 重置换等，最好于核苷酸水平或氨基酸水平的保守置换。所述置换最好远离保守的半胱氨酸，通常在远离螺旋结构域的区域中。这种变异体可以用来产生特异性抗体，通常享有许多或所有生物学特性。

本发明也提供重组蛋白，例如采用这些蛋白区段的异源融合蛋白。异源融合蛋白是天然情况下通常不以同一方式融合的蛋白或区段的融合体。相似的概念适用于异源核酸序列。

另外，可以组合源自其它蛋白的相似的功能域而制备新的构成物。例如，靶结合区段或其它区段可以在不同的新融合多肽或片段之间“交换”。参见例如 Cunningham 等(1989) Science 243:1330-1336; 和 O'Dowd 等(1988) J. Biol. Chem. 263:15985-15992 。

由 Beaucage 和 Carruthers (1981) Tetra. Letts. 22: 1895-1862 描述的亚磷酰胺法将产生合适的合成 DNA 片段。或者通过合成互补链并使所述链在合适的条件下相互退火，或者通过用 DNA 聚合酶与合适的引物序列，加入互补链(例如 PCR 技术)，通常可获得双链片段。

在对细胞因子 IL-6 家族的比较中，可以对该基因应用结构分析。该家族包括例如 IL-6、IL-11、IL-12、G-CSF、LIF、OSM、CNTF 和 Ob 。人、猪和小鼠 IL-B30 序列与 IL-6 家族其它成员的序列对比应该使得能够定义结构特性。特别是，可以用例如 RASMOL 程序确定β-折叠和α-螺旋残基，参见 Bazan 等(1996) Nature 379:591; Lodi 等(1994) Science 263:1762-1766; Sayle 和 Milner-White (1995) TIBS 20:374-376; 和 Gronenberg 等(1991) Protein Engineering 4:263-269 。用于置换的优选残基包括预期与受体相互作用的表面暴露的残基。应该保留功能的其它残基将进行保守置换，特别是对于远离表面暴露残基的位置。

IV. 功能变异体

由于竞争性抑制所述配体与其受体的结合，可以导致阻断对 IL-B30 的生理反应。

本发明的体外测定通常使用分离的蛋白、包含这些蛋白受体结合区段的可溶性片段、或连接至固相基质的片段。这些测定也将使得可以对或者结合区段突变和修饰、或者细胞因子突变和修饰(例如 IL-B30 类似物)的效应进行诊断测定。

本发明也设想使用竞争性药物筛选测定，例如其中抗所述细胞因子抗体或受体结合片段与测试化合物竞争。

IL-B30 抗原的“衍生物”包括天然存在形式的氨基酸序列突变体、糖基化变异体、与其它化学部分的共价或聚集缀合物。例如通过采用标准方法将官能团(functionality)交联至 IL-B30 氨基酸侧链或于 N 末端或 C 末端发现的基团上，可以制备共价衍生物。参见例如 Lundblad 和 Noyes (1988) Chemical Reagents for Protein Modification, 第 1-2 卷, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL; Hugli (1989 编辑) Techniques in Protein Chemistry , Academic Press, San Diego, CA; 和 Wong (1991) Chemistry of Protein Conjugation and Cross Linking, CRC Press, Boca Raton, FL 。

具体地说，糖基化改变包括例如通过在多肽合成和加工期间、或在进一步加工步骤中修饰多肽糖基化模式制备的糖基化改变。参见例如 Elbein (1987) Ann. Rev. Biochem. 56:497-534 。也包括具有相同一级氨基酸序列、具有其它微小修饰的肽变异体，所述微小修饰包括磷酸化氨基酸残基，例如磷酸酪氨酸、磷酸丝氨酸或磷酸苏氨酸。

也提供 IL-B30 和其它同源或异源蛋白之间的融合多肽。许多细胞因子受体或其它表面蛋白是多体的，例如同二体实体，重复构成物可能具有各种优点，包括减轻对蛋白水解切割的敏感性。典型的实例是受体多肽(例如荧光素酶)与蛋白区段或结构域(例如受体结合区段)的融合体，使得可以容易地确定所述融合配体的存在或位置。参见例如 Dull 等的美国专利第 4,859,609 号。其它基因融合伴侣包括细菌β-半乳糖苷酶、 trpE 、蛋白 A 、β-内酰胺酶、α淀粉酶、乙醇脱氢酶、酵母α交配因子和检测或纯化标记，诸如 His6 序列的 FLAG 序列。参见例如 Godowski 等(1988) Science 241:812-816 。

融合肽通常通过或者重组核酸法或通过合成多肽法制备。用于核酸操作和表达的技术一般描述于例如 Sambrook 等(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第 2 版), 第 1-3 卷, Cold Spring Harbor Laboratory; 和 Ausubel 等(1993 编辑) Current Protocols in Molecular Biology, Greene and Wiley, NY。用于多肽合成的技术描述于 Merrifield (1963) J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-2156; Merrifield (1986) Science 232: 341-347; Atherton 等(1989) Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford; 和 Grant (1992) Synthetic Peptides: A User's Guide, W.H. Freeman, NY。可以将重折叠方法应用于合成蛋白。

本发明也设想使用非氨基酸序列改变或糖基化改变的 IL-B30 衍生物。这类衍生物可以包括与化学部分或蛋白载体的共价或聚集缀合物。共价或聚集衍生物可用作免疫原、免疫测定中的试剂，或用于诸如亲和纯化结合伴侣(例如其它抗原)的纯化方法中。通过用本领域熟知的方法将IL-B30共价结合于诸如溴化氰活化的SEPHAROSE的固相支持体，或通过或不通过戊二醛交联吸附至聚烯烃表面上，可以将 IL-B30 固定化，以用于纯化抗 IL-B30 抗体或替代结合组合物的测定或纯化。所述 IL-B30 蛋白也可以用可检测基团标记，例如用于诊断测定。通过固定化抗体或互补结合伴侣，例如受体的结合部分，可以实现 IL-B30 的纯化。

本发明的溶解的 IL-B30 或片段可以用作免疫原，用于产生抗血清或结合特异性抗体。纯化的抗原可以用来筛选单克隆抗体或抗原结合片段，包括天然抗体的抗原结合片段，例如 Fab、Fab'、$F(ab)_2$ 等。纯化的 IL-B30 抗原也可以用作试剂，以检测对存在水平提高的所述细胞因子应答而产生的抗体，所述细胞因子可以是异常或特定的生理学病症或疾病病症是诊断指标(diagnostic)。本发明考虑了针对 SEQ ID NO: 1 所示核苷酸序列编码的氨基酸序列而产生的抗体。特别是，本发明考虑了对特定结构域(例如螺旋 A、B、C 或 D)具有结合亲和性

的抗体或针对特定结构域产生的抗体。

本发明考虑了另外的密切相关物种变异体的分离。DNA 印迹分析和 RNA 印迹分析将确立相似的遗传实体存在于其它哺乳动物中。可能 IL-B30 广布于物种变异体中，其中所述物种例如为啮齿动物、兔形目动物、食肉动物、偶蹄类、奇蹄类和灵长类。

本发明也提供分离一组相关抗原的方法，其中所述相关抗体在结果、表达和功能方面表现出不同和相似性。所述分子的另外不同物种或多态变异体的分离，将大大促进所述分子生理效应的阐明。特别是，本发明提供用于鉴别不同物种中另外的同源遗传实体的有用探针。

所述分离的基因将使得可以转化缺乏 IL-B30 表达的细胞，例如缺乏相应蛋白并表现出阴性背景活性的或者物种类型或者细胞。这应该使得可以与未转化对照细胞相比分析 IL-B30 的功能。

采用现代分子生物学标准技术，特别是比较相关类别的成员时，解剖影响通过这些抗原介导的各种生理功能的关键结果元件是可能的。参见例如在 Cunningham 等(1989) Science 243:1339-1336 中描述的同系物扫描诱变技术；和 O'Dowd 等(1988) J. Biol. Chem. 263:15985-15992 和 Lechleiter 等(1990) EMBO J. 9:4381-4390 中所用的方法。

胞内功能可以涉及受体发送信号。然而，蛋白内化可以发生在某些情况下，可能发生胞内组分和细胞因子之间的相互作用。通过诱变或直接生化方法(例如交联或亲和法)，可以鉴别 IL-B30 与互作组分相互作用的特定区段。也可应用采用晶体学方法或其它物理方法的结构分析。信号转导机制的进一步研究，将包括可以通过亲和法或遗传方法(例如互补分析突变体)分离的结合组分的研究。

我们将继续 IL-B30 表达和控制的进一步研究。与抗原结合的控制元件应该表现出不同的生理、发育、组织特异性或其它表达模式。对例如控制元件的遗传区上游或下游很感兴趣。

所述 IL-B30 抗原的结构研究将导致设计新的抗原，特别是对该分子表现出激动剂或拮抗剂特性的类似物。这可以与先前描述的筛选方

法结合，以分离表现出所需活性范围的抗原。

V. 抗体

可以产生针对其天然存在形式和为其重组形式的所述 IL-B30 蛋白不同表位的抗体，包括物种、多态或等位基因变异体和它们的片段。另外，可以针对或者活性形式或者无活性形式的 IL-B30 产生抗体，所述 IL-B30 包括天然或变性形式。也考虑了抗独特型抗体。

通过用所述抗原预定片段与免疫原性蛋白的缀合物免疫动物，可以产生针对所述片段的抗体，包括结合片段和单链形式的抗体。从分泌所需抗体的细胞制备单克隆抗体。这些抗体可以根据与正常或缺陷的 IL-B30 的结合进行筛选，或根据例如通过受体介导的激动剂或拮抗剂活性进行筛选。例如由于抗体立体阻断与受体的结合，抗体可以是激动剂或拮抗剂。这些单克隆抗体通常以至少约 1 mM 的 K_D 结合，其结合 K_D 更通常至少约 300 μM，典型的至少约 100 μM，更典型至少约 30 μM，优选至少约 10 μM，更优选至少约 3 μM 或更好。

本发明的抗体也可用于诊断应用。作为捕获抗体或非中和抗体，可以筛选其结合所述抗原的能力，而不抑制与受体的结合。作为中和抗体，它们可以用于竞争性结合测定。它们也可用于检测或定量测定 IL-B30 蛋白或其受体。参见例如 Chan (1987 编辑) Immunology: A Practical Guide, Academic Press, Orlando, FL; Price 和 Newman (1991 编辑) Priciples and Practice of Immunoassay, Stockton Press, N. Y.; 和 Ngo (1988 编辑) Nonisotopic Immunoassay, Plenum Press, N. Y.。交叉吸收或其它试验将鉴别表现出不同特异性范围(例如特有的或共享的物种特异性)的抗体。

此外，包括抗原结合片段的本发明抗体可能是有效的拮抗剂，它们结合于抗原，并抑制与可能引发生物学反应的受体的功能结合。它们也可以用作非中和抗体，可以偶联至毒素或放射性核素，使得当所述抗体结合于抗原时，将杀伤例如在其表面表达该抗体的细胞。此外，

这些抗体可以或者直接或者借助接头间接缀合于药物或其它治疗剂，可以实现药物导向。

抗原片段可以连接至其它物质上，特别是连接至多肽，作为待用作免疫原的融合或共价连接多肽。抗原及其片段可以融合或共价连接至多种免疫原，诸如匙孔蜈血蓝蛋白、牛血清白蛋白、破伤风类毒素等。关于制备多克隆抗体的方法的描述，参见 Microbiology, Hoeber Medical Division, Harper 和 Row, 1969; Landsteiner (1962) Specificity of Serological Reactions, Dover Publications, New York; Williams 等(1967) Methods in Immunology and Immunochemistry, 第 1 卷, Academic Press, New York; 和 Harlow 和 Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press, NY .

在某些情况下，最好从各种哺乳动物宿主制备单克隆抗体，所述哺乳动物宿主诸如小鼠、啮齿动物、灵长类、人类等。在例如 Stites 等(编辑) Basic and Clinicl Immunology, (第 4 版), Lange Medical Publications, Los Altos, CA 和其中引用的参考文献; Harlow 和 Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press; Goding (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (第 2 版), Academic Press, New York 中; 和特别是在 Kohler 和 Milstein (1975) Nature 256:495-497 中(该文献讨论了产生单克隆抗体的一种方法)，可以找到制备这类单克隆抗体的技术的描述。

其它合适的技术涉及将淋巴细胞体外暴露于抗原多肽，或者暴露于噬菌体或相似载体中抗体文库的选择。参见 Huse 等(1989) “在噬菌体λ 中产生免疫球蛋白所有组成组分的大联合文库”, Science 246:1275-1281; 和 Ward 等(1989) Nature 341:544-456 . 本发明的多肽和抗体可以修饰或不修饰而使用，包括嵌合抗体或人源化抗体。通常通过或者共价或者非共价连接提供可检测信号的物质，标记所述多肽或抗体。种类繁多的标记和缀合技术是已知的，并且在科学文献和专利文献中进行了广泛的报道。合适的标记包括放射性核素、酶、底物、

辅因子、抑制剂、荧光部分、化学发光部分、磁性颗粒等。指出这类标记用途的专利包括美国专利第 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,227,437; 4,275, 149; 和 4,366,241 号。也可以产生重组免疫球蛋白，参见 Cabilly 的美国专利第 4,816,567 号; Moore 等的美国专利第 4,642,334 号; 和 Queen 等(1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033 。

本发明的抗体也可以用于分离所述蛋白的亲和层析。当将所述抗体连接至固相支持体时，可以制备柱子。参见例如 Wilchek 等(1984) Meth. Enzymol. 104:3-55 。

针对每种 IL-B30 产生的抗体也可以用来产生抗独特型抗体。这些抗体可用于检测或诊断与所述相应抗原表达相关的各种免疫学病症。

VI. 核酸

所述肽序列和相关试剂可用于例如从天然来源检测、分离或鉴别编码 IL-B30 的 DNA 克隆。通常，这可用于从哺乳动物分离基因，相似的方法将用于分离来自其它物种的基因，所述其它物种例如温血动物，诸如鸟类和哺乳动物。交叉杂交将使得可以从相同的例如多肽变异体或其它物种分离 IL-B30 。许多不同方法可用来成功地分离合适的核酸克隆。

纯化的蛋白或特定肽可用于通过标准方法产生抗体，如上所述。可以将合成肽或纯化蛋白提呈给免疫系统，以产生单克隆或多克隆抗体。参见例如 Coligan (1991) Current Protocols in Immunology Wiley/Greene; 和 Harlow 和 Lane (1989) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press 。

例如，所述特异性结合组合物可以用来筛选由表达 IL-B30 的细胞系制备的表达文库。可以通过各种染色或免疫荧光方法，进行胞内表达的筛选。结合组合物可以用来亲和纯化或分选出表达表面融合蛋白的细胞。

所述肽区段也可以用来预测合适的寡核苷酸，以筛选文库。可以用所述遗传密码筛选可用作筛选探针的合适的寡核苷酸。参见例如SEQ ID NO: 1。与聚合酶链式反应(PCR)技术结合，合成寡核苷酸将可用于从文库选择正确的克隆。互补序列也可以用作探针、引物或反义链。例如与锚定载体或poly-A互补PCR技术或与其它肽的互补DNA偶联的各种片段应该是特别有用的。

本发明考虑了使用分离的 DNA 或片段，以编码相应的生物活性IL-B30 多肽，特别是缺乏编码所述序列非翻译 5'部分的部分。另外，本发明包括编码生物活性蛋白或多肽、并且能够在合适条件下与本文所述 DNA 序列杂交的分离或重组 DNA。所述生物活性蛋白或多肽可以是完整的抗原或片段，具有公开于例如 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列，特别是成熟的分泌多肽。此外，本发明包括其编码的蛋白表现出与分泌 IL-B30 具有高度同一性的分离的或重组的 DNA 或其片段的应用。所述分离的 DNA 可以在 5'侧翼和 3'侧翼具有相应的调节序列，例如启动子、增强子、 poly-A 添加信号和其它序列。或者，通过将编码区段操作性连接至异源启动子，例如通过将启动子插入内源基因上游，可以实现表达。

"分离的"核酸是与天然天然序列伴随的其它组分(例如核糖体、聚合酶/或来自起源生物的侧翼基因组序列)大致分离的核酸，例如 RNA 、 DNA 或混合聚合物。该术语包括已经从其天然存在的环境中取出的核酸序列，包括重组的或克隆的 DNA 分离物和化学合成的类似物或通过异源系统生物合成的类似物。大致纯的分子包括分离形式的所述分子。一般而言，所述核酸位于小于约 50 kb 的载体或片段中，所述载体或片段常常小于约 30 kb，通常小于约 10 kb，最好小于约 6 kb。

分离的核酸一般是分子的同种组合物，但在某些实施方案中，将含有少量异质性。这种异质性通常发现于所述聚合物末端或对于所需生物功能或活性不重要的部分。

"重组的"核酸根据或者其生产方法或者其结构定义。对于其生产方法，例如用使用重组核酸技术的方法生产的产物，所述重组技术例如涉及在所述核苷酸序列中人的干涉，通常为选择或生产。或者，它可以是用以下方法制备的核酸：产生包含天然相互不相邻的两种片段的融合体的序列，但是指排除天然产物，例如天然存在的突变体。因此，例如，包括用任何非天然存在的载体转化细胞而制备的产物，也包括包含用任何合成寡核苷酸方法所衍生序列的核酸。通常进行这样一种方法，以用编码同一种氨基酸或保守的氨基酸的丰余密码子取代一个密码子，同时通常引入或去除一个序列识别位点。

或者，进行该方法，以将所需功能的核酸区段连接在一起，以产生包括所需功能组合的单一的遗传实体，其中所述功能组合是未在通常可得到的天然形式中发现的组合。限制性酶的识别位点常常是这类人工操作的靶，但可以通过设计，加入其它位点特异性靶，例如启动子、DNA 复制位点、调节序列、控制序列或其它有用的特征。相似的概念将用于重组(例如融合)多肽。具体包括：合成的核酸，它由于遗传密码的丰余性而编码与这些抗原片段相似的多肽；和来自各种不同物种或多肽变异体的序列的融合体。

在核酸方面，有效"片段"是一连续的区段，它至少为大约 17 个核苷酸，一般至少为约 22 个核苷酸，常常至少为约 29 个核苷酸，更通常至少约 35 个核苷酸，典型至少为约 41 个核苷酸，通常至少为约 47 个核苷酸，更优选至少为约 55 个核苷酸，在特别优选的实施方案中，将至少为约 60 个或更多个核苷酸，例如 67、73、81、89、95 个等。

编码 IL-B30 蛋白的核酸将特别用来鉴定编码相关或相似蛋白的基因、mRNA 和 cDNA 种类，以及鉴定编码来自不同物种的同源蛋白的 DNA。在其它物种中有同系物，所述其它物种包括灵长类、啮齿动物、犬科动物、猫科动物和鸟类。各种 IL-B30 蛋白应该是同源的，包括于本文中。然而，如果这些序列的同源性足够大，则在合适条件下

采用这些序列，甚至可以容易地分离与所述抗原进化关系更遥远的蛋白。对灵长类 IL-B30 蛋白特别感兴趣。

得自基因组序列(例如含有内含子)的重组克隆，将可用于转基因研究，包括例如转基因细胞和生物，也可以用于基因治疗。参见例如 Goodnow (1992) "转基因动物"， Roitt (编辑) Encyclopedia of Immunology, Academic Press, San Diego, 第 1502-1504 页; Travis (1992) Science 256:1392-1394; Kuhn 等(1991) Science 254:707-710; Capecchi (1989) Science 244:1288; Robertson (1987) (编辑) Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, IRL Press, Oxford; 和 Rosenberg (1992) J. Clinical Oncology 10:180-199 .

在核酸序列比较方面，大致同源性例如同一性是指当对比时，或者所述区段或者其互补链，在插入或缺失合适的核苷酸进行最佳对比时，至少大约50%的核苷酸相同，相同的核苷酸一般至少为约58%，经常至少为约65%，常常至少为约71%，典型至少为约77%，通常至少为大约85%，优选至少为大约95%至98%或更多，而在特定实施方案中，高达大约99%或更多的核苷酸相同。另一方面，当所述区段在选择性杂交条件下与一条链或其互补链杂交时，存在着大致同源性，一般使用IL-B30的序列，例如SEQ ID NO: 1中的序列。通常，当在一段至少大约30个核苷酸的序列中有至少大约55%同一性时，将发生选择性杂交，优选在约25个核苷酸的序列中同一性至少为大约75%，最优选在约20个核苷酸中同一性至少为大约90%。参见Kanehisa (1984) Nuc. Acids Res. 12:203-213。所述的同源性比较的长度如上所述，可以为更长的序列，在某些实施方案中为一段至少为大约17个核苷酸的序列，一般至少为大约28个核苷酸，通常至少为大约40个核苷酸，优选至少为大约75-100个或更多的核苷酸。

关于杂交方面的同源性，严格条件将是通常在杂交反应中控制的盐、温度、有机溶剂和其它参数的严格性的组合条件。严格性温度条件通常包括超过大约30℃的温度，通常为超过大约37℃的温度，典型

的为超过大约55℃的温度，优选为超过大约70℃的温度。严格性的盐条件一般低于大约1000 mM，通常低于大约400 mM，典型的低于大约250 mM，优选低于大约150 mM，包括约100、50或甚至20 mM。然而，参数的组合比任何单个参数的测量值更为重要。参见例如，Wetmur和Davidson (1968) J. Mol. Biol. 31:349-370。严格条件下的杂交得到的背景应该是背景的至少2倍，最好至少3-5倍或更高。

对于序列比较，通常一个序列用作参比序列，将测试序列与其比较。当使用一种序列比较算法时，将测试序列和参比序列输入计算机，必要时指定亚序列坐标，并且指定序列运算规则程序的参数。然后，该序列比较算法根据指定的程序参数，计算测试序列相对于参比序列的序列同一性百分率。

可以用如下进行用于比较的序列的光学序列对比(optical alignment)：例如用 Smith 和 Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482 的局部同源性算法、用 Needleman 和 Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443 的同源性序列对比算法、通过Pearson和Lipman (1988) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:2444 的相似性方法的检索、通过计算机实现这些算法(Wisconsin Genetics软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI)、或通过目测检查(一般参见 Ausubel 等，见上文)。

有用的算法的一个实例是 PILEUP 。 PILEUP 采用渐进的成对序列对比，产生来自一组相关序列的一个多重序列对比，以显示关系和序列同一性的百分率。它也绘出一个树(tree)或枝叉图(dendrogram)，显示用来产生所述序列对比的成簇关系。 PILEUP 采用 Feng 和 Doolittle (1987) J. Mol. Evol. 35:351-360 的渐进序列对比法的简化方法。所用的方法类似于 Higgins 和 Sharp (1989) CABIOS 5: 151-153 描述的方法。该程序可以对多达 300 个序列进行序列对比，每个序列的最大长度为5,000 个核苷酸或氨基酸。多重序列对比法以两个最相似的序列的成对序列对比开始，产生一组(a cluster of)两个对比的序列。然后将该组与

下一个最相关的序列或下一组对比的序列进行序列对比。通过简单地延伸两个单独序列的成对序列对比，将两组序列进行序列对比。通过一系列渐进的成对序列对比，得到最后的序列对比。通过指定序列比较区的特定序列及其氨基酸或核苷酸坐标，并且指定该程序的参数，运行该程序。例如，可以将参比序列与其它测试序列比较，以采用以下参数测定序列同一性关系的百分率：默认间隙加权值(3.00)、默认间隙长度加权值(0.10)和加权的末端间隙。

适用于测定序列同一性和序列相似性百分率的算法的另一实例是BLAST算法，在Altschul等(1990) J. Mol. Biol. 215:403-410中有描述。公众可从国家生物技术信息中心(http:www.ncbi.nlm.nih.gov/)得到进行BLAST分析的软件。该算法包括首先通过在查询序列中鉴别长度为W的短字(short words)，而鉴别高计分序列对(HSP)，当与一数据库序列中相同长度的字进行序列对比时，它们或者匹配或者满足某些阳性值的阈值计分T。T称为相邻字计分阈值(Altschul等，见上文)。这些起始的相邻字命中(word hit)用作种子，起始搜寻以寻找含所述字命中的较长的HSP。然后，只要可以增加累积的序列对比计分，则所述字命中在两个方向上沿每个序列延伸。在以下情况下，每个方向上所述字命中的延伸停止：由于来自其最大得到的数值的数量X，累积的序列对比计分下降；由于一个或多个负计分的残基序列对比的累积，累积计分转为零或零以下；或达到两个序列之一的末端。BLAST算法的参数W、T和X决定该序列对比的灵敏度和速度。BLAST程序使用时，默认字长(W)为11，BLOSUM62计分矩阵(参见Henikoff和Henikoff (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:10915)序列对比(B)为50，期望值(E)为10，M=5，N=4，并且比较两条链。

除计算序列同一性百分率外，BLAST算法也进行两个序列之间相似性的统计学分析(参见例如Karlin和Altschul (1993) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90:5873-5787)。BLAST算法提供的相似性的一种测量是最小和概率(P(N))，这提供偶然发生两个核苷酸序列或氨基酸序列之

间匹配概率的指标。例如，如果在测试核酸与参比核酸的比较中，最小和概率低于大约 0.1，更优选低于大约 0.01，最优选低于大约 0.001 时，认为该核酸与参比序列相似。

两个多肽的核酸序列大致相同的再一指标是：第一种核酸编码的多肽与第二种核酸编码的多肽免疫交叉反应，如以下所述。因此，例如在一种多肽与第二种多肽仅由于保守取代而不同时，这两种多肽通常大致相同。两个核酸序列大致相同的另一指标是：所述两种分子在严格条件下相互杂交，如下所述。

通过密切相关物种的交叉物种杂交，可以克隆并分离来自其它哺乳动物的 IL-B30。在远缘物种之间的同源性可能相对低，因此最好是相对密切相关的物种的杂交。或者，表现出物种同源性较低的抗体制备物的制备，可用于表达克隆方法。

VII. 制备 IL-B30；模拟物

通过化学合成、筛选 cDNA 文库或筛选由种类繁多的细胞系或组织样品制备的基因组文库，可以获得编码所述 IL-B30 或其片段的 DNA。参见例如 Okayama 和 Berg (1982) Mol. Cell. Biol. 2:161-170; Gubler 和 Hoffman (1983) Gene 25:263-269; 和 Glover (1984 编辑) DNA Cloning: A Practical Approach, IRL Press, Oxford。或者，本文提供的序列提供有用的 PCR 引物，或使得可以化学或其它制备编码 IL-B30 的合适基因；包括天然存在的实施方案。

该 DNA 可以在种类繁多的宿主细胞中表达，用于合成全长 IL-B30 或片段，所述全长 IL-B30 或片段进而可以例如用来产生多克隆或单克隆抗体；用于结合研究；用于构建和表达修饰的分子；和用于结构/功能研究。

本文所用的载体包括质粒、病毒、噬菌体、整合型 DNA 片段和能够将 DNA 片段整合入宿主基因组中的其它载体。参见例如 Pouwels 等(1985 和增补本) Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y.;

和 Rodriguez 等(1988) (编辑) Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Buttersworth, Boston, MA .

对于本发明的目的，当 DNA 序列功能上相互相关时，将它们操作性连接。例如，如果 DNA 作为前蛋白表达或参与将所述多肽导向细胞膜或指导分泌所述多肽，则将前序列(presequence)或分泌前导序列的 DNA 操作性连接至所述多肽。如果启动子控制所述多肽的转录，则将该启动子操作性连接至编码序列；如果将核糖体结合位点定位以允许翻译，则将核糖体结合位点操作性连接至编码序列。通常，操作性连接是指邻近的并且在读框内，然而，诸如阻抑物基因的某些遗传元件不是邻近连接的，但仍结合于操纵基因序列，进而控制表达。参见例如 Rodrguez 等，第 10 章，第 205-236 页；Balbas 和 Bolivar (1990) Methods in Enzymology 185:14-37；和 Ausubel 等(1993) Current Protocols in Molecular Biology, Greene and Wiley, NY .

合适表达载体的代表性实例包括 pCDNA1；pCD，参见 Okayama 等(1985) Mol. Cell Biol. 5:1136-1142；pMC1neo Poly-A，参见 Thomas 等(1987) Cell 51:503-512；和杆状病毒载体，诸如 pAC 373 或 pAC 610 . 参见例如 Miller (1988) Ann. Rev. Microbiol. 42:177-199 .

通常最好在提供特定或限定糖基化模式的系统中表达 IL-B30 多肽。参见例如 Luckow 和 Summers (1988) Bio/Technology 6:47-55；和 Kaufman (1990) Meth. Enzymol. 185:487-511 .

可以对所述 IL-B30 或其片段进行工程改造为连接于细胞膜的磷脂酰肌醇(PI)，但可以通过用磷脂酰肌醇切割酶(例如磷脂酰肌醇磷脂酶 C)处理从细胞膜去除。这释放生物活性形式的所述抗原，使得可以用蛋白化学的标准方法进行纯化。参见例如 Low (1989) Biochim. Biophys. Acta 988:427-454；Tse 等(1985) Science 230:1003-1008；和 Brunner 等(1991) J. Cell Biol. 114:1275-1283 .

既然已经特征鉴定出所述 IL-B30，而可以通过合成肽的常规方法制备其片段或衍生物。这些包括诸如在以下文献中描述的方法：

Stewart 和 Young (1984) Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, IL; Bodanszky 和 Bodanszky (1984) The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, New York; Bodanszky (1984) The Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, New York; 和 Villafranca (1991 编辑) Techniques in Protein Chemistry II, Academic Press, San Diego, Ca .

VIII. 用途

本发明提供供例如 IL-B30 介导的病症或以下在诊断试剂盒描述的本文其它方面描述的诊断应用之用的试剂。所述基因可以用于司法科学，例如以辨别啮齿动物与人类，或用作辨别表现出差异表达或修饰模式的不同细胞的标记。

本发明也提供具有显著经济潜力和/或治疗潜力的试剂。所述 IL-B30 (天然存在的或重组的)或其片段及其抗体与鉴定为对 IL-B30 具有结合亲和性的化合物，应该可用作教授分子生物学、免疫学或生理学技术的试剂。例如在实践实验室练习、生产或使用蛋白质、抗体、克隆方法、组织学等方面，可以用所述试剂制备合适试剂盒。

所述试剂也可以用于治疗与异常生理或发育(包括炎症病症)相关的病症。它们可以用于体外测试可能与特定治疗策略的成功相关的互作组分的存在或不存在。特别是，采用本文提供的组合物，通过合适的治疗方法将得到各种例如造血细胞或淋巴细胞生理的调节。参见例如 Thomson (1994 编辑) The Cytokine handbook (第 2 版) Academic Press, San Diego; Metcalf 和 Nicola (1995) The Hematopoietic Colony Stimulating Factors Cambridge University Press; 和 Aggarwal 和 Gutterman (1991) Human Cytokines Blackwell Pub..

例如，与异常表达 IL-B30 或 IL-B30 异常信号相关的疾病或病症，应该是激动剂或拮抗剂的可能靶。所述新细胞因子应该在例如淋巴细胞的造血细胞调节或发育中起作用，影响免疫应答，例如炎症和/或自身免疫失调。或者，它可能影响血管生理学或发育或神经元作用。

特别是，所述细胞因子应该在不同方面介导所述细胞的细胞因子合成、增殖等。IL-B30 的拮抗剂，诸如天然存在形式的 IL-B30 的突变蛋白变异体或阻断抗体，可以提供一种选择性和有效的方法，以在诸如炎性或自身免疫反应的情况下阻断免疫应答。也参见 Samter 等(编辑) Immunological Diseases 第 1 和 2 卷, Little, Brown and Co..

另外，某些联合组合物可能例如与其它炎症调节剂一起使用。这类其它分子可以包括类固醇、IL-6 和/或 G-CSF 的其它变体(包括物种变异体)或病毒同系物以及它们各自的拮抗剂。

在通过 RNA 印迹分析表现出产生 IL-B30 mRNA 的每种细胞类型中，各种异常病症是已知的。参见 Berkow (编辑) The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Merck & Co., Rahway, N.J.; Thorn 等, Harrison's Principles of Internal Medicine, McGraw-Hill, N.Y.; 和 Weatherall 等(编辑) Oxford Textbook of Medicine, Oxford University Press, Oxford。许多其它医学病症和疾病涉及被巨噬细胞和单核细胞活化，许多这些病症和疾病对用本文提供的激动剂或拮抗剂的治疗有反应。参见例如 Stites 和 Terr (1991 编辑) Basic and Clinical Immunology Appleton 和 Lange, 挪威, Connecticut; 和 Samter 等(编辑) Immnological Diseases Little, Brown and Co.。这些医学难题应该易于采用本文提供的组合物预防或治疗。胰岛定位提示可能与糖尿病相关。

可以纯化 IL-B30、拮抗剂、抗体等，然后将其给予兽医患者或人类患者。例如在常规药学上可接受的载体或稀释剂(例如免疫原性佐剂)中，可以将这些试剂联合另外的活性或惰性组分以及生理上无毒的稳定剂、赋形剂或防腐剂，用于治疗用途。可以将这些组合物过滤除菌，将这些组合物通过在剂量管制瓶中冻干或贮存于稳定化水性制剂中，以剂量形式放置。本发明也设想了包括非补体结合形式在内的抗体及其结合片段的用途。

可以进行用 IL-B30 及其片段的药物筛选，以鉴别对 IL-B30 具有结合亲和性或对 IL-B30 功能具有其它相关生物学效应的化合物，包括

相关组分的分离。然后，可以利用后续的生物测定，确定所述化合物是否具有内在刺激活性，并且是否由此因为阻断所述细胞因子活性而为阻断剂或拮抗剂。同样，具有内在刺激活性的化合物，可以激活所述信号途径，并由此因为它刺激 IL-B30 活性而为激动剂。本发明还设想了 IL-B30 的阻断抗体作为拮抗剂的治疗用途和刺激性抗体作为激动剂的治疗用途。该方法应该对于其它 IL-B30 物种的变异体特别有用。

有效治疗所需的试剂量将取决于许多不同因素，包括给药方法、靶部位、所述患者的生理状况和其它给予的药物。因此，应该确定治疗剂量，以优化安全性和效力。通常，体外所用的剂量可以在原位给予这些试剂的用量方面提供有用的指南。治疗特定病症的有效量的动物测试将提供进一步的人类剂量的预测性指标。例如在 Gilman 等(1990 编辑) Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 第 8 版, Pergamon Press; 和 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 17 版, (1990), Mack Publishing Co., Easton, Penn 中，描述了各种考虑。其中以及下文讨论了给药方法，例如经口、静脉内、腹膜内或肌内给药、透皮扩散和其它给药方法。药学上可接受的载体将包括水、盐水、缓冲液和例如在 Merck Index, Merck & Co., Rahway, New Jersey 中描述的其它化合物。通常预计具有合适载体的剂量范围为低于 1 mM 浓度的量，通常低于约 10 μM 浓度，常常低于约 100 μM，优选低于约 10 pM (皮摩尔浓度)，最优选低于约 1 fM (费摩尔浓度)。慢释制剂或慢释装置通常用于持续或长期给药。参见例如 Langer (1990) Science 249:1527-1533 。

IL-B30 、其片段、其抗体或抗体片段、拮抗剂和激动剂，可以直接给予待治疗宿主，或根据所述化合物的大小，可能最好在给予它们之前，将它们缀合于诸如卵清蛋白或血清白蛋白的载体蛋白。治疗制剂可以以许多常规剂量制剂给予。尽管可能单独给予所述活性组分，但最好将其作为药用制剂给予。制剂通常包含至少一种以上定义的活性组分与其一种或多种可接受的载体。在与其它组分相容并且对所述

患者无害的意义上，每种载体应该是药学上和生理上可接受的。制剂包括适用于经口、直肠、鼻、局部或胃肠外(包括皮下、肌内、静脉内和皮内)给药的制剂。所述制剂可以方便地以单位剂型给予，并且可以用药学领域熟知的方法制备。参见例如 Gilman 等(1990 编辑) Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 第 8 版, Pergamon Press; 和 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 17 版, (1990), Mack Publishing Co., Easton, Penn.; Avis 等(1993 编辑) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Dekker, New York; Lieberman 等(1990 编辑) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Dekker, New York; 和 Lieberman 等(1990 编辑) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Dekker, New York . 本发明的疗法可以与其它药剂联合，或结合其它药剂使用，其它药物诸如其它细胞因子，包括 IL-6 或 G-CSF 或其相应的拮抗剂。

天然存在形式或重组形式的本发明 IL-B30 均特别可用于能够筛选对所述蛋白有结合活性的化合物的试剂盒和测定方法。最近数年已经开发了几种自动测定方法，以便使得可以在短时间内筛选数万种化合物。参见例如 Fodor 等(1991) Science 251:767-773，该文献描述了用于在固相支持体上合成的多种限定聚合物结合亲和性的测试方法。如本发明提供的大量纯化、可溶性 IL-B30 的可得性，可以大大促进合适测定的开发。

其它方法可以用来确定 IL-B30-IL-B30 受体相互作用中的关键残基。可以进行突变分析，例如参见 Somoza 等(1993) J. Exptl. Med. 178:549-558，以确定所述相互作用和/或发送信号中关键的具体残基。PHD (Rost 和 Sander (1994) Proteins 19:55-72)和 DSC (King 和 Sternberg (1996) Protein Sci. 5:2298-2310)可以提供α-螺旋(H)、β-链(E)或卷曲螺旋(coil) (L)的二级结构预测。螺旋 A 和 D 是受体相互作用中最重要的，同时螺旋 D 是更为重要的区域。螺旋 A 在人类中可能从约 pro(7)走向 his(27)，而螺旋 D 可能从约 trp(135)走向 gly(162)。表面暴露的残基可

能影响受体结合，而包埋的残基可能影响整体结构．预测的特别重要的残基可能对应于 arg(146)、 ser(147)、 gln(149)、 ala(150)、ala(153)、 val(154)、 ala(156)、 arg(157)、 ala(160)和 his(161)。

例如，一旦已经例如通过四级结构数据确定了所述抗原的结构，则通常可以发现拮抗剂。采用纯化的 IL-B30，因高度自动化测定方法的开发，潜在的互作类似物的测试现在是可能的．特别是，通过采用本文描述的筛选技术，将发现新的激动剂和拮抗剂．特别重要的是发现对一系列 IL-B30 分子具有组合结合亲和性的化合物，例如，可以用作 IL-B30 物种变异体拮抗剂的化合物。

一种药物筛选方法利用表达 IL-B30 的重组 DNA 分子稳定转化的真核或原核宿主细胞。可以分离表达与其它分子分离的 IL-B30 的细胞．这种活的或固定形式的细胞，可以用于标准结合伴侣的结合鉴定法。也参见Parce等(1989) Science 246:243-247; 和Owicki等(1990) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87:4007-4011，该文献描述了测定细胞反应的灵敏方法。

用于药物筛选的另一技术涉及一种方法，该方法提供对 IL-B30 具有合适结合亲和性的化合物的高通量筛选，详细描述于 Geysen 的欧洲专利申请 84/03564，该专利申请于 1984 年 9 月 13 日公开。首先，在例如塑料钉或某些其它合适表面的固体基质上合成大量的不同小肽测试化合物，参见 Fodor 等(1991)。然而，使所有钉与溶解的未纯化或溶解的纯化 IL-B30 反应，然后洗涤。下一步涉及测定结合的 IL-B30．

合适的药物设计也可以基于所述 IL-B30 或其它效应物或类似物的分子形状的结构研究。效应物可以是对结合应答而介导其它功能的其它蛋白，或为通常与 IL-B30 反应的其它蛋白，例如受体。用于确定那些位点与特定的其它蛋白反应的一种方法是物理结构测定，例如 X 射线晶体学或二维 NMR 技术．这些将为那些氨基酸残基形成分子接触区、例如针对其它细胞因子-受体模型制作模型提供指南。关于蛋白结构测定的详细描述，参见例如 Blundell 和 Johnson (1976) Protein

Crystallography, Academic Press, New York .

IX. 试剂盒

本发明也考虑了 IL-B30 蛋白、其片段、肽和它们的融合产物的用途，即用于在多种用于检测另一 IL-B30 或结合伴侣存在的诊断试剂盒和方法。通常，所述试剂盒会具有含或者特定 IL-B30 肽或基因区段或者识别一种或另一种(例如 IL-B30 片段或抗体)的试剂的区室。

用于测定测试化合物对 IL-B30 的结合亲和性的试剂盒，通常包含一种测试化合物；一种标记化合物，例如对 IL-B30 具有已知结合亲和性的一种结合伴侣或抗体；一种 IL-B30 源(天然存在的或重组的)；和用于将结合的标记化合物与游离标记化合物分离的工具，例如用于将该分子固定化的固相。一旦筛选出化合物，则可以在合适的生物测定中评估对该抗原具有合适结合亲和性的那些化合物，所述生物测定是本领域熟知的，用于测定它们是作为 IL-B30 信号途径的激动剂还是作为拮抗剂起作用。重组 IL-B30 多肽的可得性也提供了很好确定的校准这类测定的标准。

用于测定样品中例如 IL-B30 浓度的优选试剂盒，通常包含一种对所述抗原具有已知结合亲和性的标记化合物，例如结合伴侣或抗体；一种细胞因子源(天然存在的或重组的)和一种将结合标记化合物与游离标记化合物分离的工具，例如用于将所述 IL-B30 固定化的固相。通常提供含试剂的区室和说明。

包括抗原结合片段在内的所述 IL-B30 或片段的特异性抗体，可用于检测水平提高的 IL-B30 和/或其片段存在的诊断应用。这类诊断测定可以使用裂解液、活细胞、固定细胞、免疫荧光、细胞培养物、体液，还可以涉及血清中与所述抗原相关的抗原的检测等。诊断测定可以是均相(在游离试剂和抗原结合伴侣复合物之间无分离步骤)或异相(有分离步骤)的。存在各种商业测定，诸如放射免疫测定(RIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、酶免疫测定(EIA)、酶倍增免疫测定(enzyme-

multiplied immunoassay)技术(EMIT)、底物标记荧光免疫测定(SLFIA)等。参见例如 Van Vunakis 等(1980) Meth Enzymol. 70:1-525; Harlow 和 Lane (1980) Antibodies: A Laboratory Manua, CSH Press, NY; 和 Coligan 等(1993 编辑) Current Protocols in Immunology, Greene and Wiley, NY 。

抗独特型抗体可以相似地用来诊断抗 IL-B30 抗体的存在，这样可以诊断各种异常状态。例如， IL-B30 的超量产生可能导致产生可能是异常生理状况诊断标志的各种免疫反应，所述异常生理状况特别是增殖性细胞病症(诸如癌症)或异常活化或分化。此外，可得到的分布模式提供细胞因子在胰岛中表达的信息，提示该细胞因子可能参与该器官功能、例如参与糖尿病相关的医学病症的可能性。

通常，用于诊断测定的试剂在试剂盒中供应，以便使该测定的灵敏度最佳化。对于本发明，根据该测定的性质，提供所述方案和所述标记(或者标记或未标记的抗体或结合伴侣，或者标记 IL-B30)。这通常与其它添加剂结合，所述添加剂诸如缓冲液、稳定剂、信号产生必需的物质，诸如酶的底物等。所述试剂盒最好也含有正确使用和使用后正确处理内容物的说明。所述试剂盒通常具有每种有用试剂的区域。当所述试剂可以在水性介质中重建，提供进行该测定的合适试剂浓度时，所述试剂最好是作为干燥的冻干粉提供。

所述药物筛选和所述诊断测定的许多上述组分可以不修饰而使用，或以多种方式进行修饰。例如，通过共价或非共价结合直接或间接提供可检测信号的部分，可以达到标记。在这些测定中的任一种中，可以或者直接或间接标记所述结合伴侣、测试化合物、 IL-B30 或其抗体。直接标记的可能性包括标记基团：诸如 ^{125}I 的放射标记；酶(美国专利第 3,645,090 号)，诸如过氧化物酶和碱性磷酸酶；和能够监测荧光强度、波长移动或荧光偏振变化的荧光标记(美国专利第 3,940,475 号)。间接标记的可能性包括将一种组分生物素化，然后结合于偶联至一种上述标记基团的抗生物素蛋白。

也有许多分离结合 Il-B30 与游离 IL-B30 、或者分离结合测试化合

物与游离测试化合物的方法。所述 IL-B30 可以固定于各种基质上，然后进行洗涤。合适的基质包括诸如 ELISA 板的塑料、滤膜和珠粒。参见例如 Coligan 等(1993 编辑) Current Protocols in Immunology, 第 1 卷, 第 2 章, Greene and Wiley, NY。其它合适的分离技术包括但不限于 Rattle 等(1984) Clin. Chem. 30:1457-1461 中描述的荧光抗体可磁化微粒法、以及美国专利第 4,659,678 号中描述的双抗体磁性微粒分离。

在所述文献中已经广泛报道了用于将蛋白或其片段交联于各种标记的方法，本文不需要详细讨论。许多这些技术涉及或者通过碳二亚胺或者活性酯而使用活化羧基，形成肽键；通过巯基与活化卤素(诸如氯乙酰)或活化烯烃(诸如马来酰亚胺)反应形成硫代酸酯，以用于交联等。融合蛋白也可供这些应用使用。

本发明的另一诊断方面涉及使用取自 IL-B30 序列的寡核苷酸序列或多核苷酸序列。这些序列可以用作探针，以检测怀疑患有异常病症(例如炎性病症或自身免疫病症)患者样品中所述 IL-B30 信息水平。由于该细胞因子可以是活化标记或中介体，所以可用来检测多种活性细胞，以确定例如在所述效应变显著或进展为显著之前可能例如以预防方式需要其它疗法的时间。RNA 和 DNA 核苷酸序列的制备、所述序列的标记和所述序列的优选大小在所述文献中有大量的描述和讨论。参见例如 Langer-Sager 等(1982) Proc. Nat'l. Acad. Sci. 79:4381-4385; Caskey (1987) Science 236:962-967; 和 Wilchek 等(1988) Anal. Biochem. 171:1-32。

也考虑了也测试其它分子定性或定量表达的诊断试剂盒。诊断或预后可能取决于用作标记的多种指标的组合。因此，试剂盒可以测试标记的组合。参见例如 Viallet 等(1989) Progress in Growth Factor Res. 1:89-97。其它试剂盒可以用来评估其它细胞亚群。

X. IL-B30 受体的分离

由于已经分离出特异性配体-受体相互作用的配体，存在分离所述

受体的方法。参见 Gearing 等(1989) EMBO J. 8:3667-3676 。例如，可以确定标记所述 IL-B30 细胞因子、但不干扰与其受体结合的方法。例如，亲和标记可以融合于所述配体的或者氨基末端或者羧基末端。这种标记可以是 FLAG 附加表位，或例如 Ig 或 Fc 结构域。例如通过细胞分选，或测定表达这种结合组分的亚群的其它筛选，可以对表达文库筛选所述细胞因子的结合。参见例如 Ho 等(1993) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90:11267-11271; 和 Liu 等(1994) J. Immunol. 152:1821-29 。或者，可以使用淘选法。参见例如 Seed 和 Aruffo (1987) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 84:3365-3369 。

可以应用蛋白质与标记交联的技术来分离所述 IL-B30 细胞因子的结合伴侣。这应该使得可以鉴定与该细胞因子例如以配体-受体样方式特异性相互作用的蛋白。

将进行早期试验，以确定已知的 IL-6 或 G-CSF 受体组分是否参与对 IL-B30 的应答。这些功能受体复合物可以与 IL-B30 受体复合物共享许多或所有组分，这种可能性也相当大，其中所述组分或者为特定受体亚基或者为辅助受体亚基。

可以对本发明进行许多修改和变化，而不偏离本发明的精神和范围，这对于本领域技术人员是显而易见的。提供本文描述的具体实施方案仅仅是举例说明，本发明仅受所附权利要求书的条款以及这些权利要求赋予的相当物的全部范围限制。

实施例

I. 一般方法

在 Maniatis 等(1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY; Sambrook 等(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第 2 版) 第 1-3 卷, CSH Press, NY; Aububel 等, Biology Greene Publishing Associates, Brooklyn, NY; 或 Ausubel 等(1987 和增补本) Current Protocols in Molecular

Biology Wiley/Greene, NY; Innis 等(1990 编辑) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications Academic Press, NY 中，描述或引用的以下的许多标准方法。用于蛋白纯化的方法包括诸如硫酸铵沉淀、柱层析、电泳、离心、结晶的方法和其它方法。参见例如 Ausubel 等(1987 和定期增补本); Deutscher (1990) "蛋白纯化指南", Methods in Enzymology 第 182 卷和该系列中的其它卷; Coligan 等(1995 和增补本) Current Protocls in Protein Science John Wiley and Sons, New York, NY; P. Matsudaira (1993 编辑) A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing, Academic Press, San Diego, CA; 和例如 Pharmacia, Piscataway, NJ 或 Bio-Rad, Richmond, CA 的生产商关于蛋白纯化产品使用的文献。与重组技术结合，使得可以与合适区段(附加表位)融合，例如与 FLAG 序列或可以通过蛋白酶可去除序列融合的相当序列融合。参见例如 Hochli (1989) Chemische Industrie 12:69-70; Hichuli (1990) "用金属螯合吸收剂纯化重组蛋白", Setlow (编辑) Genetic Engineeing, Principle and Methods 12:87-98, Plenum Press, NY; 和 Crowe 等(1992) QIAexpress: The High Level Expression & Protein Purification System QUIAGEN, Inc., Chatsworth, CA 。

例如在 Hertzenberg 等(1996 版) Weir's Handbook of Experimental Immnology 第 1-4 卷, Blackwell Science; Coligan (1991) Current Protocols in Immunology Wiley/Greene, NY; 和 Methods in Enzymology 第 70、73、74、84、92、93、108、116、121、132、150、162 和 163 卷中，描述了标准免疫学技术。例如在 Thomson (1994 编辑) The Cytokine Handbook (第 2 版) Academic Press, San Diego; Metcalf 和 Nicola (1995) The Hematopoietic Colony Stimulating Factors Cambridge University Press; 和 Aggarwal 和 Gutterman (1991) Human Cytokines Blackwell Pub.中，描述了细胞因子测定。

血管生物活性的测定是本领域熟知的。它们包括肿瘤或其它组织(例如动脉平滑肌)增生(参见例如 Koyoma 等(1996) Cell 87:1069-

1078)、单核细胞粘着于血管上皮(参见 McEvoy 等(1997) J. Exp. Med. 185:2069-2077)等中的血管生成活性和血管抑制(angiostatic)活性。也参见 Ross (1993) Nature 362:801-809; Rekhter 和 Gordon (1995) Am. J. Pathol. 147:668-677; Thyberg 等(1990) Atherosclerosis 10:966-990; 和 Gumbiner (1996) Cell 84:345-357 。

例如在 Wouterlood (1995 编辑) Neuroscience Protocls modules 10, Elsevier; Methods in Neurosciences Academic Press; 和 Neuromethods Humana Press, Totowa, NJ 中，描述了用于神经细胞生物活性的测定。例如在 Meisami (编辑) Handbook of Human Growth and Developmental Biology CRC Press; 和 Chrispeels (编辑) Molecular Techniques and Approaches in Developmental Biology Interscience 中，描述了发育系统的方法学。

在 Melamed 等(1990) Flow Cytometry and Sorting Wiley-Liss, Inc., New York, NY; Shapiro (1988) Practical Flow Cytometry Liss, New York, NY; 和 Robinson 等(1993) Handbook of Flow Cytometry Methods Wiley-Liss, New York, NY 中，描述了 FACS 分析。

II. 人 IL-B30 的克隆

表 1 提供了该基因的序列。所述序列得自由黑素细胞、胎心和妊娠子宫制备的 cDNA 文库。从得自胰岛的 cDNA 文库序列中也发现了该序列。这些序列使得可以制备 PCR 引物或探针，以测定该基因的细胞分布。所述序列使得可以分离编码该信息的基因组 DNA。

使用所述探针或 PCR 引物，可以探测各种组织或细胞类型，以确定细胞分布。用例如 TA 克隆试剂盒(Invitrogen)克隆 PCR 产物。在自动测序仪(Applied Biosystems)上，从两个末端对所得的 cDNA 质粒测序。

III. IL-B30 的细胞表达

制备对编码灵长类 IL-B30 的 cDNA 特异性的合适探针或引物。通常，例如通过随机引物，标记该探针。表达可以在所述的细胞类型中，也许也在胰岛中。 DNA 分析: 初次扩增的 cDNA 文库的 DNA (5 μg) 用合适的限制性酶消化，以释放插入片段，在 1%琼脂糖凝胶上电泳，并转移至尼龙膜(Schleicher 和 Schuell, Keene, NH)上。

用于人 mRNA 分离的样品包括: 外周血单核细胞(单核细胞、 T 细胞、 NK 细胞、粒细胞、 B 细胞)，静息的(T100); 外周血单核细胞，用抗 CD3 激活 2 、 6 、 12 小时的混合物(pooled)(T101); T 细胞， TH0 克隆 Mot 72，静息的(T102); T 细胞， TH0 克隆 Mot 72 ，用抗 CD28 和抗 CD3 激活 3 、 6 、 12 小时的混合物(T103); T 细胞， TH0 克隆 Mot 72 ，用特定肽无反应性处理 2 、 7 、 12 小时的混合物(T104); T 细胞， TH1 克隆 HY06，静息的(T107); T 细胞， TH1 克隆 HY06 ，用抗 CD28 和抗 CD3 激活 3 、 6 、 12 小时的混合物(T108); T 细胞， TH1 克隆 HY06 ，用特定肽无反应性处理 2 、 6 、 12 小时的混合物(T109); T 细胞， TH2 克隆 HY935 ，静息的(T110); T 细胞， TH2 克隆 HY935 ，用抗 CD28 和抗 CD3 激活 2 、 7 、 12 小时的混合物(T111); T 细胞肿瘤系 Jurkat 和 Hut78 ，静息的(T117); T 细胞克隆，混合的 AD130.2 、 Tc783.12 、 Tc783.13 、 Tc783.58 、 Tc782.69 ，静息的(T118); T 细胞随机γδ T 细胞克隆，静息的(T119); CD28- T 细胞克隆; 脾细胞，静息的(B100); 脾细胞，用抗 CD40 和 IL-4 激活的(B101); B 细胞 EBV 系，混合的 WT49 、 RSB 、 JY 、 CVIR 、 721.221 、 RM3 、 HSY ，静息的(B102); B 细胞系 JY ，用 PMA 和离子霉素激活 1 、 6 小时的混合物(B103); 混合的 NK 20 克隆，静息的(K100); 混合的 NK20 克隆，用 PMA 和离子霉素激活 6 小时(K101); NKL 克隆，得自 LGL 白血病患者的外周血， IL-2 处理的(K106); 造血前体系 TF1 ，用 PMA 和离子霉素激活 1 、 6 小时的混合物(C100); U937 前单核细胞系，静息的(M100); U937 前单核细胞系，用 PMA

和离子霉素激活 1 、 6 小时的混合物(M101); 淘析的单核细胞，用 LPS、 IFNγ、抗 IL-10 激活 1、 2、 6、 12、 24 小时的混合物(M102); 淘析的单核细胞，用 LPS、 IFNγ、 IL-10 激活 1、 2、 6、 12、 24 小时的混合物(M103); 淘析的单核细胞，用 LPS、 IFNγ、抗 IL-10 激活 4、 16 小时的混合物(M106); 淘析的单核细胞，用 LPS、 IFNγ、 IL-10 激活 4、 16 小时的混合物(M107); 淘析的单核细胞，用 LPS 激活 1 小时(M108); 淘析的单核细胞，用 LPS 激活 6 小时(M109); DC 70% CD1a+，来自 CD34+ GM-CSF、 TNFα 12 天，静息的(D101); DC 70% CD1a+，来自 CD34+ GM-CSF、 TNFα 12 天，用 PMA 和离子霉素激活 1 小时(D102); DC 70% CD1a+，来自 CD34+ GM-CSF、 TNFα 12 天，用 PMA 和离子霉素激活 6 小时(D103); DC 95% CD1a+，来自 CD34+ GM-CSF、 TNFα 12 天，通过 FACS 分选，用 PMA 和离子霉素激活 1 、 6 小时的混合物(D104); DC 95% CD14+，来自 CD34+ GM-CSF、 TNFα 12 天，通过 FACS 分选，用 PMA 和离子霉素激活 1、 6 小时的混合物(D105); DC CD1a+ CD86+，来自 CD34+ GM-CSF、 TNFα 12 天，通过 FACS 分选，用 PMA 和离子霉素激活 1 、 6 小时的混合物(D106); DC，来自单核细胞 GM-CSF、 IL-4 5 天，静息的(D107); DC，来自单核细胞 GM-CSF、 IL-4 5 天，静息的(D108); DC，来自单核细胞 GM-CSF、 IL-4 5 天，用 LPS 激活 4、 16 小时的混合物(D109); DC，来自单核细胞 GM-CSF、 IL-4 5 天，用 TNFα、单核细胞上清液(supe)激活 4 、 16 小时的混合物(D110); 上皮细胞，未刺激的; 上皮细胞， IL-1β 激活的; 肺成纤维细胞肉瘤系 MRC5，用 PMA 和离子霉素激活 1 、 6 小时的混合物(C101); 肾上皮癌细胞系 CHA，用 PMA 和离子霉素激活 1 、 6 小时的混合物(C102). 在淘析的单核细胞，用 LPS 、 IFNγ 、抗 IL-10 激活 4 、 16 小时的混合物(M106); 淘析的单核细胞，用 LPS、 IFNγ、抗 IL-10 激活 1、 2、 6、 12 、 24 小时的混合物(M102); 淘析的单核细胞，用 LPS 激活 6 小时(M109); 淘析的单核细胞，用 LPS 激活 1 小时(M108)中， IL-B30 转录

物的表达非常高.在 DC 95% CD1a+, 来自 CD34+ GM-CSF、 TNFα 12 天，通过 FACS 分选，用 PMA 和离子霉素激活 1、 6 小时的混合物(D104)；和混合的 NK20 克隆，用 PMA 和离子霉素激活 6 小时(K101)中表达高。在 DC 70% CD1a+，来自 CD34+ GM-CSF、 TNFα 12 天，用 PMA 和离子霉素激活 6 小时(D103)； DC 70% CD1a+, 来自 CD34+ GM-CSF、 TNFα 12 天，用 PMA 和离子霉素激活 1 小时(D102)； T 细胞， TH1 克隆 HY06，用特定肽无反应性处理 2、 6、 12 小时的混合物(T109)；外周血单核细胞，用抗 CD3 激活 2、 6、 12 小时的混合物(T101)； T 细胞， TH0 克隆 Mot 72，用抗 CD28 和抗 CD3 激活 3、6、 12 小时的混合物(T103)；脾细胞，用抗 CD40 和 IL-4 激活的(B101)；T 细胞， TH0 克隆 Mot 72，用特定肽无反应性处理 2、 7、 12 小时的混合物(T104)；脾细胞，静息的(B100)； T 细胞， TH1 克隆 HY06，用抗 CD28 和抗 CD3 激活 3、 6、 12 小时的混合物(T108)；上皮细胞，IL-1β 激活的；淘析的单核细胞，用 LPS、 IFNγ、 IL-10 激活 4、 16 小时的混合物(M107)；和 B 细胞系 JY，用 PMA 和离子霉素激活 1、6 小时的混合物(B103)中，检测到较低的表达。在 DC，来自单核细胞 GM-CSF、 IL-4 5 天，用 LPS 激活 4、 16 小时的混合物(D109)； T 细胞， TH0 克隆 Mot 72，静息的(T102)；外周血单核细胞(单核细胞、 T 细胞、 NK 细胞、粒细胞、 B 细胞)，静息的(T100)； T 细胞，在抗 CD28、 IL-4 和抗 IFN-γ 中极化 27 天的 CD4+CD45RO-T 细胞，极化的 TH2，用抗 CD3 和抗 CD28 激活 4 小时(T116)； T 细胞克隆，混合的 AD130.2、 Tc783.12、 Tc783.13、 Tc783.58、 Tc782.69，静息的(T118)； U937 前单核细胞系，静息的(M100)；造血前体系 TF1，用 PMA 和离子霉素激活 1、 6 小时的混合物(C100)； T 细胞， TH2 克隆 HY935，用抗 CD28 和抗 CD3 激活 2、 7、 12 小时的混合物(T111)；DC CD1a+ CD86+，来自 CD34+ GM-CSF、 TNFα 12 天，通过 FACS 分选，用 PMA 和离子霉素激活 1、 6 小时的混合物(D106)；淘析的单核细胞，用 LPS、 IFNγ、 IL-10 激活 1、 2、 6、 12、 24 小时的混

合物(M103); DC，来自单核细胞 GM-CSF、IL-4 5 天，用 TNFα、单核细胞上清液激活 4、16 小时的混合物(D110); DC，来自单核细胞 GM-CSF、IL-4 5 天，静息的(D108); U937 前单核细胞系，用 PMA 和离子霉素激活 1、6 小时的混合物(M101); T 细胞随机γδ T 细胞克隆，静息的(T119); 和 T 细胞，TH1 克隆 HY06，用抗 CD28 和抗 CD3 激活 3、6、12 小时的混合物(T108)中，观察到可检测的表达。在其它样品中没有检测到信号。

总之，分布显示，IL-B30 在活化巨噬细胞中水平升高，提示在炎症中的作用；在活化 Th1 细胞中水平升高，提示在 T 辅助细胞亚群(helper subset)中，特别是在 Th1 免疫应答中有调节或效应物作用；在活化树突细胞中水平升高，提示在抗原提呈或生发中心 T 或 B 细胞与 DC 相互作用中的作用。

用于小鼠 mRNA 分离的样品可以包括: 静息的小鼠成纤维细胞的 L 细胞系(C200); Braf:ER (与雌激素受体融合的 Braf 融合体)转染的细胞，对照(C201); Me114+原初 T 细胞，来自脾脏，静息的(T209); Me114+ T 细胞，来自脾脏，用 IFN-γ、IL-12 和抗 IL-4 刺激极化为 TH1 细胞，暴露于 IFN-γ 和 IL-4 6、12、24 小时的混合物(T210); Me114+原初 T 细胞，来自脾脏，用 IL-4 和抗 IFN-γ 刺激极化为 Th2 细胞，暴露于 IL-4 和抗 IFN-γ 6、13、24 小时的混合物(T211); T 细胞，极化的 TH1 (Me114 bright，来自脾脏的 CD4+细胞，用 IFN-γ 和抗 IL-4 极化 7 天; T200); T 细胞，极化的 TH2 (Me114 bright，来自脾脏的 CD4+细胞，用 IL-4 和抗 IFN-γ 极化 7 天; T201); T 细胞，高度极化 3x 的 TH1，来自转基因 Balb/c (参见 Openshaw 等(1995) J. Exp. Med. 182:1357-1367；用抗 CD3 激活 2、6、16 小时的混合物; T202); T 细胞，高度极化 3x 的 TH2，来自转基因 Balb/c (用抗 CD3 激活 2、6、24 小时的混合物; T203); T 细胞，高度极化 3x 的 TH1，来自转基因 C57 bl/6 (用抗 CD3 激活 2、6、24 小时的混合物; T212); T 细胞，高度极化 3x 的 TH2，来自转基因 C57 bl/6 (用抗 CD3 激活 2、6、

24 小时的混合物； T213)； T 细胞，高度极化的 TH1 (来自转基因 Balb/c 的原初 CD4+ T 细胞，用 IFN-γ、IL-12 和抗 IL-4 极化 3x；用 IGIF、IL-12 和抗 IL-4 刺激 6、12、24 小时的混合物)； CD44- CD25+ 前 T 细胞，从胸腺分选的(T204)； TH1 T 细胞克隆 D1.1，用抗原最后一次刺激后静息 3 周(T205)； TH1 T 细胞克隆 D1.1， 10 μg/ml ConA 激活 15 小时(T206)； TH2 T 细胞克隆 CDC35，用抗原最后一次刺激后静息 3 周(T207)； TH2 T 细胞克隆 CDC35， 10 μg/ml ConA 激活 15 小时(T208)；未刺激的 B 细胞系 CH12 (B201)；未刺激的成熟 B 细胞白血病细胞系 A20 (B200)；来自脾脏的未刺激的大 B 细胞(B202)；来自全脾的 B 细胞， LPS 激活(B203)；来自脾脏的三碘苯甲酰氨基葡萄糖富集的树突细胞，静息的(D200)；来自骨髓的树突细胞，静息的(D201)；未刺激骨髓源性树突细胞，用抗 B220、抗 CD3 和抗 II 类排除(deplete)，在 GM-CSF 和 IL-4 中培养的(D202)；骨髓源性树突细胞，用抗 B220、抗 CD3 和抗 II 类排除，在 GM-CSF 和 IL-4 中培养，用抗 CD40 刺激 1、 5 天的混合物(D203)；单核细胞细胞系 RAW 264.7，用 LPS 激活 4 小时(M200)；骨髓巨噬细胞，用 GM 和 M-CSF 衍生的(M201)；骨髓巨噬细胞，用 GM-CSF 衍生，用 LPS、 IFNγ 和抗 IL-10 刺激 24 小时(M205)；骨髓巨噬细胞，用 GM-CSF 衍生，用 LPS、 IFNγ 和抗 IL-10 刺激 24 小时(M206)；腹膜巨噬细胞(M207)；巨噬细胞系 J774，静息的(M202)；于 0.5、 1、 3、 6、 12 小时混合的巨噬细胞系 J774 + LPS + 抗 IL-10 (M203)；于 0.5、 1、 3、 5、 12 小时混合的巨噬细胞系 J774 + LPS + IL-10 (M204)；未刺激的肥大细胞系 MC-9 和 MCP-12 (M208)；得自脑微血管内皮细胞的无限增殖化内皮细胞系，未刺激的(E200)；得自脑微血管内皮细胞的无限增殖化内皮细胞系，用 TNFα 刺激过夜(E201)；得自脑微血管内皮细胞的无限增殖化内皮细胞系，用 TNFα 刺激过夜(E202)；得自脑微血管内皮细胞的无限增殖化内皮细胞系，用 TNFα 和 IL-10 刺激过夜(E203)；来自 wt C57 bl/6 小鼠的全主动脉；来自 5 月龄 ApoE KO 小鼠的全主动脉(X207)；

来自 12 月龄 ApoE KO 小鼠的全主动脉(X207); wt 胸腺(O214); 全胸腺, rag-1 (O208); 全肾脏, rag-1 (O209); 全肾脏, NZ B/W 小鼠; 和全心脏, rag-1 (O202). 在单核细胞细胞系 RAW 264.7, 用 LPS 激活 4 小时(M200); T 细胞, 高度极化 3x 的 TH1, 来自转基因 C57 bl/6 (用抗 CD3 激活 2、6、24 小时的混合物; T212); 和 T 细胞, 高度极化的 TH1 (来自转基因 Balb/c 的原初 CD4+ T 细胞, 用 IFN-γ、IL-12 和抗 IL-4 极化 3x; 用 IGIF、IL-12 和抗 IL-4 刺激 6、12、24 小时的混合物)中, 检测到高信号。在 T 细胞, 高度极化 3x 的 TH1, 来自转基因 Balb/c (参见 Openshaw 等(1995) J. Exp. Med. 182:1357-1367; 用抗 CD3 激活 2、6、16 小时的混合物; T202); T 细胞, 极化的 TH2 (Me114 bright, 来自脾脏的 CD4+细胞, 用 IL-4 和抗 IFN-γ 极化 7 天; T201); T 细胞, 极化的 TH1 (Me114 bright, 来自脾脏的 CD4+细胞, 用 IFN-γ 和抗 IL-4 极化 7 天; T200); 于 0.5、1、3、6、12 小时混合的巨噬细胞系 J774 + LPS + 抗 IL-10 (M203); 巨噬细胞系 J774, 静息的(M202); 于 0.5、1、3、5、12 小时混合的巨噬细胞系 J774 + LPS + IL-10 (M204); 得自脑微血管内皮细胞的无限增殖化内皮细胞系, 用 TNFα 刺激过夜(E201); 和骨髓巨噬细胞, 用 GM-CSF 衍生, 用 LPS、IFNγ 和抗 IL-10 刺激 24 小时(M206)中检测到可检测信号。其它样品未显示信号。在 RAW 264.7 小鼠单核细胞系中的表达提示一种天然蛋白源。

IV. IL-B30 的染色体作图

使用编码所述 IL-B30 的分离的 cDNA。染色体作图是一种标准技术。参见例如 BIOS Laboratories (New Haven, CT)和采用小鼠体细胞杂种库和 PCR 的方法。间接证据表明, 小鼠 IL-B30 基因作图至染色体 10。

V. IL-B30 蛋白的纯化

对多个转染的细胞系筛选以高于其它细胞的水平表达该细胞因子的细胞系。筛选各种细胞系，在处理中选择其合适的特性。天然 IL-B30 可以从天然来源分离，或采用合适的表达载体通过表达从转化细胞中分离。用标准方法可以达到所表达蛋白的纯化，或可以结合工程改造方法，以高效率从细胞裂解液或上清液中有效地纯化所表达的蛋白。对于这类纯化特征可以使用 FLAG 或 His6 区段。或者，可以用特异性抗体，使用亲和层析，参见下文。

根据需要，在大肠杆菌(coli)、昆虫细胞或哺乳动物表达系统中产生蛋白质。

VI. 同源 IL-B30 基因的分离

所述 IL-B30 cDNA 或其它物种对应序列可以用作杂交探针，以从所需来源(例如灵长类细胞 cDNA 文库)筛选文库。可以采用探针，对许多不同的物种筛选易于杂交必需的严格性和存在。合适的杂交条件将用来筛选表达交叉杂交特异性的克隆。

采用基于所述肽序列的简并探针通过杂交筛选，也使得可以分离合适的克隆。或者，使用合适的 PCR 筛选引物，将产生合适核酸克隆的富集。

相似的方法可应用于分离或者物种变异体、多态变异体或者等位基因变异体。根据作为探针的来自一个物种的全长分离物或片段的分离，采用交叉物种杂交技术，可以分离物种变异体。

或者，针对人 IL-B30 产生的抗体用来从合适的例如 cDNA 文库中筛选表达交叉反应性蛋白的细胞。纯化的蛋白和限定的肽可用来通过如上所述的标准方法产生抗体。将合成肽或纯化蛋白提呈给免疫系统，以产生单克隆或多克隆抗体。参见例如 Coligan (1991) Current Protocols in Immunology Wiley/Greene; 和 Harlow 和 Lane (1989) Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Press。所得的抗体

用于如上所述的筛选、纯化或诊断。

VII. IL-B30 特异性抗体的制备

将合成肽或纯化蛋白提呈给免疫系统，以产生单克隆或多克隆抗体。参见例如 Coligan (1991) Current Protocols in Immunology Wiley/Greene; 和 Harlow 和 Lane (1989) Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Press。可以制备多克隆血清或杂交瘤。在合适的情况下，所述结合试剂或者如上所述进行标记，例如荧光标记，或者固定化至基质上用于淘选法。免疫选择和相关技术可用来根据需要制备选择性试剂。

VIII. 生物学功能广度的评估

根据 IL-B30 和 IL-6 和 G-CSF 之间序列同源性和结构同源性，测试 IL-B30 的生物活性。最初，检查已经显示 IL-6 或 G-CSF 生物活性的测定。

A. 对细胞增殖的效应

用不同浓度的细胞因子，评估对各种细胞类型增殖的效应。结合相关细胞因子 IL-6、G-CSF 等进行剂量效应分析。

B. 对人单核细胞上细胞表面分子表达的效应

通过负选择，从正常健康供体的外周血单核细胞纯化单核细胞。简而言之，将 3×10^8 ficoll 带的单核细胞与单克隆抗体混合物(Becton-Dickinson; Mountain View, CA)在冰上孵育，所述单克隆抗体混合物包含例如 200 μl αCD2 (Leu-5A)、200 μl αCD3 (Leu-4)、100 μl αCD8 (Leu 2a)、100 μl αCD19 (Leu-12)、100 μl αCD20 (Leu-16)、100 μl αCD56 (Leu-19)、100 μl αCD67 (IOM 67; Immnotech, Westbrook, ME)和抗血型糖蛋白抗体(10F7MN, ATCC, Rockville, MD)。洗涤抗体

结合细胞，然后与羊抗小鼠 IgG 偶联的磁性珠粒(Dynal, Oslo, 挪威)一起温育，珠粒与细胞之比为 20:1．通过施加磁场，从单核细胞中分离抗体结合细胞。随后，在缺乏或存在 IL-B30、IL-6、G-CSF 或组合物的情况下，在含 1%人 AB 血清的 Yssel 氏培养基(Gemini Bioproducts, Calabasas, CA)中培养人单核细胞。

通过直接免疫荧光，可以进行细胞表面分子表达的分析。例如，将 2 × 10^5 纯化的人单核细胞在含 1%人血清的磷酸缓冲盐溶液(PBS)中在冰上孵育 20 分钟。以 200 × g 沉淀细胞。将细胞再悬浮于 20 ml PE 或 FITC 标记的 mAb 中。于冰上再孵育 20 分钟后，细胞在含 1%人血清的 PBS 中洗涤，然后在单独的 PBS 中洗涤 2 次。将细胞在含 1%低聚甲醛的 PBS 中固定，并在 FACScan 流式细胞仪(Becton Dickinson; Mountain View, CA)上进行分析。使用典型的 mAb，例如：得自 Becton-Dickinson 的 CD11b (抗 mac1)、CD11c (gp150/95)、CD14 (Leu-M3)、CD-54 (Leu 54)、CD80 (抗 BB1/B7)、HLA-DR (L243)和 CD86 (FUN 1; Pharmingen)、CD64 (32.2; Medarex)、CD40 (mAb89; Schering-Plough 法国)。

C. IL-B30 对人单核细胞产生细胞因子的效应

如上所述分离人单核细胞，并在缺乏或存在 IL-B30 (1/100 稀释液，杆状病毒表达的物质)的情况下，在含 1%人 AB 血清 Yssel 氏培养基(Gemini Bioproducts, Calabasas, CA)中培养。另外，在缺乏或存在 IL-B30 的情况下，用 LPS (大肠杆菌 0127:B8 Difco)刺激单核细胞，并通过 ELISA 测定细胞培养上清液中细胞因子(IL-1β、IL-6、TNFα、GM-CSF 和 IL-10)的浓度。

对于细胞因子的胞质内染色，在缺乏和存在 IL-B30 和 LPS (大肠杆菌 0127:B8 Difco)和 10 mg/ml 布雷菲德菌素 A (Epicentre technologies Madison WI)的情况下，在 Yssel 氏培养基中培养(1 × 10^6/ml)单核细胞 12 小时。在 PBS 中洗涤细胞，并在 2%甲醛/PBS 溶液中于室温下孵育

20 分钟。随后将细胞洗涤，再悬浮于透化缓冲液(0.5%皂苷(Sigma)的PBS/BSA (0.5%)/叠氮化物(1 mM)溶液)中，于室温下孵育 20 分钟。将细胞(2×10^5)离心，于室温下再悬浮于 20 ml 直接缀合的抗细胞因子 mAb 中 20 分钟，所述 mAb 以 1:10 在透化缓冲液中稀释。可以使用以下抗体： IL-1α-PE (364-3B3-14); IL-6-PE (MQ2-13A5); TNFα-PE (Mab11); GM-CSF-PE (BVD2-21C11); 和 IL-12-PE (C11.5.14; Pharmingen San Diego, CA)。随后，将细胞在透化缓冲液中洗涤 2 次，在 PBS/BSA/叠氮化物中洗涤 1 次，并在 FACScan 流式细胞仪(Becton Dickinson; Mountain View, CA)上进行分析。

D. IL-B30 对人外周血单核细胞(PBMC)增殖的效应

如所述(Boyum 等)，通过 Ficoll-hypaque 离心，从正常健康供体的浅黄色层分离总 PBMC 。在缺乏或存在 IL-B30 的情况下，将 PBMC 在 96 孔板(Falcon, Becton-Dickinson, NJ)中的 200 μl 含 1%人 AB 血清的 Yssel 氏培养基(Gemini Bioproducts, Calabasas, CA)中培养。将细胞在单独的培养基中或结合 100 U/ml IL-2 (R&D Systems)的培养基中培养 120 小时。在培养的最后 6 小时期间， 3H-胸苷，通过液闪计数测定 3H-胸苷的掺入。

可以在许多其它生物测定系统中，例如在 T 细胞、 B 细胞、 NK、巨噬细胞、树突细胞、造血祖细胞等上，测试所述天然、重组和融合蛋白的激动剂或拮抗剂活性。因为 IL-6 和 G-CSF 的结构关系，应该分析与那些活性相关的测定。

在表达 IL-6 或 G-CSF 受体的转染细胞和对照上，评估 IL-B30 的激动剂或拮抗剂活性。参见例如 Ho 等(1993) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90, 11267-11271; Ho 等(1995) Mol. Cell. Biol. 15:5043-5053; 和 Liu 等(1994) J Immunol. 152:1821-1829 。

评估 IL-B30 在对抗原或同种异型刺激物应答的巨噬细胞/树突细胞活化和抗原提呈测定、 T 细胞细胞因子产生和增殖方面的效应。参

见例如 De Waal Malefyt 等(1991) J. Exp. Med. 174:1209-1220; de Waal Malefyt 等(1991) J. Exp. Med. 174:915-924; Fiorentino 等(1991) J. Immunol. 147, 3815-3822; Fiorentino 等(1991) J. Immunol. 146:3444-3451; 和 Groux 等(1996) J. Exp. Med. 184:19-29 。

也将评估 IL-B30 对 NK 细胞刺激的效应。测定可以基于例如 Hsu 等 (1992) Internat. Immunol. 4:563-569; 和 Schwarz 等 (1994) J. Immumother. 16:95-104 。

将例如通过在 Defrance 等(1992) J. Exp. Med. 175:671-682; Rousset 等(1992) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:1890-1893 中描述的方法，包括 IgG2 和 IgA2 开关因子测定，分析 B 细胞生长和分化效应。

IX. 遗传改变动物的产生和分析

通过标准方法可产生转基因小鼠。这种动物可用来测定在特定组织或在整个所述生物中该基因缺乏的效应。这种动物可以提供对该动物或特定组织在各个阶段中发育的有趣的了解。此外，可以评估对生物胁迫各种反应的效应。参见例如 Hogan 等(1995) Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual (第 2 版) Cold Spring Harbor Laboratory Press 。

已经产生的转基因小鼠，尽管所述动物看来经受得住出生，但不能健康成长，通常在数周内死亡。所述构成物基于具有 CMV 增强子的肌动蛋白启动子，该启动子应该导致宽范围的表达和高表达。象 IL-6 转基因小鼠的小鼠发育不良。此外，它们表现出腹涨、胃和肠有炎症、细胞浸润到肝脏中，通常在第 50 天之前死亡。这些小鼠不能生育。第二亚组的转基因小鼠的表型严重性较低，正在试图繁殖它们。

已经测定了小鼠 IL-B30 的基因组结构。已经开发出产生 IL-B30 失效小鼠的策略，并已经开始构建。

本文引用的所有参考文献均通过引用结合到本文中，对于所有的

目的，其程度与具体和单独地表明每个单独的出版物或专利申请通过引用结合到本文中的程度一样。

可以对本发明进行许多修改和变化，而不偏离本发明的精神和范围，这对于本领域技术人员是显而易见的。提供本文描述的具体实施方案仅仅是举例说明，本发明仅受所附权利要求书的条款以及这些权利要求赋予的相当物的全部范围的限制。

序列表

SEQ ID NO: 1 为灵长类 IL-B30 天然核酸序列。
SEQ ID NO: 2 为灵长类 IL-B30 天然氨基酸序列。
SEQ ID NO: 3 为啮齿动物 IL-B30 天然核酸序列。
SEQ ID NO: 4 为啮齿动物 IL-B30 天然氨基酸序列。
SEQ ID NO: 5 为猪 IL-B30.
SEQ ID NO: 6 为牛 G-CSF.
SEQ ID NO: 7 为猫 G-CSF.
SEQ ID NO: 8 为人 G-CSF.
SEQ ID NO: 9 为小鼠 G-CSF.
SEQ ID NO: 10 为水獭 IL-6.
SEQ ID NO: 11 为猫 IL-6.
SEQ ID NO: 12 为人 IL-6.
SEQ ID NO: 13 为绵羊 IL-6.
SEQ ID NO: 14 为小鼠 IL-6.
SEQ ID NO: 15 为鸡 MGF.
SEQ ID NO: 16 为 KSHV (卡波西肉瘤疱疹病毒)的病毒 IL-6.

(1) 一般资料:

(i) 申请人: Schering Corporation

(ii) 发明名称: 哺乳动物细胞因子; 相关试剂

(iii) 序列数: 16

(iv) 通信地址:
(A) 收信人: Schering Corporation
(B) 街道:2000 Galloping Hill Road
(C) 城市: Kenilworth
(D) 州: New Jersey
(E) 国家: 美国
(F) 邮政编码: 07033-0530

(v) 计算机可读形式:
(A) 媒体类型: 软盘
(B) 计算机: Power Macintosh 7600/120
(C) 操作系统: Windows
(D) 软件: MS Word

(vi) 当前申请资料:

(A) 申请号:
(B) 申请日: 1998 年 7 月 24 日
(C) 分类:

(vii) 在先申请资料:
(A) 申请号: US 08/900,905
(B) 申请日: 1997 年 7 月 25 日

(viii) 代理律师/代理人资料:
(A) 姓名: Thampoe, Immac J.
(B) 注册号: 36,322
(C) 参考/档案号: DX0758K1

(ix) 电信信息:
(A) 电话: (908) 298-5061
(B) 传真: (908) 298-5388

(2) SEQ ID NO:1 的信息:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 570 个碱基对
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(ix) 特征:
(A) 名称/关键词: CDS
(B) 位置: 1..567

(ix) 特征:
(A) 名称/关键词: 成熟肽
(B) 位置: 64..567

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:1:

```
ATG CTG GGG AGC AGA GCT GTA ATG CTG CTG TTG CTG CTG CCC TGG ACA      48
Met Leu Gly Ser Arg Ala Val Met Leu Leu Leu Leu Pro Trp Thr
-21 -20                 -15                 -10
```

```
GCT CAG GGC AGA GCT GTG CCT GGG GGC AGC AGC CCT GCC TGG ACT CAG        96
Ala Gln Gly Arg Ala Val Pro Gly Gly Ser Ser Pro Ala Trp Thr Gln
 -5                   1               5                  10

TGC CAG CAG CTT TCA CAG AAG CTC TGC ACA CTG GCC TGG AGT GCA CAT       144
Cys Gln Gln Leu Ser Gln Lys Leu Cys Thr Leu Ala Trp Ser Ala His
              15                  20                  25

CCA CTA GTG GGA CAC ATG GAT CTA AGA GAA GAG GGA GAT GAA GAG ACT       192
Pro Leu Val Gly His Met Asp Leu Arg Glu Glu Gly Asp Glu Glu Thr
          30                  35                  40

ACA AAT GAT GTT CCC CAT ATC CAG TGT GGA GAT GGC TGT GAC CCC CAA       240
Thr Asn Asp Val Pro His Ile Gln Cys Gly Asp Gly Cys Asp Pro Gln
      45                  50                  55

GGA CTC AGG GAC AAC AGT CAG TTC TGC TTG CAA AGG ATC CAC CAG GGT       288
Gly Leu Arg Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile His Gln Gly
  60                  65                  70                  75

CTG ATT TTT TAT GAG AAG CTG CTA GGA TCG GAT ATT TTC ACA GGG GAG       336
Leu Ile Phe Tyr Glu Lys Leu Leu Gly Ser Asp Ile Phe Thr Gly Glu
                  80                  85                  90

CCT TCT CTG CTC CCT GAT AGC CCT GTG GCG CAG CTT CAT GCC TCC CTA       384
Pro Ser Leu Leu Pro Asp Ser Pro Val Ala Gln Leu His Ala Ser Leu
              95                  100                 105

CTG GGC CTC AGC CAA CTC CTG CAG CCT GAG GGT CAC CAC TGG GAG ACT       432
Leu Gly Leu Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Gly His His Trp Glu Thr
          110                 115                 120

CAG CAG ATT CCA AGC CTC AGT CCC AGC CAG CCA TGG CAG CGT CTC CTT       480
Gln Gln Ile Pro Ser Leu Ser Pro Ser Gln Pro Trp Gln Arg Leu Leu
      125                 130                 135

CTC CGC TTC AAA ATC CTT CGC AGC CTC CAG GCC TTT GTG GCT GTA GCC       528
Leu Arg Phe Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Val Ala Val Ala
  140                 145                 150                 155

GCC CGG GTC TTT GCC CAT GGA GCA GCA ACC CTG AGT CCC TAA               570
Ala Arg Val Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Ser Pro
```

160 165

(2) SEQ ID NO:2 的信息:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 189 个氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:2:

Met Leu Gly Ser Arg Ala Val Met Leu Leu Leu Leu Pro Trp Thr
-21 -20 -15 -10

Ala Gln Gly Arg Ala Val Pro Gly Gly Ser Ser Pro Ala Trp Thr Gln
-5 1 5 10

Cys Gln Gln Leu Ser Gln Lys Leu Cys Thr Leu Ala Trp Ser Ala His
15 20 25

Pro Leu Val Gly His Met Asp Leu Arg Glu Glu Gly Asp Glu Glu Thr
30 35 40

Thr Asn Asp Val Pro His Ile Gln Cys Gly Asp Gly Cys Asp Pro Gln
45 50 55

Gly Leu Arg Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile His Gln Gly
60 65 70 75

Leu Ile Phe Tyr Glu Lys Leu Leu Gly Ser Asp Ile Phe Thr Gly Glu
80 85 90

Pro Ser Leu Leu Pro Asp Ser Pro Val Ala Gln Leu His Ala Ser Leu
95 100 105

Leu Gly Leu Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Gly His His Trp Glu Thr
110 115 120

Gln Gln Ile Pro Ser Leu Ser Pro Ser Gln Pro Trp Gln Arg Leu Leu
125 130 135

Leu Arg Phe Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Val Ala Val Ala
140 145 150 155

Ala Arg Val Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Ser Pro
160 165

(2) SEQ ID NO:3 的信息:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 1203 个碱基对
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(ix) 特征:
(A) 名称/关键词: CDS
(B) 位置: 113..700

(ix) 特征:
(A) 名称/关键词: 成熟肽
(B) 位置: 176..700

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:3:

CGCTTAGAAG TCGGACTACA GAGTTAGACT CAGAACCAAA GGAGGTGGAT AGGGGGTCCA 60

CAGGCCTGGT GCAGATCACA GAGCCAGCCA GATCTGAGAA GCAGGGAACA AG ATG 115
Met
-21

CTG GAT TGC AGA GCA GTA ATA ATG CTA TGG CTG TTG CCC TGG GTC ACT 163
Leu Asp Cys Arg Ala Val Ile Met Leu Trp Leu Leu Pro Trp Val Thr
-20 -15 -10 -5

CAG GGC CTG GCT GTG CCT AGG AGT AGC AGT CCT GAC TGG GCT CAG TGC 211
Gln Gly Leu Ala Val Pro Arg Ser Ser Ser Pro Asp Trp Ala Gln Cys
1 5 10

```
CAG CAG CTC TCT CGG AAT CTC TGC ATG CTA GCC TGG AAC GCA CAT GCA      259
Gln Gln Leu Ser Arg Asn Leu Cys Met Leu Ala Trp Asn Ala His Ala
         15                  20                  25

CCA GCG GGA CAT ATG AAT CTA CTA AGA GAA GAA GAG GAT GAA GAG ACT      307
Pro Ala Gly His Met Asn Leu Leu Arg Glu Glu Glu Asp Glu Glu Thr
     30                  35                  40

AAA AAT AAT GTG CCC CGT ATC CAG TGT GAA GAT GGT TGT GAC CCA CAA      355
Lys Asn Asn Val Pro Arg Ile Gln Cys Glu Asp Gly Cys Asp Pro Gln
 45                  50                  55                  60

GGA CTC AAG GAC AAC AGC CAG TTC TGC TTG CAA AGG ATC CGC CAA GGT      403
Gly Leu Lys Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile Arg Gln Gly
                 65                  70                  75

CTG GCT TTT TAT AAG CAC CTG CTT GAC TCT GAC ATC TTC AAA GGG GAG      451
Leu Ala Phe Tyr Lys His Leu Leu Asp Ser Asp Ile Phe Lys Gly Glu
             80                  85                  90

CCT GCT CTA CTC CCT GAT AGC CCC ATG GAG CAA CTT CAC ACC TCC CTA      499
Pro Ala Leu Leu Pro Asp Ser Pro Met Glu Gln Leu His Thr Ser Leu
         95                  100                 105

CTA GGA CTC AGC CAA CTC CTC CAG CCA GAG GAT CAC CCC CGG GAG ACC      547
Leu Gly Leu Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Asp His Pro Arg Glu Thr
     110                 115                 120

CAA CAG ATG CCC AGC CTG AGT TCT AGT CAG CAG TGG CAG CGC CCC CTT      595
Gln Gln Met Pro Ser Leu Ser Ser Ser Gln Gln Trp Gln Arg Pro Leu
 125                 130                 135                 140

CTC CGT TCC AAG ATC CTT CGA AGC CTC CAG GCC TTT TTG GCC ATA GCT      643
Leu Arg Ser Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Leu Ala Ile Ala
                 145                 150                 155

GCC CGG GTC TTT GCC CAC GGA GCA GCA ACT CTG ACT GAG CCC TTA GTG      691
Ala Arg Val Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Thr Glu Pro Leu Val
             160                 165                 170

CCA ACA GCT TAAGGATGCC CAGGTTCCCA TGGCTACCAT GATAAGACTA              740
Pro Thr Ala
         175
```

ATCTATCAGC CCAGACATCT ACCAGTTAAT TAACCCATTA GGACTTGTGC TGTTCTTGTT 800

TCGTTTGTTT TGCGTGAAGG GCAAGGACAC CATTATTAAA GAGAAAAGAA ACAAACCCCA 860

GAGCAGGCAG CTGGCTAGAG AAAGGAGCTG GAGAAGAAGA ATAAAGTCTC GAGCCCTTGG 920

CCTTGGAAGC GGGCAAGCAG CTGCGTGGCC TGAGGGGAAG GGGGCGGTGG CATCGAGAAA 980

CTGTGAGAAA ACCCAGAGCA TCAGAAAAAG TGAGCCCAGG CTTTGGCCAT TATCTGTAAG 1040

AAAAACAAGA AAAGGGGAAC ATTATACTTT CCTGGGTGGC TCAGGGAAAT GTGCAGATGC 1100

ACAGTACTCC AGACAGCAGC TCTGTACCTG CCTGCTCTGT CCCTCAGTTC TAACAGAATC 1160

TAGTCACTAA GAACTAACAG GACTACCAAT ACGAACTGAC AAA 1203

(2) SEQ ID NO:4 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 196 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:4:

Met Leu Asp Cys Arg Ala Val Ile Met Leu Trp Leu Leu Pro Trp Val
-21 -20 -15 -10

Thr Gln Gly Leu Ala Val Pro Arg Ser Ser Ser Pro Asp Trp Ala Gln
-5 1 5 10

Cys Gln Gln Leu Ser Arg Asn Leu Cys Met Leu Ala Trp Asn Ala His
15 20 25

Ala Pro Ala Gly His Met Asn Leu Leu Arg Glu Glu Glu Asp Glu Glu
30 35 40

Thr Lys Asn Asn Val Pro Arg Ile Gln Cys Glu Asp Gly Cys Asp Pro
45 50 55

Gln Gly Leu Lys Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile Arg Gln
60 65 70 75

Gly Leu Ala Phe Tyr Lys His Leu Leu Asp Ser Asp Ile Phe Lys Gly
80 85 90

Glu Pro Ala Leu Leu Pro Asp Ser Pro Met Glu Gln Leu His Thr Ser
95 100 105

Leu Leu Gly Leu Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Asp His Pro Arg Glu
110 115 120

Thr Gln Gln Met Pro Ser Leu Ser Ser Ser Gln Gln Trp Gln Arg Pro
125 130 135

Leu Leu Arg Ser Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Leu Ala Ile
140 145 150 155

Ala Ala Arg Val Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Thr Glu Pro Leu
160 165 170

Val Pro Thr Ala
175

(2) SEQ ID NO:5 的信息:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 102 个氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(C) 链型: 不适用(not relevant)
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:5:

Ser Cys Leu Gln Arg Ile His Gln Gly Leu Val Phe Tyr Glu Lys Leu
1 5 10 15

Leu Gly Ser Asp Ile Phe Thr Gly Glu Pro Ser Leu His Pro Asp Gly
20 25 30

Ser Val Gly Gln Leu His Ala Ser Leu Leu Gly Leu Arg Gln Leu Leu
35 40 45

Gln Pro Glu Gly His His Trp Glu Thr Glu Gln Thr Pro Ser Pro Ser
50 55 60

Pro Ser Gln Pro Trp Gln Arg Leu Leu Leu Arg Leu Lys Ile Leu Arg
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Phe Val Ala Val Ala Ala Arg Val Phe Ala His Gly
85 90 95

Ala Ala Thr Leu Ser Gln
100

(2) SEQ ID NO:6 的信息:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 174 个氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(C) 链型: 不适用
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:6:

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Arg Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys
1 5 10 15

Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala Asp Gly Ala Glu Leu Gln
20 25 30

Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Met
35 40 45

Leu Leu Arg His Ser Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Ser Ser Cys

50 55 60

Ser Ser Gln Ser Leu Gln Leu Arg Gly Cys Leu Asn Gln Leu His Gly
65 70 75 80

Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile Ser
85 90 95

Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Thr Asp
100 105 110

Phe Ala Thr Asn Ile Trp Leu Gln Met Glu Asp Leu Gly Ala Ala Pro
115 120 125

Ala Val Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala Phe
130 135 140

Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Gln Leu His Arg Phe
145 150 155 160

Leu Glu Leu Ala Tyr Arg Gly Leu Arg Tyr Leu Ala Glu Pro
165 170

(2) SEQ ID NO:7 的信息:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 174 个氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(C) 链型: 不适用
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:7:

Thr Pro Leu Gly Pro Thr Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys
1 5 10 15

Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Val Gln Ala Asp Gly Thr Ala Leu Gln
20 25 30

Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val
35 40 45

Leu Leu Gly His Ala Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Ser Ser Cys
50 55 60

Ser Ser Gln Ala Leu Gln Leu Thr Gly Cys Leu Arg Gln Leu His Ser
65 70 75 80

Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile Ser
85 90 95

Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Met Leu Gln Leu Asp Ile Thr Asp
100 105 110

Phe Ala Ile Asn Ile Trp Gln Gln Met Glu Asp Val Gly Met Ala Pro
115 120 125

Ala Val Pro Pro Thr Gln Gly Thr Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala Phe
130 135 140

Gln Arg Arg Ala Gly Gly Thr Leu Val Ala Ser Asn Leu Gln Ser Phe
145 150 155 160

Leu Glu Val Ala Tyr Arg Ala Leu Arg His Phe Thr Lys Pro
165 170

(2) SEQ ID NO:8 的信息:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 177 个氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(C) 链型: 不适用
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:8:

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys
1 5 10 15

Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln
20 25 30

Glu Lys Leu Val Ser Glu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu
35 40 45

Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu
50 55 60

Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln
65 70 75 80

Leu His Ser Gly Leu Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala
85 90 95

Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu
100 105 110

Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu
115 120 125

Arg His Leu Ala Gln Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu
130 135 140

Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp
145 150 155 160

Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly
165 170 175

Pro

(2) SEQ ID NO:9 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 178 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 不适用

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型：肽

(xi) 序列描述：SEQ ID NO:9:

```
Val Pro Leu Val Thr Val Ser Ala Leu Pro Pro Ser Leu Pro Leu Pro
1               5                  10                  15

Arg Ser Phe Leu Leu Lys Ser Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala
            20                  25                  30

Ser Gly Ser Val Leu Leu Glu Gln Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys
        35                  40                  45

His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Lys
    50                  55                  60

Ala Ser Leu Ser Gly Cys Ser Ser Gln Ala Leu Gln Gln Thr Gln Cys
65                  70                  75                  80

Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu Cys Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln
                85                  90                  95

Ala Leu Ser Gly Ile Ser Pro Ala Leu Ala Pro Thr Leu Asp Leu Leu
            100                 105                 110

Gln Leu Asp Val Ala Asn Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu
        115                 120                 125

Asn Leu Gly Val Ala Pro Thr Val Gln Pro Thr Gln Ser Ala Met Pro
    130                 135                 140

Ala Phe Thr Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Ala Ile
145                 150                 155                 160

Ser Tyr Leu Gln Gly Phe Leu Glu Thr Ala Arg Leu Ala Leu His His
                165                 170                 175

Leu Ala
```

(2) SEQ ID NO:10 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 186 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 不适用

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:10:

```
Ala Phe Pro Thr Pro Gly Pro Leu Gly Gly Asp Ser Lys Asp Asp Ala
1               5                  10                  15

Thr Ser Asn Arg Pro Pro Leu Thr Ser Ala Asp Lys Met Glu Asp Phe
            20                  25                  30

Ile Lys Phe Ile Leu Gly Lys Ile Ser Ala Leu Arg Asn Glu Met Cys
        35                  40                  45

Asp Lys Tyr Asn Lys Cys Glu Asp Ser Lys Glu Val Leu Ala Glu Asn
    50                  55                  60

Asn Leu Asn Leu Pro Lys Leu Ala Glu Lys Asp Arg Cys Phe Gln Ser
65                  70                  75                  80

Arg Phe Asn Gln Glu Thr Cys Leu Thr Arg Ile Thr Thr Gly Leu Gln
                85                  90                  95

Glu Phe Gln Ile His Leu Lys Tyr Leu Glu Ser Asn Tyr Glu Gly Asn
            100                 105                 110

Lys Asp Asn Ala His Ser Val Tyr Ile Ser Thr Lys His Leu Leu Gln
        115                 120                 125

Thr Leu Arg Pro Met Asn Gln Ile Glu Val Thr Thr Pro Asp Pro Thr
    130                 135                 140
```

Thr Asp Ala Ser Leu Gln Ala Leu Phe Lys Ser Gln Asp Lys Trp Leu
145 150 155 160

Lys His Thr Thr Ile His Leu Ile Leu Arg Arg Leu Glu Asp Phe Leu
165 170 175

Gln Phe Ser Leu Arg Ala Ile Arg Ile Met
180 185

(2) SEQ ID NO:11 的信息:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 183 个氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(C) 链型: 不适用
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:11:

Ala Phe Pro Thr Pro Gly Pro Leu Gly Gly Asp Ala Thr Ser Asn Arg
1 5 10 15

Leu Pro Leu Thr Pro Ala Asp Lys Met Glu Glu Leu Ile Lys Tyr Ile
20 25 30

Leu Gly Lys Ile Ser Ala Leu Lys Lys Glu Met Cys Asp Asn Tyr Asn
35 40 45

Lys Cys Glu Asp Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu
50 55 60

Pro Lys Leu Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Gln
65 70 75 80

Glu Thr Cys Leu Thr Arg Ile Thr Thr Gly Leu Gln Glu Phe Gln Ile
85 90 95

Tyr Leu Lys Phe Leu Gln Asp Lys Tyr Glu Gly Asp Lys Glu Asn Ala

100 105 110

Lys Ser Val Tyr Thr Ser Thr Asn Val Leu Leu Gln Met Leu Lys Arg
115 120 125

Lys Gly Lys Asn Gln Asp Glu Val Thr Ile Pro Val Pro Thr Val Glu
130 135 140

Val Gly Leu Gln Leu Ser Cys Ser His Arg Arg Val Ala Glu Ala His
145 150 155 160

Asn Asn His Leu Thr Leu Arg Arg Leu Glu Asp Phe Leu Gln Leu Arg
165 170 175

Leu Arg Ala Val Arg Ile Met
180

(2) SEQ ID NO:12 的信息:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 188 个氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:12:

Ala Phe Pro Ala Pro Val Pro Pro Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala
1 5 10 15

Ala Pro His Arg Gln Pro Leu Thr Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln
20 25 30

Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys
35 40 45

Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn
50 55 60

Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser
65 70 75 80

Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu
85 90 95

Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser
100 105 110

Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln
115 120 125

Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp
130 135 140

Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln
145 150 155 160

Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu
165 170 175

Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala Leu Arg Gln Met
180 185

(2) SEQ ID NO:13 的信息:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 184 个氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(C) 链型: 不适用
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:13:

Ala Phe Pro Thr Pro Gly Pro Leu Gly Glu Asp Phe Lys Asn Asp Thr
1 5 10 15

Thr Pro Ser Arg Leu Leu Leu Thr Thr Pro Glu Lys Thr Glu Ala Leu
20 25 30

Ile Lys His Ile Val Asp Lys Ile Ser Ala Ile Arg Lys Glu Ile Cys
35 40 45

Glu Lys Asn Asp Glu Cys Glu Asn Ser Lys Glu Thr Leu Ala Glu Asn
50 55 60

Lys Leu Lys Leu Pro Lys Met Glu Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser
65 70 75 80

Gly Phe Asn Gln Ala Ile Cys Leu Ile Lys Thr Thr Ala Gly Leu Leu
85 90 95

Glu Tyr Gln Ile Tyr Leu Asp Phe Leu Gln Asn Glu Phe Glu Gly Asn
100 105 110

Gln Glu Thr Val Met Glu Leu Gln Ser Ser Ile Arg Thr Leu Ile Gln
115 120 125

Ile Leu Lys Glu Lys Ile Ala Gly Leu Ile Thr Thr Pro Ala Thr His
130 135 140

Thr Asp Met Leu Glu Lys Met Gln Ser Ser Asn Glu Trp Val Lys Asn
145 150 155 160

Ala Lys Val Ile Ile Ile Leu Arg Ser Leu Glu Asn Phe Leu Gln Phe
165 170 175

Ser Leu Arg Ala Ile Arg Met Lys
180

(2) SEQ ID NO:14 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 188 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 不适用

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:14:

```
Ala Phe Pro Thr Ser Gln Val Arg Arg Gly Asp Phe Thr Glu Asp Thr
1               5                  10                  15

Thr Pro Asn Arg Pro Val Tyr Thr Thr Ser Gln Val Gly Gly Leu Ile
            20                  25                  30

Thr His Val Leu Trp Glu Ile Val Glu Met Arg Lys Glu Leu Cys Asn
        35                  40                  45

Gly Asn Ser Asp Cys Met Asn Asn Asp Asp Ala Leu Ala Glu Asn Asn
    50                  55                  60

Leu Lys Leu Pro Glu Ile Gln Arg Asn Asp Gly Cys Tyr Gln Thr Gly
65                  70                  75                  80

Tyr Asn Gln Glu Ile Cys Leu Leu Lys Ile Ser Ser Gly Leu Leu Glu
                85                  90                  95

Tyr His Ser Tyr Leu Glu Tyr Met Lys Asn Asn Leu Lys Asp Asn Lys
            100                 105                 110

Lys Asp Lys Ala Arg Val Leu Gln Arg Asp Thr Glu Thr Leu Ile His
        115                 120                 125

Ile Phe Asn Gln Glu Val Lys Asp Leu His Lys Ile Val Leu Pro Thr
    130                 135                 140

Pro Ile Ser Asn Ala Leu Leu Thr Asp Lys Leu Glu Ser Gln Lys Glu
145                 150                 155                 160

Trp Leu Arg Thr Lys Thr Ile Gln Phe Ile Leu Lys Ser Leu Glu Glu
                165                 170                 175

Phe Leu Lys Val Thr Leu Arg Ser Thr Arg Gln Thr
            180                 185
```

(2) SEQ ID NO:15 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 178 个氨基酸

(B) 类型：氨基酸
(C) 链型：不适用
(D) 拓扑结构：线性

(ii) 分子类型：肽

(xi) 序列描述：SEQ ID NO:15:

```
Ala Pro Leu Ala Glu Leu Ser Gly Asp His Asp Phe Gln Leu Phe Leu
1               5                  10                  15

His Lys Asn Leu Glu Phe Thr Arg Lys Ile Arg Gly Asp Val Ala Ala
            20                  25                  30

Leu Gln Arg Ala Val Cys Asp Thr Phe Gln Leu Cys Thr Glu Glu Glu
        35                  40                  45

Leu Gln Leu Val Gln Pro Asp Pro His Leu Val Gln Ala Pro Leu Asp
    50                  55                  60

Gln Cys His Lys Arg Gly Phe Gln Ala Glu Val Cys Phe Thr Gln Ile
65                  70                  75                  80

Arg Ala Gly Leu His Ala Tyr His Asp Ser Leu Gly Ala Val Leu Arg
                85                  90                  95

Leu Leu Pro Asn His Thr Thr Leu Val Glu Thr Leu Gln Leu Asp Ala
            100                 105                 110

Ala Asn Leu Ser Ser Asn Ile Gln Gln Gln Met Glu Asp Leu Gly Leu
        115                 120                 125

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

Ser Gly Pro Phe Gln Gln Gln Val Gly Gly Phe Phe Ile Leu Ala Asn
145                 150                 155                 160

Phe Gln Arg Phe Leu Glu Thr Ala Tyr Arg Ala Leu Arg His Leu Ala
                165                 170                 175
```

Arg Leu

(2) SEQ ID NO:16 的信息:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 185 个氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(C) 链型: 不适用
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:16:

Thr Arg Gly Lys Leu Pro Asp Ala Pro Glu Phe Glu Lys Asp Leu Leu
1 5 10 15

Ile Gln Arg Leu Asn Trp Met Leu Trp Val Ile Asp Glu Cys Phe Arg
20 25 30

Asp Leu Cys Tyr Arg Thr Gly Ile Cys Lys Gly Ile Leu Glu Pro Ala
35 40 45

Ala Ile Phe His Leu Lys Leu Pro Ala Ile Asn Asp Thr Asp His Cys
50 55 60

Gly Leu Ile Gly Phe Asn Glu Thr Ser Cys Leu Lys Lys Leu Ala Asp
65 70 75 80

Gly Phe Phe Glu Phe Glu Val Leu Phe Lys Phe Leu Thr Thr Glu Phe
85 90 95

Gly Lys Ser Val Ile Asn Val Asp Val Met Glu Leu Leu Thr Lys Thr
100 105 110

Leu Gly Trp Asp Ile Gln Glu Glu Leu Asn Lys Leu Thr Lys Thr His
115 120 125

Tyr Ser Pro Pro Lys Phe Asp Arg Gly Leu Leu Gly Arg Leu Gln Gly
130 135 140

Leu Lys Tyr Trp Val Arg His Phe Ala Ser Phe Tyr Val Leu Ser Ala
145 150 155 160

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

Asp Val Thr Pro Asp Val His Asp Lys
180 185