(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.
C12N 15/24 (2006.01)

(45) 공고일자 2007년01월11일
(11) 등록번호 10-0666835
(24) 등록일자 2007년01월04일

(21) 출원번호 10-2000-7000786
(22) 출원일자 2000년01월24일
심사청구일자 2003년07월24일
번역문 제출일자 2000년01월24일
(86) 국제출원번호 PCT/US1998/015423
국제출원일자 1998년07월24일
(65) 공개번호 10-2001-0022214
(43) 공개일자 2001년03월15일
(87) 국제공개번호 WO 1999/05280
국제공개일자 1999년02월04일

(81) 지정국 국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 중국, 체코, 에스토니아, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬랜드, 일본, 키르키즈스탐, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 리투아니아, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크맨, 터어키, 트리니아드토바고, 우크라이나, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 루마니아, 러시아, 싱가포르, 크로아티아, 인도네시아, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 가나, 감비아, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탐, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크맨,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우,

(30) 우선권주장 08/900,905 1997년07월25일 미국(US)

(73) 특허권자
쉐링 코포레이션
미국 뉴저지주 07033 케늘워어스시 개롭핑 힐 로드 2000

(72) 발명자
바잔제이페르난도
미국캘리포니아주94025멘로파크유니버시티드라이브775

(74) 대리인
김영관
이병호
홍동오

심사관 : 조명선

전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 인터루킨-B30의 폴리펩타이드, 이를 암호화하는 뉴클레오타이드 및 이에 대한 항체를 포함하는 약제학적 조성물

(57) 요약

포유동물로부터의 사이토킨을 암호화하는 정제된 유전자; 및 정제된 단백질, 특이적 항체, 및 상기 분자를 암호화하는 핵산을 포함하는 이와 관련된 시약이 제공된다. 또한, 상기 시약의 사용 방법 및 진단 키트가 제공된다.

특허청구의 범위

청구항 1.

(a) 서열 2의 성숙한 폴리펩타이드 기원의 148개 이상의 연속 아미노산;

(b) 서열 4의 성숙한 폴리펩타이드 기원의 17개 이상의 연속 아미노산; 또는

(c) 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 항원성 폴리펩타이드를 암호화하는 분리되거나 재조합된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 2.

제1항에 있어서, 서열 2 또는 서열 4의 성숙한 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 3.

제1항에 있어서, 서열 1 또는 서열 3의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 4.

삭제

청구항 5.

제1항의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 6.

제5항의 발현 벡터를 함유하는 숙주 세포.

청구항 7.

폴리뉴클레오타이드가 발현되는 조건하에서, 제6항에 따른 숙주 세포를 배양함을 포함하는, 제1항에 따른 폴리펩타이드의 제조 방법.

청구항 8.

이본쇄를 형성하기에 적합한 조건하에서,

(a) 서열 1(64-567) 또는 (b) 서열 3(176-700)의 25개 이상의 연속 뉴클레오타이드를 포함하는 프로브와 샘플을 접촉시킴을 포함하여, 샘플중의 제1항에 따른 폴리뉴클레오타이드를 검출하는 방법.

청구항 9.

제1항에 따른 폴리뉴클레오타이드의 17개 이상의 연속 뉴클레오타이드와 엄격한 하이브리드화 조건하에 하이브리드화하여 이본쇄를 형성하는

(a) 서열 1(64-567) 또는 (b) 서열 3(176-700)를 포함하는 프로브를 함유하는 구획을 포함하는, 제1항에 따른 폴리뉴클레오타이드 검출용 키트.

청구항 10.

제9항에 있어서, 프로브가 검출가능하게 표지되는 키트.

청구항 11.

1) 서열 2의 성숙한 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하거나,

2) 서열 4의 성숙한 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하거나,

3) 서열 5의 성숙한 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하거나,

4) 사람 IL-B 30 단백질에 특이적으로 결합하거나,

5) 마우스 IL-B 30 단백질에 특이적으로 결합하거나, 또는

6) 돼지 IL-B 30 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 12.

제11항에 있어서,

1) 모노클로날 항체이거나,

2) Fab이거나,

3) $F(ab)_2$이거나,

4) 폴리클로날 항혈청이거나,

5) 검출가능하게 표지되거나;

6) 멸균되거나, 또는

7) 완충 조성물중에 있는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 13.

제11항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을, 항원을 포함하는 생물학적 샘플과 접촉시켜 항체 또는 이의 항원 결합 단편:항원 복합체를 형성시킴을 포함하여, 제11항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 화합물을 사용하는 방법.

청구항 14.

제13항에 있어서, 생물학적 샘플이 사람 기원인 방법.

청구항 15.

제11항 또는 제12항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및

(a) 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 검출에 사용하기 위한 지시 물질 또는

(c) 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 격리하는 구획을 포함하는 검출 키트.

청구항 16.

(a) 서열 2의 성숙한 폴리펩타이드 기원의 148개 이상의 연속 아미노산,

(b) 서열 4의 성숙한 폴리펩타이드 기원의 17개 이상의 연속 아미노산 또는

(c) 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는, 실질적으로 순수하거나 분리된 항원성 폴리펩타이드.

청구항 17.

제16항에 있어서,

a) 가용성 폴리펩타이드이거나,

b) 검출가능하게 표지되거나,

c) 멸균 조성물내에 존재하거나,

d) 완충된 조성물내에 존재하거나,

e) 세포 표면 수용체에 결합하거나,

f) 재조합에 의해 생성되거나, 또는

g) 천연 발생 폴리펩타이드 서열을 갖는 폴리펩타이드.

청구항 18.

삭제

청구항 19.

서열 2, 4 또는 5의 성숙한 폴리펩타이드를 포함하는 포유동물 IL-B 30에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 세포 또는 조직 배양 세포의 생리 또는 성장 조절용 약제학적 조성물.

청구항 20.

제19항에 있어서, 포유동물 IL-B 30에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 (a) G-CSF 또는 IL-6 또는 이 둘의 효능제 또는 길항제 또는,

(b) 서열 2, 4 또는 5의 성숙한 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 항체와 배합되어 존재하는 약제학적 조성물.

청구항 21.

서열 2의 성숙한 폴리펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 분리되거나 재조합된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 22.

서열 2의 성숙한 폴리펩타이드를 포함하는 실질적으로 순수하거나 분리된 폴리펩타이드.

청구항 23.

제7항에 따른 방법에 의해 제조된 폴리펩타이드.

청구항 24.

제16항에 따른 폴리펩타이드 및 이에 대한 상동성 또는 이종성 폴리펩타이드 절편을 포함하는 융합 폴리펩타이드.

청구항 25.

서열 4의 성숙한 폴리펩타이드를 포함하는 분리된 폴리펩타이드.

청구항 26.

서열 2의 아미노산 1-168 또는 서열 4의 아미노산 1-175를 포함하는 분리된 폴리펩타이드.

청구항 27.

서열 2 또는 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩타이드.

청구항 28.

서열 2, 4 및 5로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 분리된 항체.

청구항 29.

서열 2 및 4로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 분리된 뉴클레오타이드.

명세서

기술분야

본 발명은 포유동물 면역계 세포와 같은 포유동물 세포의 생물학 및 생리학의 제어에 관여하는 단백질에 관련된 조성물에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 조혈세포를 포함하는 각종 세포 유형의 활성화, 발달, 분화 및 작용의 조절에 유용한 정제된 유전자, 단백질, 항체 및 관련 시약을 제공한다.

배경기술

재조합 DNA 기술은 일반적으로 숙주내로의 도입과 같은 후속적인 처리를 위해 공여체 공급원의 유전자 정보를 벡터에 통합시키는 기술을 의미하며, 이에 의해 전달된 유전자 정보는 새로운 환경에서 복제 및/또는 발현된다. 통상, 유전자 정보는 목적하는 단백질 생성물을 암호화하는 메신저 RNA(mRNA)로부터 유도된 상보성 DNA(cDNA)의 형태로 존재한다. 캐리어는 종종 이후에 숙주내에서 복제하기 위해 cDNA를 도입시키는 능력 및 몇몇 경우에는 cDNA의 발현을 실제로 제어하여 숙주내에서 암호화된 생성물의 합성을 유도하는 능력을 갖는 플라스미드이다.

한동안, 포유동물 면역 반응은 "면역 네트워크"로서 불리우는 일련의 복잡한 세포 상호반응에 근거하는 것으로 알려져 있었다. 최근의 연구는 이러한 네트워크의 내부 작용에 대해 새롭게 통찰하였다. 대부분의 반응은 사실 임파구, 마크로파지, 과립구 및 다른 세포의 네트워크-유사 상호반응에 관여한다는 것이 명백하지만, 면역학자들은 이제 일반적으로 림포킨, 사이토킨 또는 모노킨으로 공지된 가용성 단백질이 이들 세포 상호반응의 제어에 중요한 역할을 한다는 생각을 갖고 있다. 따라서, 세포 조절 인자의 분리, 특성화 및 작용 기작에 상당한 관심이 있으며, 이들의 이해는 면역계 질환과 같은 다수의 의학적 비정상의 진단 및 치료에 있어서 현저한 진전을 유도할 것이다. 이들 인자중 몇몇은 조혈 성장 인자, 예를 들어 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF)이다[참조: Thomson(1994; ed.) The Cytokine Handbook (2d ed.) Academic Press, San Diego; Metcalf and Nicola (1995) The Hematopoietic Colony Stimulating Factors Cambridge University Press; and Aggarwal and Gutterman (1991) Human Cytokines Blackwell Pub].

림포킨은 명백히 다양한 경로로 세포 활성을 매개한다. 이들은 복잡한 면역계를 구성하는 다양한 세포계통을 포함하는 다수의 원종세포내로 다작용성 조혈 모세포의 증식, 성장 및 분화를 지지하는 것으로 나타났다. 세포 성분간의 적절하고 균형 잡힌 상호반응은 건강한 면역 반응에 필요하다. 상이한 세포계통은 종종 림포킨이 다른 제제와 함께 투여되면 상이한 방식으로 반응한다.

면역 반응에 특히 중요한 세포계통에는 2가지 부류의 임파구, 즉 면역글로불린(외래 물질을 인지하여 결합함으로써 이의 제거를 수행하는 능력을 갖는 단백질)을 생성 및 분비할 수 있는 B-세포, 및 림포킨을 분비하고 B-세포 및 다양한 다른 세포(다른 T-세포 포함)를 유도 또는 억제하여 면역 네트워크를 구성하는 T-세포가 포함된다. 이들 임파구는 다양한 다른 세포 유형과 상호반응한다.

또다른 중요한 세포계통은 비만 세포(모든 포유동물 종에서 명확하게 확인되지 않았음)로서, 이는 신체 전체에 걸쳐 모세관에 인접하여 위치하는 과립-함유 결합 조직 세포이다. 이들 세포는 폐, 피부 및 위장관과 생식관에서 특히 고농도로 발견되었다. 비만 세포는 선택된 항원이 비만 세포 표면상의 수용체에 결합된 특정한 부류의 면역글로불린과 교차결합하고, 비만 세포가 매개자(예: 히스타민, 세로토닌, 헤파린 및 프로스타글란딘)를 탈과립화하고 이를 방출하는 경우에 알레르기성 반응(예: 과민증)을 유발하는 알레르기-관련 질환, 특히 과민증에서 중요한 역할을 담당한다.

각종 면역 질환을 이해하고 치료하기 위한 연구는 시험관내에서 면역계 세포를 일반적으로 유지하지 못하여 제한되어 왔다. 면역학자들은 다수의 림포킨을 포함하여 다양한 성장 인자를 함유하는 T-세포 및 다른 세포 상청액을 사용함으로써 이들 세포를 배양할 수 있음을 발견하였다.

상기로부터, 예를 들어 G-CSF 및/또는 IL-6과 관련된 새로운 림포킨의 발견 및 개발이 면역계 및/또는 조혈 세포를 직접 또는 간접적으로 수반하는 다양한 퇴화 또는 비정상 질환에 대한 새로운 치료법에 기여할 수 있음을 입증한다. 특히, 공지된 림포킨의 유리한 활성을 향상 또는 강화시키는 림포킨의 발견 및 개발이 매우 유리할 것이다. 본 발명은 새로운 인터루킨 조성물 및 관련된 화합물, 및 이들의 사용 방법을 제공한다.

발명의 요약

본 발명은 포유동물(예: 설치류, 개과, 고양이과, 및 영장류)의 인터루킨-B30(IL-B30) 및 이의 생물학적 활성에 관한 것이다. 본 발명은 폴리펩타이드 자체를 암호화하는 핵산 및 이들의 생산 및 사용 방법을 포함한다. 본 발명의 핵산은 본원에 포함된 클론된 상보성 DNA(cDNA) 서열과의 상동성, 및/또는 성장 인자- 또는 사이토킨-유사 활성에 대한 작용성 검정물, 예를 들어 G-CSF[참조: Nagata (1994) in Thomson The Cytokine Handbook 2d ed., Academic Press, San Diego] 및/또는 전형적으로 이들 핵산에 의해 암호화된 상기 폴리펩타이드에 적용된 IL-6[참조: Hirano (1994) in Thomson The Cytokine Handbook 2d ed., Academic Press, San Diego]을 부분적으로 특징으로 한다. 성장 인자 의존성 생리학 또는 면역 반응의 조절을 조정 또는 간섭하는 방법이 제공된다.

본 발명은 부분적으로 G-CSF 및 IL-6에 대해 현저한 서열 및 구조적 유사성을 나타내는 신규한 사이토킨 서열의 발견에 기초하고 있다. 특히, 성숙한 크기가 168개 아미노산인 단백질을 암호화하는 영장류(예: 사람) 유전자 및 돼지와 쥐과(예: 마우스) 서열을 제공한다. 현저한 서열 상동성을 나타내는 작용성 등가물은 다른 포유동물(예: 소, 말 및 랫트) 및 비-포유동물 종으로부터 이용할 수 있다.

다양한 단백질 양태에 있어서, 본 발명은 서열 2에 대해 약 12개 이상의 아미노산 길이에 걸쳐 약 85% 이상의 서열 동일성을 나타내는 실질적으로 순수한 또는 재조합 IL-B30 단백질 또는 펩타이드; 서열 2의 천연 서열 IL-B30 및 IL-B30 서열을 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 특정한 양태에 있어서, 약 9개 이상의 아미노산 부분의 상동성은 약 90% 이상의 동일성이고, 약 17개 이상의 아미노산 부분의 상동성은 약 80% 이상의 동일성이며, 약 25개 이상의 아미노산 부분의 상동성은 약 70% 이상의 동일성이다. 다른 양태에 있어서, IL-B30은 표 1의 성숙한 서열을 포함하거나 천연 IL-B30과는 다른 해독후 변형 패턴을 나타내며; 당해 단백질 또는 펩타이드는 영장류를 포함하는 포유동물중에서 선택된 온혈 동물로부터 기원하거나, 서열 2의 하나 이상의 폴리펩타이드 절편을 포함하거나, 동일성을 나타내는 복수의 부분을 나타내거나, IL-B30의 천연 대립인자 변이체이거나, 약 30개 이상의 아미노산 길이를 가지거나, 포유동물 IL-B30에 특이적인 2개 이상의 비-중첩 에피토프를 나타내거나, 포유동물 IL-B30에 대해 약 20개 이상의 아미노산 길이에 걸쳐 약 90% 이상의 서열 동일성을 나타내거나, 글리코실화되거나, 천연 글리코실화에 의해 10kD 이상의 분자량을 가지거나, 합성 폴리펩타이드이거나, 고체 기질에 부착하거나, 또다른 화학적 잔기와 접합되거나, 천연 서열에서 5배 이하로 치환되거나, 천연 서열의 결실 또는 삽입 변이체이다. 바람직한 양태에는 멸균 IL-B30 단백질 또는 펩타이드, 또는 IL-30 단백질 또는 펩타이드와 담체를 포함하는 조성물이 포함되며, 여기서 담체는 물, 염수 및/또는 완충제를 포함하는 수성 화합물이고/이거나 경구, 직장, 비내, 국소 또는 비경구 투여용으로 제형화된다. 융합 단백질 양태에 있어서, 당해 단백질은 표 1의 성숙한 단백질 서열; FLAG, His6 또는 Ig 서열을 포함하는 검출 또는 정제 태그(tag) 및/또는 또다른 사이토킨 또는 케모킨 서열을 포함할 수 있다.

키트 양태에는 IL-B30 단백질 또는 폴리펩타이드, 및 당해 단백질 또는 폴리펩타이드를 포함하는 구획; 및/또는 키트중의 시약을 사용 또는 분산시키기 위한 사용법을 갖는 것들이 포함된다.

결합 화합물 양태에 있어서, 당해 화합물은 천연 IL-B30 단백질과 특이적으로 결합하는 항체로부터의 항원 결합 부위를 포함할 수 있는데, 여기서 IL-B30은 포유동물 단백질이고, 결합 화합물은 Fv, Fab, 또는 Fab_2 단편이며, 결합 화합물은 또다른 화학적 잔기 또는 항체에 접합되고, 이때 항체는 표 1의 성숙한 폴리펩타이드의 펩타이드 서열에 대해 유도되거나 정제된 설치류 IL-B30에 대해 유도되며, 면역선택되거나, 폴리클로날 항체이거나, 변성된 IL-B30에 결합하거나, 30μM 이상의 Kd를 나타내거나, 비드 또는 플라스틱 막을 포함하는 고체 기질에 부착되거나, 멸균 조성물내에 존재하거나, 방사활성 또는 형광 표지를 포함하는 표지로 검출가능하게 표지된다. 결합 화합물을 함유하는 키트에는 결합 화합물을 포함하는

구획 및/또는 키트중의 시약을 사용 또는 분산시키기 위한 장치를 갖는 것들이 포함된다. 종종, 키트는 정성 또는 정량 분석을 가능케 한다. 바람직한 조성물은 멸균 결합 화합물; 또는 결합 화합물 및 물, 염수 및/또는 완충제를 포함하는 수성 화합물인 담체를 포함할 수 있고; 경구, 직장, 비내, 국소 또는 비경구 투여를 위해 제형화될 것이다.

핵산 양태는 IL-B30 단백질 또는 펩타이드 또는 융합 단백질을 암호화하는 분리된 또는 재조합 핵산을 포함하는데, 여기서 IL-B30은 포유동물 기원이고/이거나, 핵산은 표 1의 항원성 펩타이드 서열을 암호화하거나, 표 1중의 복수의 항원성 펩타이드 서열을 암호화하거나, 당해 절편을 암호화하는 천연 cDNA와 약 80% 이상의 동일성을 나타내거나, 발현 벡터이거나, 복제 기원을 추가로 포함하거나, 천연 공급원 기원이거나, 검출가능한 표지를 포함하거나, 합성 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 6kb 미만, 바람직하게는 3kb 미만이거나, 영장류를 포함하는 포유동물로부터 기원하거나, 천연의 전체 길이 암호화 서열을 포함하거나, IL-B30을 암호화하는 유전자에 대한 하이브리드화 프로브이거나, PCR 프라이머, PCR 생성물 또는 돌연변이유발 프라이머이다. 또한, 본 발명은 이러한 재조합 핵산을 포함하는 세포, 조직 또는 기관을 제공하며, 바람직한 세포는 원핵 세포, 진핵 세포, 세균 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 포유동물 세포, 마우스 세포, 영장류 세포 또는 사람 세포일 것이다.

키트 양태에는 상기와 같은 핵산, 및 당해 핵산을 포함하고 IL-B30 단백질 또는 폴리펩타이드를 추가로 포함하는 구획 및/또는 키트중의 시약을 사용 또는 분산시키기 위한 사용법을 갖는 것들이 포함된다. 전형적으로, 키트는 정량 또는 정성 분석을 가능케 한다.

특정한 양태에 있어서, 핵산은 30℃ 및 2M 미만의 염, 또는 45℃ 및/또는 500mM의 염, 또는 55℃ 및/또는 150mM의 염의 세척 조건하에 서열 1과 하이브리드화하거나, 영장류 IL-B30에 대해 약 85% 이상의 동일성을 나타내고/내거나 스트렛치가 약 30개 이상의 뉴클레오타이드이거나, 영장류 IL-B30에 대해 90% 이상의 동일성을 나타내고/내거나 스트렛치가 55개 이상의 뉴클레오타이드이거나, 영장류 IL-B30에 대해 95% 이상의 동일성을 나타내고/내거나 스트렛치가 75개 이상의 뉴클레오타이드이다.

본 발명은 세포 또는 조직 배양 세포를 포유동물 IL-B30의 효능제 또는 길항제와 접촉시킴을 포함하는, 세포 또는 조직 배양 세포의 생리 또는 발달을 조절하는 방법을 포함한다. 본 발명의 방법은 G-CSF 및/또는 IL-6의 효능제 또는 길항제와 함께 접촉시키거나, IL-B30과 특이적으로 결합하는 항체 결합 부위를 포함하는 결합 조성물을 포함하는 길항제와 접촉시킬 수 있다.

발명의 상세한 설명

본원에 인용된 모든 문헌은 각각의 개별적인 공보 또는 특허원이 구체적 및 개별적으로 참조로서 인용되는 바와 동일한 정도로 본원에서 참조로서 인용된다.

I. 일반 원리

본 발명은 사이토킨, 예를 들어 면역 또는 다른 세포 사이의 시그날을 조절할 수 있는 분비된 분자인 각종 포유동물 단백질을 암호화하는 아미노산 서열 및 DNA 서열을 제공한다[참조: Paul (1994) Fundamental Immunology (3d ed.) Raven Press, N.Y.]. 전체 길이의 사이토킨 및 단편 또는 길항제는 수용체를 발현하는 세포의 생리학적 조절에 유용할 것이다. IL-B30은 예를 들어 T-세포, B-세포, 천연 킬러(NK) 세포, 마크로파지, 수지상 세포, 조혈 원종세포 등과 같은 림프계 세포를 포함하는 조혈 세포에 대한 자극 또는 억제 효과를 갖는 것 같다. 상기 단백질은 또한 단백질상의 각종 에피토프(선형 및 구조적 에피토프 모두)에 대해 항체를 생성하기 위한 항원(예: 면역원)으로서 유용할 것이다.

IL-B30을 암호화하는 cDNA는 사람 세포주로부터 확인되었다. 당해 분자는 huIL-B30으로 명명되었다. 돼지 서열에 상응하는 관련된 유전자가 또한 확인되었다. 또한, 마우스와 같은 설치류 서열이 기재되어 있다.

사람 유전자는 약 168개 아미노산으로 이루어진 소형의 가용성 사이토킨-유사 단백질을 암호화한다. 시그날 서열은 바람직하게는 약 21개 잔기이며, Met로부터 대략 Ala까지 이를 것이다(표 1 및 서열 1 및 2 참조). IL-B30은 장쇄 사이토킨의 구성원의 구조적 모티프 특성를 나타낸다. 예를 들면, GenBank로부터 입수가능한 IL-B30, G-CSF 및 IL-6의 서열을 비교하라(표 2 참조).

[표 1a]

영장류(예: 사람)의 IL-B30을 암호화하는 핵산(서열 1). 해독된 아미노산 서열은 서열 2이다.

```
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
```

[표 1b]

```
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
```

암호화 서열:

```
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
```

설치류(예: 마우스)의 IL-B30(서열 3 및 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
```

[표 1c]

```
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
```

[표 2a]

IL-B30과 비교된 각종 IL-6 및 G-CSF 양태의 비교. 사람 IL-B30은 서열 2이고, 마우스 IL-B30은 서열 4이며, 돼지 IL-B30은 서열 5이고, 소 G-CSF는 서열 6이며, 고양이 G-CSF는 서열 7이고, 사람 G-CSF는 서열 8이며, 마우스 G-CSF는 서열 9이고, 수달 IL-6은 서열 10이며, 고양이 IL-6은 서열 11이고, 사람 IL-6은 서열 12이며, 양 IL-6은 서열 13이고, 마우스 IL-6은 서열 14이며, 닭 MGF는 서열 15이고, KSHV, 카포시 육종 헤르페스 바이러스, 바이러스 IL-6은 서열 16이다.

```
 il30_human  .......... ......VPGG SSPVWTQCQQ LSQKLCT.LA WSAHPLVG..
 il30_mouse  .......... ......VPRS SSPDWAQCQQ LSRNLCM.LA WNAHAPAG..
   il30_pig  .......... .......... .......... .......... ..........
 gcsf_bovin  ......TPLG P.......AR SLPQSFLLKC LEQVRKIQAD GAELQERL..
 gcsf_felca  ......TPLG P.......TS SLPQSFLLKC LEQVRKVQAD GTALQERL..
 gcsf_human  ......TPLG P.......AS SLPQSFLLKC LEQVRKIQGD GAALQEKLVS
 gcsf_mouse  VPLVTVSALP P.......SL PLPRSFLLKS LEQVRKIQAS GSVLLEQL..
  il6_otter  .AFPTPGPLG GDSKDDATSN RPPLTSADKM EDFIKFILGK ISALRNEM..
  il6_felca  .AFPTPGPLG G....DATSN RLPLTPADKM EELIKYILGK ISALKKEM..
  il6_human  .AFPAPVPPG EDSKDVAAPH RQPLTSSERI DKQIRYILDG ISALRKET..
  il6_sheep  .AFPTPGPLG EDFKNDTTPS RLLLTTPEKT EALIKHIVDK ISAIRKEI..
  il6_mouse  .AFPTSQVRR GDFTEDTTPN R.PVYTTSQV GGLITHVLWE IVEMRKEL..
  mgf_chick  .......... .APLAELSGD HDFQLFLHKN LEFTRKIRGD VAALQRAV..
   il6_khsv  .......... .......TRG KLPDAPEFEK DLLIQRLNWM LWVIDECFRD

 il30_human  .HMD.LREEG DEETTNDVPH I...QCGDGC DPQGLRDNSQ FCLQRIHQGL
 il30_mouse  .HMNLLREEE DEETKNNVPR I...QCEDGC DPQGLKDNSQ FCLQRIRQGL
   il30_pig  .......... .......... .......... .......... SCLQRIHQGL
 gcsf_bovin  .CAA.HKLCH PEELMLLRHS LGIP.QAPLS SCSSQSLQLR GCLNQLHGGL
 gcsf_felca  .CAA.HKLCH PEELVLLGHA LGIP.QAPLS SCSSQALQLT GCLRQLHSGL
 gcsf_human  ECAT.YKLCH PEELVLLGHS LGIP.WAPLS SCPSQALQLA GCLSQLHSGL
 gcsf_mouse  .CAT.YKLCH PEELVLLGHS LGIP.KASLS GCSSQALQQT QCLSQLHSGL
  il6_otter  .CDK.YNKCE DSKEVLAENN LNLPKLAEKD RCFQSRFNQE TCLTRITTGL
  il6_felca  .CDN.YNKCE DSKEALAENN LNLPKLAEKD GCFQSGFNQE TCLTRITTGL
  il6_human  .CNK.SNMCE SSKEALAENN LNLPKMAEKD GCFQSGFNEE TCLVKIITGL
  il6_sheep  .CEK.NDECE NSKETLAENK LKLPKMEEKD GCFQSGFNQA ICLIKTTAGL
  il6_mouse  .CNG.NSDCM NNDDALAENN LKLPEIQRND GCYQTGYNQE ICLLKISSGL
  mgf_chick  .CDT.FQLCT EEELQLVQPD PHLV.QAPLD QCHKRGFQAE VCFTQIRAGL
   il6_khsv  LCYR.TGICK GILEPAAIFH LKLPAINDTD HCGLIGFNET SCLKKLADGF

 il30_human  IFYEKLLGSD IFTGE..... .PSLLPDSPV AQLHASLLGL SQLLQPE..G
 il30_mouse  AFYKHLLDSD IFKGE..... .PALLPDSPM EQLHTSLLGL SQLLQPE..D
   il30_pig  VFYEKLLGSD IFTGE..... .PSLHPDGSV GQLHASLLGL RQLLQPE..G
 gcsf_bovin  FLYQGLLQAL AGIS..... .PELAPTLDT LQLDVTDFAT NIWLQMEDLG
 gcsf_felca  FLYQGLLQAL AGIS..... .PELAPTLDM LQLDITDFAI NIWQQMEDVG
 gcsf_human  FLYQGLLQAL EGIS..... .PELGPTLDT LQLDVADFAT TIWQQMEELG
 gcsf_mouse  CLYQGLLQAL SGIS..... .PALAPTLDL LQLDVANFAT TIWQQMENLG
  il6_otter  QEFQIHLKYL ESNYEG...N KDNAHSVYIS TKHLLQTLRP M..NQIEVTT
  il6_felca  QEFQIYLKFL QDKYEG...D KENAKSVYTS TNVLLQMLKR KGKNQDEVTI
  il6_human  LEFEVYLEYL QNRFES...S EEQARAVQMS TKVLIQFLQK KAKNLDAITT
  il6_sheep  LEYQIYLDFL QNEFEG...N QETVMELQSS IRTLIQILKE KIAGL....I
  il6_mouse  LEYHSYLEYM KNNLKDN..K KDKARVLQRD TETLIHIFNQ EVKDLHKIVL
  mgf_chick  HAYHDSLGAV LRLLP..... ..NHTTLVET LQLDAANLSS NIQQQMEDLG
   il6_khsv  FEFEVLFKFL TTEFGKSVIN VDVMELLTKT LGWDIQEELN KLTKTHY..S
```

[표 2b]

```
 il30_human  HHWETQQIP. .SLSPSQ..P WQRLLLRFKI LRSLQAFVAV AARVFAHGAA
 il30_mouse  HPRETQQMP. .SLSSSQ..Q WQRPLLRSKI LRSLQAFLAI AARVFAHGAA
   il30_pig  HHWETEQTP. .SPSPSQ..P WQRLLLRLKI LRSLQAFVAV AARVFAHGAA
 gcsf_bovin  AAPAVQPTQ. .GAMPTFTSA FQRRAGGVLV ASQLHRFLEL AYRGLRYLAE
 gcsf_felca  MAPAVPPTQ. .GTMPTFTSA FQRRAGGTLV ASNLQSFLEV AYRALRHFTK
 gcsf_human  MAPALQPTQ. .GAMPAFASA FQRRAGGVLV ASHLQSFLEV SYRVLRHLAQ
 gcsf_mouse  VAPTVQPTQ. .SAMPAFTSA FQRRAGGVLA ISYLQGFLET ARLALHHLA.
  il6_otter  PDPTTDASL. .QALFKSQDK WLKHTTIHLI LRRLEDFLQF SLRAIRIM..
  il6_felca  PVPTVEVGL. .QLSCSHR.R VAEAHNNHLT LRRLEDFLQL RLRAVRIM..
  il6_human  PDPTTNASL. .LTKLQAQNQ WLQDMTTHLI LRSFKEFLQS SLRALRQM..
  il6_sheep  TTPATHTDM. .LEKMQSSNE WVKNAKVIII LRSLENFLQF SLRAIRMK..
  il6_mouse  PTPISNALL. .TDKLESQKE WLRTKTIQFI LKSLEEFLKV TLRSTRQT..
  mgf_chick  LDTVTLPAEQ RSPPPTFSGP FQQQVGGFFI LANFQRFLET AYRALRHLAR
   il6_khsv  P.PKFDRG.. LLGRLQGLKY WVRHFASFYV LSAMEKFAGQ AVRVLDSIPD

 il30_human  TLSP....
 il30_mouse  TLTEPLVPTA
   il30_pig  TLSQ....
 gcsf_bovin  P.......
 gcsf_felca  P.......
 gcsf_human  P.......
 gcsf_mouse  ........
  il6_otter  ........
  il6_felca  ........
  il6_human  ........
  il6_sheep  ........
  il6_mouse  ........
  mgf_chick  L.......
   il6_khsv  VTPDVHDK
```

관련된 사이토킨 단백질에 대한 IL-B30의 구조적 상동성은 당해 분자의 관련된 작용을 시사한다. IL-B30은 IL-6 및 G-CSF와 서열 유사성을 나타내는 장쇄 사이토킨이다.

또한, IL-B30 효능제 또는 길항제는 예를 들어 각각의 수용체에 대한 IL-6 또는 G-CSF의 결합을 차단하는 작용성 또는 수용체 길항제로서 작용하거나, 반대의 작용을 매개할 수 있다. 따라서, IL-B30 또는 이의 길항제는 예를 들어 T 세포 면역 결핍증, 만성 염증 또는 조직 거부와 같은 면역 질환을 포함하는 의학적 비정상 상태 또는 심혈관 또는 신경생리학적 질환에 유용할 수 있다.

천연 항원은 표적 세포에서 생물학적 또는 생리학적 반응을 유도하는 각종 생화학적 반응을 매개할 수 있다. 본원에서 특징으로 하는 바람직한 양태는 사람 기원이지만, 기타 영장류 또는 다른 종의 상응물이 천연에 존재한다. 또한, 예를 들어 영장류, 개과, 고양이과 및 설치류와 같은 다른 포유동물 종의 단백질에 대한 또다른 서열을 이용할 수 있다(하기 참조). 하기의 상세한 설명은 사람 IL-B30의 예시를 위한 것이며, 또한 다른 종으로부터의 관련된 양태에 적용할 수 있다.

II. 정제된 IL-B30

사람 IL-B30 아미노산 서열은 서열 2내에 하나의 양태로서 제시된다. 당해 단백질을 암호화하는 다른 천연 발생 핵산은 제공된 서열을 사용하는 표준 기술(예: PCR 기술) 또는 하이브리드화에 의해 분리할 수 있다. 카복시에 아미노가 제공된 이들 아미노산 서열은 다른 단백질로부터 단백질 항원을 구별하게 하는 사이토킨에 대한 서열 정보를 제공하고 다수의 변이체를 예시하는데 중요하다. 더욱이, 펩타이드 서열은 이러한 절편을 인지하는 항체를 생성하기 위한 펩타이드를 제조 가능하게 하며, 뉴클레오타이드 서열은 올리고뉴클레오타이드 프로브를 제조 가능하게 하는데, 이들 모두는 상기 서열을 암호화하는 유전자의 검출 또는 분리(예: 클로닝)를 위한 전략이다.

본원에 사용된 바와 같이, 용어 "사람 가용성 IL-B30"은 단백질과 관련하여 사용하는 경우 서열 2에 제시된 가용성 폴리펩타이드에 상응하는 아미노산 서열 또는 이의 중요한 단편을 갖는 단백질을 포함한다. 바람직한 양태는 특정한 길이의 독특한(예: 비중첩되는) 절편 복수개를 포함한다. 전형적으로, 복수개는 2개 이상, 보다 통상적으로는 3개 이상, 및 바람직하게는 5개, 7개 또는 그 이상일 것이다. 길이의 하한치가 제공되었으나, 다양한 크기의 보다 긴 길이, 예를 들어 7개 길이 하나 및 12개 길이 2개가 적합할 수 있다.

결합 성분(예: 항체)은 전형적으로 고도의 친화성, 예를 들어 약 100nM 이상, 통상적으로 바람직하게는 약 30nM 이상, 바람직하게는 약 10nM 이상, 및 더욱 바람직하게는 약 3nM 이상으로 IL-B30에 결합한다. 대응 단백질은 사람 이외의 다른 포유동물 종, 예를 들어 기타 영장류, 유제 동물 또는 설치류에서 발견될 것이다. 또한, 비-포유동물 종(예: 조류 또는 양서류)은 구조적 또는 작용적으로 관련된 유전자 및 단백질을 가져야 한다.

본원에 사용된 용어 "폴리펩타이드"는 중요한 단편 또는 절편을 포함하며, 약 8개 이상의 아미노산, 일반적으로 약 12개 이상의 아미노산, 전형적으로 약 16개 이상의 아미노산, 바람직하게는 약 20개 이상의 아미노산, 및 특히 바람직한 양태에서는 약 30개 이상의 아미노산, 예를 들어 35개, 40개, 45개, 50개 등의 아미노산으로 이루어진 아미노산 잔기 스트렛치를 포함한다. 이러한 단편은 실질적으로 모든 위치에서 시작 및/또는 종결하는 말단, 예를 들어 실질적인 모든 조합에 있어서 잔기 1번, 2번, 3번 등에서 시작하여 예를 들어 잔기 150번, 149번, 148번 등에서 종결하는 말단을 가질 수 있다. 특히 중요한 펩타이드는 구조적 도메인 경계에 상응하는 말단, 예를 들어 헬릭스 A, B, C, 및/또는 D를 갖는다(표 1 참조).

용어 "결합 조성물"은 예를 들어 항체-항원 상호반응으로 IL-B30에 특이적으로 결합하는 분자를 의미한다. 특이성은 다소간 포괄적인, 예를 들면 특정한 양태 또는 관련된 양태의 그룹, 예를 들어 영장류, 설치류 등에 대체로 특이적일 수 있다. 또한, 여기에는 천연의 생리학적으로 관련된 단백질-단백질 상호반응, 즉 공유 또는 비-공유 결합으로 IL-B30과 특이적으로 결합되는 화합물(예: 단백질)을 포함한다. 당해 분자는 중합체 또는 화학적 시약일 수 있다. 작용성 동족체는 구조적으로 변형된 단백질이거나, 적절한 결합 결정기와 상호반응하는 분자 형상을 갖는 분자일 수 있다. 당해 화합물은 수용체 결합 상호반응의 효능제 또는 길항제로서 작용될 수 있다[참조: Goodman, et al. (eds.) Goodman & Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics (current ed.) Pergamon Press].

단백질과 관련하여, "실질적으로 순수한"이란 전형적으로 당해 단백질이 최초 공급 유기체로부터 유래된 다른 오염된 단백질, 핵산 또는 다른 생물제를 포함하지 않는다는 것을 의미한다. 순도는 표준 방법, 전형적으로 중량에 의해 분석될 수도 있으며, 기본적으로 약 40% 이상, 일반적으로 약 50% 이상, 종종 약 60% 이상, 전형적으로 약 80% 이상, 바람직한 양태에서는 약 90% 이상 및 가장 바람직한 양태에서는 약 95% 이상 순수할 것이다. 담체 또는 부형제가 종종 첨가될 수도 있다.

폴리펩타이드 또는 단편의 용해도는 환경 및 당해 폴리펩타이드에 따라 달라진다. 폴리펩타이드 용해도는 온도, 전해질 환경, 당해 폴리펩타이드의 크기 및 분자 특성, 및 용매의 성질을 포함하는 다양한 요인에 영향을 받는다. 전형적으로, 폴리펩타이드가 사용되는 온도는 약 4℃ 내지 약 65℃ 범위이다. 통상적으로, 사용 온도는 약 18℃ 초과이다. 진단 목적을 위해, 온도는 통상적으로 실온 또는 그 이상일 수 있지만, 검정시 성분의 변성 온도보다는 낮을 것이다. 치료 목적을 위해, 온도는 일반적으로 체온, 전형적으로 사람 및 마우스의 경우 약 37℃일 수 있으나, 특정한 상황하에서는 당해 온도를 동일계 또는 시험관내에서 증감시킬 수 있다.

당해 폴리펩타이드의 크기 및 구조는 실질적으로 안정한 상태로 존재해야 하며, 일반적으로 변성된 상태로 존재하지는 않는다. 폴리펩타이드는 예를 들어 용해성을 제공하기 위해 4차 구조로 다른 폴리펩타이드와 결합되거나, 지질 또는 세정제와 결합될 수 있다.

용매 및 전해질은 일반적으로 생물학적 활성의 보존에 사용되는 유형의 생물학적으로 적합한 완충제일 수 있고, 통상적으로 생리학적 수성 용매에 유사할 것이다. 통상적으로, 용매는 중성 pH, 통상적으로 약 5 내지 10의 pH, 및 바람직하게는 약 7.5의 pH를 가질 것이다. 몇몇 경우에, 하나 이상의 세정제를 가할 수 있으며, 전형적으로 온화한 비-변성 세정제, 예를 들어 CHS(콜레스테릴 헤미석시네이트) 또는 CHAPS(3-[3-콜아미도프로필)디메틸암모니오]-1-프로판 설포네이트) 또는 단백질의 구조적 또는 생리학적 특성의 현저한 붕괴를 피하기에 충분히 낮은 농도의 세정제를 가할 수 있다. 다른 예에 있어서, 강한 세정제를 사용하여 상단한 변성을 유발할 수 있다.

III. 물리적 변이체

본 발명은 또한 IL-B30 항원의 아미노산 서열과 실질적으로 아미노산 서열 동일성을 갖는 단백질 또는 펩타이드를 포함한다. 이러한 변이체에는 종 변이체, 다형성 변이체 또는 대립인자 변이체가 포함된다.

아미노산 서열 상동성 또는 서열 동일성은 잔기의 매치를 최적화함으로써, 필요한 경우, 경우에 따라 갭을 도입함으로써 측정한다[참조: Needleham, et al. (1970) J. Mol. Biol. 48: 443-453; Sankoff, et al. (1983) Chapter One in Time Warps, String Edits, and Macromolecules: The Theory and Practice of Sequence Comparison, Addison-Wesley, Reading, MA; and software packages from IntelliGenetics, Mountain View, CA; and the University of Wisconsin Genetics Computer Group, Madison, WI]. 서열 동일성은 매치에 따른 보존 치환을 고려할 때 변화한다. 보존 치환은 전형적으로 하기 그룹내의 치환을 포함한다: 글리신, 알라닌; 발린, 이소류신, 류신; 아스파르트산, 글루탐산; 아스파라긴, 글루타민; 세린, 트레오닌; 리신, 아르기닌 및 페닐알라닌, 티로신. 보존은 생물학적 특징, 기능적 특징 또는 구조적 특징에 적용될 수 있다. 상동성 아미노산 서열은 전형적으로 단백질 서열의 천연 다형성 또는 대립인자 및 종간 변이체가 포함된다. 전형적인 상동성 단백질 또는 펩타이드는 IL-B30의 아미노산 서열과 25 내지 100%의 동일성(갭이 도입되는 경우), 50 내지 100%의 동일성(보존 치환이 포함되는 경우)을 가질 것이다. 동일성 측정치는 약 35% 이상, 일반적으로 약 40% 이상, 종종 약 50% 이상, 전형적으로 약 60% 이상, 일반적으로 약 70% 이상, 바람직하게는 약 80% 이상 및 보다 바람직하게는 약 90% 이상일 것이다.

분리된 IL-B30 DNA는 뉴클레오타이드 치환, 뉴클레오타이드 결실, 뉴클레오타이드 삽입 및 짧은 뉴클레오타이드 스트렛치의 역위에 의해 용이하게 변형시킬 수 있다. 이들 변형은 이들 항원을 암호화하는 신규한 DNA 서열, 이들의 유도체, 또는 생리학적, 면역원적, 항원적 또는 다른 기능적 활성이 유사한 단백질을 생성시킨다. 이들 변형된 서열을 사용하여 돌연변이 항원을 생성하거나 발현을 증강시킬 수 있다. 증강된 발현은 유전자 증폭, 증가된 전사, 증가된 해독 및 다른 기작을 수반한다. "돌연변이체 IL-B30"은 상술된 바와 같은 IL-B30의 서열 동일성 정의내에 포함되지만 결실, 치환 또는 삽입에 의해 통상 천연에서 발견되는 IL-B30의 아미노산 서열과는 다른 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 이것은 일반적으로 서열 2의 서열을 갖는 단백질, 및 이들 서열과 다양한 생물학적 활성(예: 항원성 또는 면역원성)을 공유함으로써 상당한 동일성을 갖는 단백질을 포함하며, 바람직한 양태에서는 대부분의 천연 전체 길이의 제시된 서열을 함유한다. 전체 길이의 서열이 전형적으로 바람직하지만, 절단된 변형물이 또한 유용할 수 있으며, 천연 공급원으로부터 발견되는 유전자 또는 단백질이 통상 가장 바람직하다. 유사한 개념이 상이한 IL-B30 단백질, 특히 다양한 온혈 동물(예: 포유동물 및 조류)에서 발견되는 단백질에 적용된다. 이들 기술은 일반적으로 모든 IL-B30 단백질을 포함하는 것으로 간주되며, 구체적으로 언급된 특정한 영장류 양태로서 제한되는 것은 아니다.

또한, IL-B30 돌연변이유발은 아미노산 삽입체 또는 결실체를 제작함으로써 수행할 수 있다. 치환체, 결실체, 삽입체 또는 이들의 조합체는 최종 작제물을 수득하기 위해 생성될 수 있다. 삽입체에는 아미노- 또는 카복시-말단 융합체가 포함된다. 랜덤 돌연변이유발은 표적 코돈에서 수행할 수 있으며, 발현된 돌연변이체는 목적하는 활성에 대해 스크리닝할 수 있다. 공지된 서열을 갖는 DNA의 예비결정된 부위에서 치환 돌연변이를 유발하는 방법은 본 기술분야에 공지되어 있으며,

예를 들어 M13 프라이머 돌연변이유발 또는 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 기술에 의해 수행할 수 있다[참조: Sambrook, et al. (1989); Ausubel, et al. (1987 and Supplements); and Kunkel, et al. (1987) Methods in Enzymol. 154: 367-382]. 바람직한 양태에는 예를 들어 뉴클레오타이드 또는 아미노산 수준에서 1배, 2배, 3배, 5배, 7배 등의 바람직한 보존 치환체가 포함된다. 바람직하게는, 보존된 시스테인과는 멀리 떨어져 치환될 것이며, 종종 헬릭스 구조 도메인과 멀리 떨어진 영역내에서 치환될 것이다. 이러한 변이체는 특이적 항체의 생산에 유용할 수 있으며, 종종 많은 또는 모든 생물학적 특성을 공유할 것이다.

또한, 본 발명은 재조합 단백질, 예를 들어 이들 단백질로부터의 절편을 사용하는 이종성 융합 단백질을 제공한다. 이종성 융합 단백질은 통상 동일한 방식으로 정상적으로 융합되지 않는 융합된 단백질 또는 절편이다. 유사한 개념이 이종성 핵산 서열에 적용된다.

또한, 다른 단백질의 유사한 작용성 도메인을 조합함으로써 신규한 작제물을 제조할 수 있다. 예를 들면, 표적-결합 또는 다른 절편은 상이한 신규 융합 폴리펩타이드 또는 단편 사이에서 교환될 수 있다[참조: Cunningham, et al. (1989) Science 243: 1330-1336; and O'Dowd, et al. (1988) J. Biol. Chem. 263: 15985-15992].

문헌[참조: Beaucage and Carruthers (1981) Tetra, Letts, 22: 1859-1862]에 기재된 포스포르아미디트 방법이 적합한 합성 DNA 단편을 생산할 것이다. 이본쇄 단편은 종종 상보성 본쇄를 합성하여 적절한 조건하에 본쇄를 함께 어닐링시키거나, DNA 폴리머라제를 사용하여 적절한 프라이머 서열에 상보성 본쇄를 부가(예: PCR 기술)함으로써 수득할 수 있다.

구조 분석을 사이토킨의 IL-6 부류와 비교하여 당해 유전자에 적용할 수 있다. 이러한 부류에는 예를 들어 IL-6, IL-11, IL-12, G-CSF, LIF, OSM, CNTF 및 Ob가 포함된다. IL-6 부류의 다른 구성원과 함께 사람, 돼지 및 마우스 IL-B30 서열의 정렬은 구조적 특징을 정의한다. 특히, β-시트 및 α-헬릭스 잔기는 예를 들어 RASMOL 프로그램을 사용하여 결정할 수 있다[참조: Bazan, et al. (1996) Nature 379: 591; Lodi, et al. (1994) Science 263: 1762-1766; Sayle and Milner-White (1995) TIBS 20: 374-376; and Gronenberg, et al. (1991) Protein Engineering 4: 263-269]. 치환을 위해 바람직한 잔기에는 수용체와 상호반응할 것으로 예상되는 표면 노출된 잔기가 포함된다. 작용을 보존시켜야 하는 다른 잔기는 특히 표면 노출된 잔기로부터 멀리 떨어진 위치에 있는 보존성 치환체일 수 있다.

IV. 작용성 변이체

IL-B30에 대한 생리학적 반응의 차단은 리간드가 이의 수용체에 결합하는 것을 경쟁적으로 억제시킬 것이다.

본 발명의 시험관내 검정은 종종 단리된 단백질, 이들 단백질의 수용체 결합 절편을 포함하는 가용성 단편, 또는 고체상 지지체에 부착된 단편을 사용할 것이다. 이들 검정은 또한 결합 절편 돌연변이 및 변형, 또는 사이토킨 돌연변이 및 변형(예: IL-B30 동족체)의 효과를 진단상 측정 가능하게 한다.

또한, 본 발명은 사이토킨에 대한 중화 항체 또는 수용체 결합 단편이 시험 화합물과 경쟁하는 경우에 경쟁 약물 스크리닝 검정물의 용도를 포함한다.

IL-B30 항원의 "유도체"에는 천연 발생 형태의 아미노산 서열 돌연변이체, 글리코실화 변이체, 및 다른 화학적 잔기와의 공유결합 또는 응집 접합체가 포함된다. 공유결합 유도체는 표준 방법에 의해 IL-B30 아미노산 측쇄 또는 N- 또는 C-말단에서 발견되는 그룹에 작용기를 연결시켜 제조할 수 있다[참조: Lundblad and Noyes (1988) Chemical Reagents for Protein Modification, vols. 1-2, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL; Hugli (ed. 1989) Techniques in Protein Chemistry, Academic Press, San Diego, CA; and Wong (1991) Chemistry of Protein Conjugation and Cross Linking, CRC Press, Boca Raton, FL].

특히, 글리코실화 변이는 예를 들어 이의 합성 또는 프로세싱중에 또는 추가의 프로세싱 단계에서 폴리펩타이드의 글리코실화 패턴을 변형시켜 제조한 것들을 포함한다[참조: Elbein (1987) Ann. Rev. Biochem. 56: 497-534]. 또한, 인산화된 아미노산 잔기, 예를 들어 포스포티로신, 포스포세린 또는 포스포트레오닌을 포함하여 기타 열성 변형을 갖는, 동일한 주요 아미노산 서열의 펩타이드 변형이 포함된다.

IL-B30과 다른 상동성 또는 이종성 단백질 사이의 융합 폴리펩타이드가 또한 제공된다. 다수의 사이토킨 수용체 또는 기타 표면 단백질은 다량체(예: 동종이량체성 단위)이며, 반복 작제물은 단백질분해 절단에 대한 감소된 감수성을 포함한 다양한 잇점을 가질 것이다. 전형적인 예로는 융합된 리간드의 존재 또는 위치를 용이하게 측정할 수 있는, 리포터 폴리펩타

이드(예: 루시퍼라제)와 단백질의 절편 또는 도메인(예: 수용체-결합 절편)과의 융합체가 있다[참조: Dull, et al., 미국 특허 제4,859,609호]. 다른 유전자 융합 파트너에는 세균 β-갈락토시다제, trpE, 단백질 A, β-락타마제, 알파 아밀라제, 알콜 데하이드로게나제, 효모 알파 교배 인자 또는 검출 또는 정제 태그(예: His6 서열의 FLAG 서열)가 포함된다[참조: Godowski, et al., (1988) Science 241: 812-816].

융합 펩타이드는 전형적으로 재조합 핵산 방법 또는 합성 폴리펩타이드 방법에 의해 제조할 수 있을 것이다. 핵산의 조작 및 발현 기술은 일반적으로 문헌[참조: Sambrook, et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed.), vols. 1-3, Cold Spring Harbor Larboratory; and Ausubel, et al. (eds. 1993) Current Protocols in Molecular Biology, Greene and Wiley, NY]에 기재되어 있다. 폴리펩타이드의 합성 기술은 문헌[참조: Merrifield (1963) J. Amer. Chem. Soc. 85: 2149-2156; Merrifield (1986) Science 232: 341-347; Atherton, et al. (1989) Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford; and Grant (1992) Synthetic Peptides: A User's Guide, W.H. Freeman, NY]에 기재되어 있다. 리폴딩(refolding) 방법을 합성 단백질에 적용할 수 있다.

본 발명은 또한 아미노산 서열내의 변이체 또는 글리코실화 보다는 IL-B30 단백질 유도체의 용도를 포함한다. 이러한 유도체는 화학적 잔기 또는 단백질 캐리어와의 공유 또는 응집성 결합을 수반할 수 있다. 공유 또는 응집성 유도체는 면역원, 면역검정시의 시약으로서 또는 결합 파트너(예: 다른 항원)의 친화성 정제와 같은 정제 방법에 유용할 것이다. IL-B30은 시아노겐 브로마이드-활성화된 세파로즈와 같은 고체 지지체에 대한 공유 결합에 의해, 또는 본 기술 분야에 공지된 방법에 의해 고정화시키거나, 항-IL-30 항체 또는 대체 결합 조성물의 검정 또는 정제에 사용하기 위해 글루타르알데하이드 교차-결합의 존재 또는 부재하에 폴리올레핀 표면상에 흡착시킬 수 있다. IL-B30 단백질은 예를 들어 진단 검정에서 사용하기 위해 검출가능한 그룹으로 표지할 수 있다. IL-B30의 정제는 고정화 항체 또는 상보성 결합 파트너(예: 수용체의 결합 부분)에 의해 수행할 수 있다.

본 발명의 가용화된 IL-B30 또는 단편은 결합에 특이적인 항혈청 또는 항체의 생산을 위한 면역원으로서 사용할 수 있다. 정제된 항원을 사용하여, 천연 항체의 항원 결합 단편(예: Fab, Fab', $F(ab)_2$ 등)을 포함하는 모노클로날 항체 또는 항원-결합 단편을 스크리닝할 수 있다. 정제된 IL-B30 항원은 또한 상승된 수준의 사이토킨의 존재에 반응하여 생성되는 항체를 검출하기 위한 시약으로서 사용될 수 있으며, 이는 비정상 또는 특이적 생리 상태 또는 질환 상태를 진단할 수 있다. 본 발명은 서열 1에 도시된 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열 또는 이를 함유하는 단백질 단편에 대해 유도된 항체를 포함한다. 특히, 본 발명은 특이적 도메인(예: 헬릭스 A, B, C 또는 D)에 결합 친화성을 갖거나 이에 대해 유도되는 항체를 포함한다.

본 발명은 추가로 밀접하게 관련된 종 변이체의 분리를 포함한다. 서던 및 노던 블롯 분석은 유사한 유전자 단위가 다른 포유동물에 존재한다는 것을 확증할 것이다. IL-B30은 종 변이체(예: 설치류, 토끼목, 육식 동물, 우제류, 기제류 및 영장류)에 광범위하게 존재하는 것 같다.

또한, 본 발명은 구조, 발현 및 작용상의 특징 및 유사성을 나타내는 관련된 항원 그룹을 분리하는 수단을 제공한다. 당해 분자의 많은 생리학적 효과의 설명은 추가의 독특한 종 또는 이들의 다형성 변이체를 분리 및 특성화함으로써 크게 촉진될 수 있다. 특히, 본 발명은 상이한 종에서 추가의 상동성 유전자 단위를 확인하기 위한 유용한 프로브를 제공한다.

분리된 유전자는 IL-B30의 발현이 결핍된 세포, 예를 들어 상응하는 단백질이 결핍되어 있어 네가티브 배후 활성을 나타내는 종 유형 또는 세포를 형질전환시킬 것이다. 이로써, 형질전환되지 않은 대조군 세포와 비교하여 IL-B30의 작용을 분석할 수 있다.

항원에 의해 매개된 다양한 생리학적 작용을 수행하는 중요한 구조적 요소의 분석은 특히 관련된 부류의 구성원을 비교하는 현대 분자 생물학의 표준 기술을 사용할 수 있다[참조: 동족체-스캐닝 돌연변이유발 기술에 대한 문헌: Cunningham, et al. (1989) Science 243: 1339-1336; and approaches used in O'Dowd, et al. (1988) J. Biol. Chem. 263: 15985-15992; and Lechleiter, et al. (1990) EMBO J. 9: 4381-4390].

세포내 작용은 아마도 수용체 시그날링을 수반할 것이다. 그러나, 단백질 국지화는 특정한 상황하에 발생할 수 있고, 세포내 성분과 사이토킨과의 상호반응이 발생할 수 있다. 상호반응 성분과 IL-B30의 특이적 상호반응 절편은 돌연변이유발 또는 직접적인 생화학적 수단, 예를 들어 교차-결합 또는 친화성 방법에 의해 확인할 수 있다. 또한, 결정사진 또는 기타 물리적 방법에 의한 구조 분석을 적용할 수 있다. 시그날 형질도입 메카니즘에 대한 추가의 조사는 친화성 방법 또는 유전자 수단(예: 돌연변이체의 상보성 분석)에 의해 분리할 수 있는 결합 성분의 연구를 포함한다.

IL-B30의 발현 및 조절에 대한 추가의 연구를 수행할 수 있다. 항원과 결합한 제어 요소는 상이한 생리학적 패턴, 발달 패턴, 조직 특이적 패턴, 또는 다른 발현 패턴을 나타내야 한다. 상부 또는 하부 유전자 영역(예: 제어 요소)이 중요하다.

IL-B30 항원의 구조 연구는 새로운 항원, 특히 분자상에서 효능제 또는 길항제 특성을 나타내는 동족체의 설계를 유도할 수 있다. 이로써, 이미 기재된 스크리닝 방법과 조합하여 목적하는 활성 범위를 나타내는 항원을 분리할 수 있다.

V. 항체

항체는 종 변이체, 다형성 변이체 또는 대립인자 변이체를 포함하는 IL-B30 단백질 및 이의 단편의 다양한 에피토프에 대해 천연 발생 형태 및 재조합 형태 모두로서 유도될 수 있다. 또한, 항체는 천연 또는 변성 변형물을 포함하여 IL-B30에 대해 활성 형태 또는 불활성 형태로서 유도될 수 있다. 또한, 항-유전형 항체가 포함된다.

항원의 예비결정된 단편에 대한 항체(결합 단편 및 단쇄 변형물 포함)는 단편과 면역원 단백질과의 접합물로 동물을 면역화시켜 유도할 수 있다. 모노클로날 항체는 목적하는 항체를 분비하는 세포로부터 제조된다. 이들 항체는 정상 또는 결손 IL-B30과의 결합에 대해 스크리닝하거나, 예를 들어 수용체에 의해 매개된 효능제 활성 또는 길항제 활성에 대해 스크리닝할 수 있다. 항체는 또한 예를 들어 수용체에 대한 결합을 입체적으로 차단시킴으로써 효능화 또는 길항화시킬 수 있다. 이들 모노클로날 항체는 통상적으로 약 1mM 이상, 보다 통상적으로 약 300μM 이상, 전형적으로 약 100μM 이상, 보다 전형적으로 약 30μM 이상, 바람직하게는 약 10μM 이상 및 보다 바람직하게는 약 3μM 이상의 k_D 또는 보다 우수하게 결합할 것이다.

또한, 본 발명의 항체는 진단학상 적용에 유용할 수 있다. 포획 또는 비-중화 항체로서, 이들은 수용체에 대한 결합을 억제시키지 않고서 항원에 결합하는 능력에 대해 스크리닝할 수 있다. 중화 항체로서, 이들은 경쟁 결합 검정에 유용할 수 있다. 이들은 또한 IL-B30 단백질 또는 이의 수용체를 검출 또는 정량하는데 유용할 수 있다[참조: Chan (ed. 1987) Immunology: A Practical Guide, Academic Press, Orlando, FL; Price and Newman (eds. 1991) Principles and Practice of Immunoassay, Stockton Press, N.Y.; and Ngo (ed. 1988) Nonisotopic Immunoassay, Plenum Press, N.Y]. 교차 흡수 또는 다른 시험은 다양한 특이성 범위, 예를 들어 독특하거나 공유하는 종 특이성을 나타내는 항체를 확인할 수 있다.

추가로, 본 발명의 항체(항원 결합 단편 포함)는 항원, 예를 들어 생물학적 반응을 유도할 수 있는 수용체에 결합하여 작용성 결합을 억제하는 효능있는 길항제일 수 있다. 이들은 또한 비-중화 항체로서 유용할 수 있으며, 독소 또는 방사선핵종과 커플링할 수 있어서, 당해 항체가 항원과 결합하는 경우에 예를 들어 이의 표면상에서 이를 발현하는 세포를 사멸시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 링커에 의해 직접 또는 간접적으로 약물 또는 기타 치료제와 접합될 수 있으며, 약물 표적화를 수행할 수 있다.

항원 단편은 면역원으로 사용되는 융합되거나 공유 결합된 폴리펩타이드와 같이 다른 물질, 특히 폴리펩타이드에 결합시킬 수 있다. 항원 및 이의 단편은 다양한 면역원, 예를 들어 키홀 림펫 헤모시아닌, 소 혈청 알부민, 파상풍 독소 등에 융합 또는 공유 결합시킬 수 있다. 폴리클로날 항혈청의 제조 방법에 대한 상세한 설명은 문헌[참조: Microbiology, Hoeber Medical Division, Harper and Row, 1969; Landsteiner (1962) Specificity of Serological Reactions, Dover Publications, New York; Williams, et al. (1967) Methods in Immunology and Immunochemistry, vol. 1, Academic Press, New York; and Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press, NY]을 참조하라.

몇몇 예에 있어서, 마우스, 설치류, 영장류, 사람 등과 같은 다양한 포유동물 숙주로부터 모노클로날 항체를 제조하는 것이 바람직할 것이다. 이러한 모노클로날 항체를 제조하는 기술에 대한 상세한 설명은 모노클로날 항체를 제조하는 방법을 언급하는 문헌[참조: Stites, et al. (eds.) Basic and Clinical Immunology (4th ed.), Lange Medical Publications, Los Altos, CA, and references cited therein; Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press; Goding (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2d ed.), Academic Press, New York; 및 특히 Kohler and Milstein (1975) in Nature 256: 495-497]에서 발견할 수 있다.

다른 적합한 기술은 항원성 폴리펩타이드에 대한 임파구의 시험관내 노출 또는 달리는 파아지 또는 유사한 벡터내에서 항체의 라이브러리 선별을 수반한다[참조: Huse, et al. (1989) "Generation of a Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda," Science 246: 1275-1281; and Ward, et al. (1989) Nature 341: 544-546]. 키메라 또는 인간화된 항체를 포함하여 본 발명의 폴리펩타이드 및 항체는 변형시키거나 변형시키지 않고서

사용할 수 있다. 종종, 본 발명의 폴리펩타이드 및 항체는 검출가능한 시그날을 제공하는 물질을 공유 또는 비공유적으로 결합시켜 표지할 수 있다. 다양한 표지 및 접합 기술은 공지되어 있으며, 과학 및 특허 문헌 모두에 광범위하게 보고되어 있다. 적합한 표지에는 방사선핵종, 효소, 기질, 보조인자, 억제제, 형광 잔기, 화학발광 잔기, 자기 입자 등이 포함된다. 이러한 표지의 용도를 교시하는 특허에는 미국 특허 제3,817,837호; 제3,850,752호; 제3,939,350호; 제3,996,345호; 제4,277,437호; 제4,275,149호 및 제4,366,241호가 포함된다. 또한, 재조합 면역글로불린을 제조할 수 있다[참조: Cabilly의 미국 특허 제4,816,567호; Moore 등의 미국 특허 제4,642,334호 및 Queen, et al. (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86: 10029-10033].

또한, 본 발명의 항체는 단백질을 단리하기 위한 친화성 크로마토그래피에 사용할 수 있다. 당해 항체가 고체 지지체에 결합되는 경우에는 컬럼을 제조할 수 있다[참조: Wilchek et al. (1984) Meth. Enzymol. 104: 3-55].

각각의 IL-B30에 대해 유도된 항체는 또한 항-유전형 항체를 유도하는데 유용할 수 있다. 이들은 각각의 항원 발현과 관련된 다양한 면역학적 조건을 검출 또는 진단하는데 유용하다.

VI. 핵산

상술된 펩타이드 서열 및 관련된 시약은 천연 공급원으로부터 IL-B30을 암호화하는 DNA 클론을 검출, 분리 또는 확인하는데 유용하다. 전형적으로, 이는 포유동물로부터의 유전자를 분리하는데 유용할 것이며, 유사한 공정을 적용하여 다른 종(예: 조류 및 포유류와 같은 온혈 동물)으로부터의 유전자를 분리할 수 있다. 교차 하이브리드화는 동일한 종, 예를 들어 다형성 변이체, 또는 다른 종으로부터 IL-B30을 분리할 수 있게 한다. 다수의 상이한 연구를 이용하여 적합한 핵산 클론을 성공적으로 분리할 수 있다.

정제된 단백질 또는 정의된 펩타이드는 상술된 바와 같은 표준 방법에 의해 항체를 생성하는데 유용하다. 합성 펩타이드 또는 정제된 단백질을 면역계에 제공하여 모노클로날 또는 폴리클로날 항체를 생성할 수 있다[참조: Coligan (1991) Current Protocols in Immunology Wiley/Greene; and Harlow and Lane (1989) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press].

예를 들면, 특이적 결합 조성물은 IL-B30을 발현하는 세포주로부터 제조된 발현 라이브러리를 스크리닝하는데 사용할 수 있다. 세포내 발현에 대한 스크리닝은 다양한 염색 또는 면역형광 공정에 의해 수행할 수 있다. 결합 조성물은 표면 융합 단백질을 발현하는 세포를 친화성 정제하거나 분류하기 위해 사용될 수 있다.

또한 타이드 절편을 사용하여 라이브러리의 스크리닝에 적합한 올리고뉴클레오타이드를 예상할 수 있다. 상기 유전자 코드를 사용하여 스크리닝용 프로브로서 유용한 적절한 올리고뉴클레오타이드를 선별할 수 있다(서열 1 참조). 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 기술과 조합하면, 합성 올리고뉴클레오타이드는 라이브러리로부터 정확한 클론을 선별하는데 유용할 수 있다. 또한, 상보성 서열은 프로브, 프라이머 또는 안티센스 본쇄로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 고정된 벡터 또는 폴리-A 상보성 PCR 기술 또는 다른 펩타이드의 상보성 DNA와 커플링된 다양한 단편이 특히 유용할 것이다.

본 발명은 특히 상술된 서열의 해독되지 않은 5' 부분을 암호화하는 부분이 결실된, 생물학적으로 활성인 상응하는 IL-B30 폴리펩타이드를 암호화하기 위한 분리된 DNA 또는 단편의 용도를 포함한다. 또한, 본 발명은 생물학적 활성 단백질 또는 폴리펩타이드를 암호화하고 적절한 조건하에 본원에 기재된 DNA 서열과 하이브리드화할 수 있는 분리된 또는 재조합 DNA를 포함한다. 상기 생물학적 활성 단백질 또는 폴리펩타이드는 완전한 항원 또는 단편일 수 있고, 예를 들어 서열 2에 기재된 아미노산 서열, 특히 성숙한 분비된 폴리펩타이드를 포함한다. 또한, 본 발명은 분비된 IL-B30에 고도의 동일성을 나타내는 단백질을 암호화하는 분리된 또는 재조합 DNA 또는 이의 단편의 용도를 포함한다. 분리된 DNA는 5' 및 3' 플랭크내에 각각의 조절 서열(예: 프로모터, 인핸서, 폴리-A 부가 시그날 등)을 가질 수 있다. 한편, 발현은 이종성 프로모터에 암호화 절편을 작동적으로 결합시킴으로써 수행할 수 있으며, 예를 들어 내인성 유전자의 상부에 프로모터를 삽입시켜 수행할 수 있다.

"분리된" 핵산은 천연 서열을 자연적으로 수반하는 다른 성분, 예를 들어 리보솜, 폴리머라제, 및/또는 최초 종으로부터의 플랭킹 게놈 서열로부터 실질적으로 분리된 핵산, 예를 들어 RNA, DNA 또는 혼합 중합체이다. 상기 용어는 이의 천연 발생 환경으로부터 제거된 핵산 서열을 포함하며, 여기에는 재조합 또는 클론된 DNA 단리체 및 화학적으로 합성된 동족체 또는 이종성 시스템에 의해 생물학적으로 합성된 동족체가 포함된다. 실질적으로 순수한 분자에는 단리된 형태의 분자가 포함된다. 일반적으로, 핵산은 약 50kb 미만, 통상적으로 약 30kb 미만, 전형적으로 약 10kb 미만, 및 바람직하게는 약 6kb 미만의 벡터 또는 단편내에 존재할 것이다.

단리된 핵산은 일반적으로 분자의 이종성 조성물일 수 있지만, 몇몇 양태에서는 열성 이종성을 보유할 것이다. 이러한 이종성은 전형적으로 목적하는 생물학적 작용 또는 활성에 중요하지 않은 중합체 말단 또는 부분에서 발견된다.

"재조합" 핵산은 이의 생산 방법 또는 이의 구조에 의해 정의된다. 이의 생산 방법과 관련하여, 생성물은 뉴클레오타이드 서열에서 사람의 간섭(전형적으로 선별 또는 생산)을 수반하는 재조합 핵산 기술을 사용하는 방법에 의해 제조된다. 한편, 이는 서로 자연적으로 인접하지 않는 2개의 단편이 융합된 서열을 생성함으로써 제조된 핵산일 수 있지만, 천연 생성물, 예를 들어 천연 발생 돌연변이체는 제외된다는 의미이다. 따라서, 임의의 비천연 발생 벡터로 세포를 형질전환시켜 제조한 생성물은 합성 올리고뉴클레오타이드 방법을 사용하여 유도된 서열을 포함하는 핵산 등을 포함한다. 종종, 이는 서열 인식 부위를 전형적으로 도입 또는 제거하면서 특정한 코돈을 동일한 또는 보존된 아미노산을 암호화하는 풍부한 코돈으로 대체하기 위해 수행된다.

한편, 통상 입수가능한 천연 형태로 발견되지 않는 목적하는 작용기의 조합을 포함하는 단일 유전자 단위를 생성하기 위해서는 목적하는 작용기를 갖는 핵산 절편을 함께 결합시켜 수행한다. 제한 효소 인식 부위는 종종 이러한 인공 조작물의 표적이지만, 다른 부위 특이적 표적물, 예를 들어 프로모터, DNA 복제 부위, 조절 서열, 제어 서열, 또는 다른 유용한 특징을 설계에 의해 도입할 수 있다. 유사한 개념이 재조합 폴리펩타이드, 예를 들어 융합 폴리펩타이드에도 적용된다. 유전자 코드 풍부성에 의해 이들 항원의 단편, 및 각종 상이한 종으로부터의 서열 융합체 또는 다형성 변이체와 유사한 폴리펩타이드를 암호화하는 합성 핵산이 구체적으로 포함된다.

핵산과 관련하여 중요한 "단편"은 약 17개 이상의 뉴클레오타이드, 일반적으로 약 22개 이상의 뉴클레오타이드, 통상적으로 약 29개 이상의 뉴클레오타이드, 보다 종종 약 35개 이상의 뉴클레오타이드, 전형적으로 약 41개 이상의 뉴클레오타이드, 통상적으로 약 47개 이상의 뉴클레오타이드, 바람직하게는 약 55개 이상의 뉴클레오타이드, 및 특히 바람직한 양태에서는 약 60개 이상 또는 그 이상(67개, 73개, 81개, 89개, 95개 등)의 뉴클레오타이드로 이루어진 연속한 절편이다.

IL-B30 단백질을 암호화하는 DNA는 특히 상이한 종의 상동성 단백질을 암호화하는 DNA 뿐만 아니라 관련된 또는 유사한 단백질을 암호화하는 유전자, mRNA 및 cDNA 종을 확인하는데 유용하다. 이는 영장류, 설치류, 개과, 고양이과 및 조류를 포함하는 기타 종내의 동족체일 수 있다. 다양한 IL-B30 단백질은 상동성이어야 하며, 본원에 포함된다. 그러나, 당해 항원에 대해 보다 독특한 진화 관계를 갖는 단백질도 이들이 충분히 상동성이 있으면 이들 서열을 사용하여 적절한 조건하에 용이하게 단리할 수 있다. 영장류 IL-B30 단백질이 특히 중요하다.

예를 들어 인트론을 함유하는 게놈 서열로부터 유도된 재조합 클론은 예를 들어 유전자이식 세포 및 유기체를 포함하는 유전자이식 연구 및 유전자 치료에 유용할 수 있다[참조: Goodnow (1992) "Transgenic Animals" in Roitt (ed.) Encyclopedia of Immunology, Academic Press, San Diego, pp. 1502-1504; Travis (1992) Science 256: 1392-1394; Kuhn, et al. (1991) Science 254: 707-710; Capecchi (1989) Science 244: 1288; Robertson (1987)(ed.) Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, IRL Press, Oxford; and Rosenberg (1992) J. Clinical Oncology 10: 180-199].

핵산 서열 비교와 관련하여 실질적인 상동성(예: 동일성)은 당해 절편 또는 이의 상보성 본쇄가, 최적으로 정렬시켜 비교하는 경우, 적절한 뉴클레오타이드 삽입체 또는 결실체의 뉴클레오타이드와 약 50% 이상, 일반적으로 약 58% 이상, 통상적으로 약 65% 이상, 종종 약 71% 이상, 전형적으로 약 77% 이상, 일반적으로 약 85% 이상, 바람직하게는 약 95 내지 98% 이상 및 특정한 양태에서는 약 99% 이상 동일하다는 의미이다. 한편, 실질적 상동성은 당해 절편이 선택된 하이브리드화 조건하에 전형적으로 IL-B30의 서열(예: 서열 1)을 사용하여 본쇄 또는 이의 상보체와 하이브리드화할 경우에 존재한다. 전형적으로, 선택적 하이브리드화는 약 30개 이상의 뉴클레오타이드의 스트렛치에 걸쳐 약 55% 이상의 동일성, 바람직하게는 약 25개 이상의 뉴클레오타이드의 스트렛치에 걸쳐 약 75% 이상의 동일성, 및 가장 바람직하게는 약 20개 뉴클레오타이드에 걸쳐 약 90% 이상의 동일성이 있는 경우에 발생할 것이다[참조: Kanehisa (1984) Nuc. Acids Res. 12: 203-213]. 상술된 바와 같이, 동일성 비교를 위한 길이는 보다 긴 스트렛치에 걸쳐 수행될 것이며, 특정한 양태에서는 약 17개 이상의 뉴클레오타이드, 통상적으로 약 28개 이상의 뉴클레오타이드, 전형적으로 약 40개 이상의 뉴클레오타이드, 및 바람직하게는 약 75개 내지 100개 또는 그 이상의 뉴클레오타이드의 스트렛치일 수 있다.

하이브리드화시의 상동성과 관련하여, 엄격한 조건은 염, 온도, 유기 용매 및 다른 파라미터의 엄격히 조합된 조건일 수 있으며, 전형적으로 이들은 하이브리드화 반응중에 조절된다. 엄격한 온도 조건은 통상적으로 약 30℃ 이상의 온도, 일반적으로 약 37℃ 이상의 온도, 전형적으로 약 55℃ 이상의 온도, 바람직하게는 약 70℃ 이상의 온도일 수 있다. 엄격한 염 조건은 통상적으로 약 1000mM 미만, 일반적으로 약 400mM 미만, 전형적으로 약 250mM 미만, 바람직하게는 약 100, 50

또는 20mM을 포함하는 약 150mM 미만일 수 있다. 그러나, 상기 파라미터의 조합은 하나의 파라미터를 평가하는 것보다 더욱 중요하다[참조: Wetmur and Davidson (1968) J. Mol. Biol. 31: 349-370]. 엄격한 조건하의 하이브리드화는 배후에 대해 2배 이상의 배후, 바람직하게는 3 내지 5배 이상의 배후를 제공해야 한다.

서열 비교의 경우, 전형적으로 하나의 서열이 참조 서열로서 작용하며, 여기에 시험 서열을 비교한다. 서열 비교 알고리즘을 사용하는 경우, 시험 및 참조 서열을 컴퓨터에 투입하고, 서열 배위를 지정하며, 필요한 경우 서열 알고리즘 프로그램 파라미터를 지정한다. 이어서, 서열 비교 알고리즘은 지정된 프로그램 파라미터를 기준으로 하여 참조 서열에 대한 시험 서열(들)의 서열 동일성(%)을 계산한다.

비교를 위한 서열의 최적 정렬은 예를 들어 문헌[참조: Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482]의 국소 상동성 알고리즘, 문헌[참조: Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443]의 상동성 정렬 알고리즘, 문헌[참조: Pearson and Lipman (1988) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85: 2444]의 유사성 방법 연구, 이들 알고리즘의 컴퓨터 실행[참조: GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI], 또는 시각적 조사[참조: 일반적으로 Ausubel et al., 상기 참조]에 의해 수행할 수 있다.

유용한 알고리즘의 한가지 예는 PILEUP이다. PILEUP는 점진적 상별(pairwise) 정렬을 사용하여 관련된 서열 그룹으로부터 복수 서열 정렬을 생성함으로써 관련 상관성 및 서열 동일성(%)를 나타낸다. 또한, 정렬을 생성하는데 사용된 클러스터링 관계를 나타내는 트리 또는 덴드로그램을 작성한다. PILEUP는 문헌[참조: Feng and Doolittle (1987) J. Mol. Evol. 35: 351-360]의 점진적 정렬 방법의 단순화를 사용한다. 사용된 방법은 문헌[참조: Higgins and Sharp (1989) CABIOS 5: 151-153]에 기재된 방법과 유사하다. 상기 프로그램은 각각 최대 길이가 5,000 뉴클레오타이드 또는 아미노산인 300개 이하의 서열을 정렬시킬 수 있다. 다중 정렬 공정은 2개의 가장 유사한 서열의 쌍별 정렬을 사용하여 개시하는데, 이는 2개의 정렬된 서열의 클러스터를 생성한다. 이어서, 이 클러스터를 다음으로 가장 관련된 서열 또는 정렬된 서열의 클러스터에 대해 정렬시킨다. 두 클러스터의 서열은 2개의 개별적인 서열의 쌍별 정렬을 단순하게 신장시켜 정렬시킨다. 최종 정렬은 연속하는 점진적 쌍별 정렬에 의해 달성된다. 이 프로그램은 서열 비교 영역을 위해 특이적 서열 및 이들의 아미노산 또는 뉴클레오타이드 배위를 지정하고 프로그램 파라미터를 지정함으로써 수행한다. 예를 들면, 참조 서열을 다른 시험 서열과 비교함으로써 하기 파라미터를 사용하여 서열 동일성 관계(%)를 측정할 수 있다: 디폴트 갭 중량(3.00), 디폴트 갭 길이 중량(0.10) 및 중량을 잰 말단 갭.

서열 동일성 및 서열 유사성(%)를 측정하는데 적합한 알고리즘의 또다른 예는 문헌[참조: Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410]에 기재되어 있는 BLAST 알고리즘이다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 네셔널 센터 포 바이오테크놀러지 인포메이션(National Center for Biotechnology Information)을 통해 공개적으로 입수가능하다(http:www.ncbi.nlm.nih.gov/). 이 알고리즘은 당해 서열내의 길이(W)의 짧은 워드(word)를 확인함으로써 스코어가 높은 서열 쌍(HSP)를 먼저 확인하는 것을 수반하는데, 이는 데이타베이스 서열에서 동일한 길이의 워드로 정렬하는 경우에 약간의 포지티브-값의 역치 스코어(T)에 부합하거나 이를 충족시킨다. T는 인접하는 워드 스코어 역치[참조: Altschul, et al., 상기 참조]를 의미한다. 이들 초기의 인접한 워드 적중은 이들을 함유하는 보다 긴 HSP를 발견하기 위한 탐색을 개시하는 근원으로서 작용한다. 이어서, 워드 적중을 누적 정렬 스코어가 증가할 수 있는 한 각 서열의 양 방향으로 신장시킨다. 각각의 방향에서 워드 적중의 신장은 누적 정렬 스코어가 이의 최대 도달 값으로부터 정량(X)에 의해 저하되는 경우; 누적 스코어가 하나 이상의 네가티브-스코어 잔기 정렬의 축적으로 인해 0 이하로 되는 경우; 또는 어느 서열의 말단에 도달하는 경우에 정지된다. BLAST 알고리즘 파라미터 W, T 및 X는 민감성 및 정렬 속도를 결정한다. BLAST 프로그램은 디폴트로서 11의 워드 길이(W), 50의 BLOSUM62 스코어 매트릭스[참조: Henikoff and Henikoff (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89: 10915] 정렬(B), 10의 예상치(E), M=5, N=5 및 두 본쇄의 비교를 이용한다.

서열 동일성(%)를 계산하는 외에, BLAST 알고리즘은 또한 두 서열간의 유사성에 대한 통계학적 분석을 수행한다[참조: Karlin and Altschul (1993) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90: 5873-5787]. BLAST 알고리즘에 의해 제공된 하나의 유사성 값은 최소 합계 가능성(P(N))으로서, 이는 2개의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열간의 매치가 변화에 의해 발생할 가능성을 나타낸다. 예를 들면, 핵산은 참조 핵산에 대해 시험 핵산을 비교하여 최소 합계 가능성이 약 0.1 미만, 더욱 바람직하게는 약 0.01 미만, 및 가장 바람직하게는 약 0.001 미만인 경우에 참조 서열과 유사성이 있는 것으로 간주한다.

폴리펩타이드의 2개의 핵산 서열이 실질적으로 동일하다는 추가의 표시는 제1 핵산에 의해 암호화된 폴리펩타이드가 하기 기재된 바와 같은 제2 핵산에 의해 암호화된 폴리펩타이드와 면역학적으로 교차 반응성이 있다는 것이다. 따라서, 폴리펩타이드는 전형적으로 2개 펩타이드의 보존된 치환체만이 상이한 경우에 제2 폴리펩타이드와 실질적으로 동일하다. 2개의 핵산 서열이 실질적으로 동일하다는 또다른 표시는 2개의 분자가 하기 기술된 바와 같이 엄격한 조건하에 서로 하이브리드화한다는 것이다.

다른 포유동물 종으로부터의 IL-B30은 밀접하게 관련된 종의 교차-종 하이브리드화에 의해 클로닝 및 단리할 수 있다. 상동성은 거리가 먼 관련 종 사이에서 비교적 낮을 수 있으므로, 비교적 밀접하게 관련된 종의 하이브리드화가 바람직하다. 한편, 보다 적은 종 특이성을 나타내는 항체 제제의 제조는 발현 클로닝 접근법에 유용할 수 있다.

VII. IL-B30의 제조; 유사체

IL-B30 또는 이의 단편을 암호화하는 DNA는 화학적 합성, cDNA 라이브러리의 스크리닝, 또는 다양한 세포주 또는 조직 샘플로부터 제조된 게놈성 라이브러리의 스크리닝에 의해 수득할 수 있다[참조: Okayama and Berg (1982) Mol. Cell. Biol. 2: 161-170; Gubler and Hoffman (1983) Gene 25: 263-269; and Glover (ed. 1984) DNA Cloning: A Practical Approach, IRL Press, Oxford]. 한편, 본원에서 제공된 서열은 유용한 PCR 프라이머를 제공하거나, 천연 발생 양태를 포함하여 IL-B30을 암호화하는 적합한 유전자의 합성 또는 기타 제조를 가능케 한다.

이 DNA는 예를 들어 폴리클로날 또는 모노클로날 항체를 생성하기 위해 차례로 사용될 수 있는 전체 길이의 IL-B30 또는 단편의 합성; 결합 연구; 변형된 분자의 작제와 발현 및 구조/작용 연구를 위해 다양한 숙주 세포에서 발현시킬 수 있다.

본원에 사용된 바와 같이 벡터는 DNA 단편을 숙주 게놈내로 통합시킬 수 있는 플라스미드, 바이러스, 박테리오파아지, 삽입가능한 DNA 단편 및 기타 비히클을 포함한다[참조: Pouwels, et al. (1985 and Supplements) Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y.; and Rodriguez, et al., (1988)(eds.) Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Buttersworth, Boston, MA].

본 발명의 목적을 위해, DNA 서열은 이들이 서로 기능적으로 관련되는 경우에 작동적으로 결합시킨다. 예를 들면, 프리서열 또는 분비 리더용 DNA는 이들이 프리단백질로서 발현되거나 세포막에 대한 폴리펩타이드를 검출하거나 당해 폴리펩타이드를 분비하는데 관여하는 경우에 폴리펩타이드에 작동적으로 결합시킨다. 프로모터는 이들이 폴리펩타이드의 전사를 조절하는 경우에 암호화 서열에 작동적으로 결합되고, 리보솜 결합 부위는 이들이 해독을 가능하게 하도록 위치하는 경우에 암호화 서열에 작동적으로 결합된다. 일반적으로, "작동적으로 결합된"이란 판독 프레임내에서 인접한다는 의미이지만, 억제 유전자와 같은 특정한 유전자 요소는 인접하여 결합하지는 않지만 발현을 차례로 조절하는 작동인자 서열에 결합한다[참조: Rodriguez, et al., Chapter 10, pp. 205-236; Balbas and Bolivar (1990) Methods in Enzymology 185: 14-37; and Ausubel, et al. (1993) Current Protocols in Molecular Biology, Greene and Wiley, NY].

적합한 발현 벡터의 대표적인 예에는 pCDNA1; pCD[참조: Okayama, et al. (1985) Mol. Cell Biol. 5: 1136-1142]; pMC1neo 폴리-A[참조: Thomas, et al. (1987) Cell 51: 503-512] 및 pAC 373 또는 pAC 610과 같은 바쿨로바이러스 벡터[참조: Miller (1988) Ann. Rev. Microbiol. 42: 177-199]가 포함된다.

특이적 또는 정의된 글리코실화 패턴을 제공하는 시스템에서 IL-B30 폴리펩타이드를 발현시키는 것이 종종 바람직하다[참조: Luckow and Summers (1988) Bio/Technology 6: 47-55; and Kaufman (1990) Meth. Enzymol. 185: 487-511].

IL-B30 또는 이의 단편을 작제하여 세포막에 포스파티딜 이노시톨(PI)을 결합시킬 수 있으나, 포스파티딜 이노시톨 절단 효소(예: 포스파티딜 이노시톨 포스포리파제-C)로 처리하여 막으로부터 제거할 수 있다. 이는 생물학적 활성 형태로 항원을 방출시켜 단백질 화학의 표준 공정에 의한 정제를 가능케 한다[참조: Low (1989) Biochim, Biophys. Acta 988: 427-454; Tse, et al. (1985) Science 230: 1003-1008; and Brunner, et al. (1991) J. Cell Biol. 114: 1275-1283].

본 발명에 이르러, IL-B30이 특성화되었으며, 이의 단편 또는 유도체를 펩타이드 합성을 위한 편리한 공정에 의해 제조할 수 있다. 여기에는 문헌[참조: Stewart and Young (1984) Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, IL; Bodanszky and Bodanszky (1984) The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, New York; Bodanszky (1984) The Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, New York; and Villafranca (ed. 1991) Techniques in Protein Chemistry II, Academic Press, San Diego, Ca]에 기술된 바와 같은 공정이 포함된다.

VIII. 용도

본 발명은 본원 또는 진단용 키트의 설명에서 기술된 바와 같은 진단 적용, 예를 들어 IL-B30 매개된 질환에 사용할 수 있는 시약을 제공한다. 유전자는 예를 들어 사람과 설치류를 구별하기 위한 법 과학에서, 또는 상이한 발현 또는 변형 패턴을 나타내는 상이한 세포를 구별하기 위한 마커로서 유용할 수 있다.

또한, 본 발명은 중요한 상업적 및/또는 치료 효능을 갖는 시약을 제공한다. IL-B30에 대해 결합 친화성을 갖는 것으로 확인된 화합물과 함께 본 발명의 IL-B30(천연 발생 또는 재조합), 이의 단편 및 이에 대한 항체는 분자생물학, 면역학 또는 생리학의 기술을 교시하기 위한 시약로서 유용할 수 있다. 적절한 키트는 예를 들어 단백질, 항체, 클로닝 방법, 조직학 등의 생산 또는 사용시 실제의 실험 연습에서 시약을 사용하여 제조할 수 있다.

본 발명의 시약은 또한 염증 질환을 포함하여 비정상 생리 또는 성장과 관련된 질환의 치료에 유용할 수 있다. 이들은 특정한 치료 전략의 성공과 상호관련될 수 있는 상호반응 성분의 존재 또는 부재를 시험관내에서 시험하는데 유용할 수 있다. 특히, 다양한 세포(예: 조혈세포 또는 임파종)의 생리를 조절하는 것이 본원에 제공된 조성물을 사용한 적절한 처리 방법에 의해 달성될 수 있다[참조: Thomson (1994; ed.) The Cytokine Handbook (2d ed.) Academic Press, San Diego; Metcalf and Nicola (1995) The Hematopoietic Colony Stimulating Factors Cambridge University Press; and Aggarwal and Gutterman (1991) Human Cytokines Blackwell Pub].

예를 들면, IL-B30에 의한 비정상 발현 또는 비정상 시그날링과 관련된 질병 또는 질환이 효능제 또는 길항제에 대한 표적이어야 한다. 신규한 사이토킨은 면역 반응(예: 염증 및/또는 자가면역 질환)에 영향을 미치는 조혈 세포(예: 임파 세포)의 조절 또는 성장에 중요한 영향을 미칠 수 있다. 한편, 이것은 혈관 생리 또는 성장, 또는 신경 효과에 영향을 미칠 수 있다.

특히, 사이토킨은 다양한 의미에서 세포에 의한 사이토킨 합성 또는 증식 등을 매개할 수 있다. 천연 발생 형태의 IL-B30의 돌연변이 변이체와 같은 IL-B30의 길항제 또는 차단 항체는 예를 들어 염증 또는 자가면역 반응의 상황하에서 면역 반응을 차단하는 선택적이고 강력한 방법을 제공할 수 있다[참조: Samter, et al. (eds.) Immunological Diseases vols. 1 and 2, Little, Brown and Co.].

또한, 특정한 배합 조성물은 예를 들어 다른 염증 조절제와 함께 유용할 수 있다. 이러한 다른 분자에는 스테로이드, IL-6 및/또는 G-CSF의 다른 변형체(종 변이체 포함), 또는 바이러스 동족체 및 이들의 개개 길항제가 포함될 수 있다.

다양한 비정상 질환은 노던 블롯 분석에 의해 IL-B30 mRNA를 생성하는 것으로 밝혀진 각각의 세포 유형에서 공지되어 있다[참조: Berkow (ed.) The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Merck & Co., Rahway, N.J.; Thorn, et al. Harrison's Principles of Internal Medicine, McGraw-Hill, N.Y.; and Weatherall, et al. (eds.) Oxford Textbook of Medicine, Oxford University Press, Oxford]. 기타 다수의 의학적 질환 및 질병은 마크로파지 또는 단구에 의한 활성화를 수반하며, 이들중 대부분은 본원에서 제공된 효능제 또는 길항제에 의한 처리에 반응할 것이다[참조: Stites and Terr (eds.; 1991) Basic and Clinical Immunology Appleton and Lange, Norwalk, Connecticut; and Samter, et al. (eds.) Immunological Diseases Little, Brown and Co.]. 이러한 문제는 본원에 제공된 조성물을 사용하는 예방 또는 치료에 민감해야 한다. 췌장 랑게르한스섬 국지화는 당뇨병에 대한 관련 가능성을 시사한다.

IL-B30, 길항제, 항체 등은 정제한 다음 환자, 가축 또는 사람에게 투여할 수 있다. 이들 시약은 치료학적으로 사용하기 위해 예를 들어 생리학적 무독성 안정화제, 부형제, 또는 보존제와 함께 통상의 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제(예: 면역원성 보조제)중의 추가의 활성 또는 불활성 성분과 배합될 수 있다. 이들 배합물은 멸균 여과시킬 수 있으며, 용량 바이알내에서 동결 건조 또는 안정화된 수성 저장내의 저장에 의해 용량 단위로 배치할 수 있다. 본 발명은 또한 보체 결합이 아닌 형태를 포함하여 항체 또는 이의 결합 단편의 용도를 포함한다.

IL-B30 또는 이의 단편을 사용한 약물 스크리닝은 결합된 성분의 단리를 포함하여 IL-B30 작용에 대한 결합 친화성 또는 다른 관련 생물학적 효과를 갖는 화합물을 확인하기 위해 수행할 수 있다. 이어서, 후속적인 생물학적 검정을 이용하여 당해 화합물이 고유 자극 활성을 보유하여 사이토킨의 활성을 차단하는 차단제 또는 길항제인지의 여부를 결정할 수 있다. 마찬가지로, 고유 자극 활성을 갖는 화합물이 시그날 경로를 활성화시켜 IL-B30의 활성을 자극하는 효능제인지의 여부를 결정할 수 있다. 본 발명은 또한 길항제로서 IL-B30에 대한 차단 항체 및 효능제로서 자극 항체의 치료학적 용도를 포함한다. 이러한 접근법은 특히 다른 IL-B30 종 변이체에 있어서 유용할 수 있다.

효과적인 치료에 필요한 시약의 양은 투여 수단, 표적 부위, 환자의 생리 상태 및 기타 투여 의약을 포함하는 다수의 상이한 인자에 따라 달라질 것이다. 따라서, 치료 용량은 안전성 및 효능을 최적화하도록 적정될 수 있다. 전형적으로, 시험관내에서 사용된 용량은 이들 시약의 동일계 투여에 유용한 양에서 유용한 지침을 제공할 수 있다. 특정한 질환의 치료를 위한 효과적인 용량의 동물 시험은 사람 용량의 예상 조치를 제공할 것이다. 다양한 연구가 문헌[참조: Gilman, et al. (eds. 1990) Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8th Ed., Pergamon Press; and Remington's Pharmaceutical Science, 17th ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, Penn]에 기재되어 있다. 투여 방법, 예를 들어 경구, 정맥내, 복강내 또는 근육내 투여, 경피 확산 등이 본원 및 하기에 기재되어 있다. 약제학적으로 허용

되는 담체에는 물, 염수, 완충제 및 기타 화합물이 포함된다[참조: Merck Index, Merck & Co., Rahway, New Jersey]. 용량 범위는 적절한 담체에 따라 통상적으로 1mM 미만의 농도, 전형적으로 약 10μM 미만의 농도, 통상적으로 약 100nM 미만, 바람직하게는 약 10pM(피코몰) 미만, 및 가장 바람직하게는 약 1fM(펨토몰) 미만의 양으로 존재할 것으로 예상된다. 서방출 제형 또는 서방출 장치가 연속 또는 장기간 투여를 위해 종종 사용된다[참조: Langer (1990) Science 249: 1527-1533].

IL-B30, 이의 단편, 및 이에 대한 항체 또는 이의 단편, 길항제 및 효능제는 치료되는 숙주에게 직접 투여되거나, 화합물의 크기에 따라 투여전에 난알부민 또는 혈청 알부민과 같은 담체 단백질과 이들을 접합시키는 것이 바람직할 것이다. 치료 제형은 다양한 통상적인 용량 제형으로 투여할 수 있다. 활성 성분을 단독으로 투여할 수 있지만, 약제학적 제형으로서 투여하는 것이 바람직하다. 제형은 통상적으로 상기 정의된 바와 같은 하나 이상의 활성 성분을 이의 하나 이상의 허용되는 담체와 함께 포함한다. 각각의 담체는 다른 성분과 혼화성이고 환자에게 손상을 주지 않는다는 점에서 약제학적으로 및 생리학적으로 허용가능해야 한다. 제형에는 경구, 직장내, 비내, 국소 또는 비경구(피하, 근육내, 정맥내 및 경피내 포함) 투여에 적합한 것들이 포함된다. 제형은 통상적으로 단위 용량 형태로 존재하며, 약학 기술 분야에 공지된 방법에 의해 제조할 수 있다[참조: Gilman, et al. (eds. 1990) Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8th Ed., Pergamon Press; and Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, Penn.; Avis, et al. (eds. 1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Dekker, New York; Lieberman, et al. (eds. 1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Dekker, New York; and Lieberman, et al. (eds. 1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Dekker, New York]. 본 발명의 치료는 다른 제제, 예를 들어 사이토킨(IL-6 또는 G-CSF 포함) 또는 이들의 각각의 길항제와 배합하거나 이들과 함께 사용될 수 있다.

본 발명의 천연 발생 및 재조합 형태의 IL-B30은 단백질에 대한 결합 활성을 갖는 화합물을 스크리닝할 수 있는 키트 및 검정 방법에 특히 유용하다. 몇몇 자동화 검정 방법이 최근에 개발되어 단기간내에 수만개의 화합물을 스크리닝할 수 있다[참조: 고체 기질상에서 합성된 다수의 정의된 중합체에 의해 결합 친화성을 시험하는 수단을 기술하는 Fodor, et al. (1991) Science 251: 767-773]. 적합한 검정물의 개발은 본 발명에 의해 제공된 바와 같은 대량의 정제된 가용성 IL-B30의 이용가능성에 의해 크게 촉진될 수 있다.

다른 방법을 사용하여 IL-B30-IL-B30 수용체 상호반응에서 중요한 잔기를 결정할 수 있다. 돌연변이 분석을 수행하여 상호반응 및/또는 시그날링에 중요한 특이적 잔기를 결정할 수 있다[참조: Somoza, et al. (1993) J. Exptl. Med. 178: 549-558]. PHD[참조: Rost and Sander (1994) Proteins 19: 55-72] 및 DSC[참조: King and Sternberg (1996) Protein Sci. 5: 2298-2310]은 α-헬릭스(H), β-본쇄(E) 또는 코일(L)의 2차 구조의 예상을 제공할 수 있다. 헬릭스 A 및 D는 수용체 상호반응에 가장 중요하며, D 헬릭스가 가장 중요한 영역이다. 헬릭스 A는 대략 pro(7)에서 his(27)까지 사람에서 뻗어 있을 수 있는 반면, 헬릭스 D는 대략 trp(135)에서 gly(162)까지 뻗어 있을 수 있다. 표면 노출된 잔기는 수용체 결합에 영향을 미칠 수 있지만, 봉입된 잔기는 일반 구조에 영향을 미칠 수 있다. 특히 중요한 것으로 예상되는 잔기는 arg(146), ser(147), gln(149), ala(150), ala(153), val(154), ala(156), arg(157), ala(160) 및 his(161)에 상응하는 것 같다.

예를 들면, 길항제는 3차 구조 데이타에 의해 항원이 구조적으로 정의되는 경우에 통상적으로 발견될 수 있다. 효능있는 상호반응 동족체의 시험은 정제된 IL-B30을 사용하는 고도로 자동화된 검정 방법의 개발에 의해 가능해진다. 특히, 신규한 효능제 및 길항제는 본원에 기재된 스크리닝 기술을 사용함으로써 개발될 수 있다. 특히 중요한 것은 다양한 IL-B30 분자에 대해 조합된 결합 친화성을 갖는 것으로 밝혀진 화합물, 예를 들어 IL-B30의 종 변이체에 대한 길항제로서 사용할 수 있는 화합물이다.

한가지 약물 스크리닝 방법은 IL-B30을 발현시키는 재조합 DNA 분자를 사용하여 안정하게 형질전환시킨 진핵 또는 원핵 숙주 세포를 사용한다. 다른 분자로부터의 단리시 IL-B30을 발현시키는 세포를 단리할 수 있다. 생존가능한 또는 고정된 형태의 이와 같은 세포는 표준 결합 파트너 결합 검정에 사용할 수 있다[참조: Parce, et al. (1989) Science 246: 243-247; and Owicki, et al. (1990) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87: 4007-4011; 당해 문헌은 세포 반응을 검출하기 위한 민감성 방법을 기술한다].

또다른 약물 스크리닝 방법은 IL-B30에 대해 적합한 결합 친화성을 갖는 화합물의 대량의 스크리닝을 제공하는 방법을 수반하며, 1984년 9월 13일자로 공개된 Geysen의 유럽 특허원 제84/03564호에 상세히 기재되어 있다. 먼저, 다수의 상이한 소형 펩타이드 시험 화합물을 고체 기질(예: 플라스틱 핀) 또는 다른 적절한 표면 상에서 합성한다[참조: Fodor, et al. (1991)]. 이어서, 모든 핀을 가용화된, 정제되지 않거나 가용화된, 정제된 IL-B30과 반응시켜 세척한다. 다음 단계는 결합된 IL-B30을 검출하는 것이다.

또한, 합리적인 약물 설계는 IL-B30 및 기타 효능인자 또는 동족체의 분자 형상에 대한 구조적 연구에 기초할 수도 있다. 효능인자는 결합에 반응하여 다른 작용을 매개하는 다른 단백질 또는 통상적으로 IL-B30(예: 수용체)와 상호반응하는 다른 단백질일 수 있다. 특이적 기타 단백질과 상호반응하는 부위를 결정하는 한가지 수단은 물리적 구조 측정법, 예를 들어 x-선 결정사진 또는 2차원 NMR 기술이다. 이들은 아미노산 잔기가 모델링함에 따라 예를 들어 다른 사이토킨-수용체 모델에 대해 분자의 접촉 영역을 형성하는 것에 대한 지침을 제공한다. 단백질 구조 측정에 대한 상세한 설명은 문헌[참조: Blundell and Johnson (1976) Protein Crystallography, Academic Press, New York]을 참조하라.

IX. 키트

본 발명은 또다른 IL-B30 또는 결합 파트너의 존재를 검출하기 위한 다양한 진단 키트 및 방법에 있어서 IL-B30 단백질, 이의 단편, 펩타이드 및 이들의 융합 생성물의 용도를 포함한다. 전형적으로, 키트는 정의된 IL-B30 펩타이드 또는 이들을 인식하는 유전자 절편 또는 시약(예: IL-B30 단편 또는 항체)을 함유하는 구획을 가질 것이다.

IL-B30에 대한 시험 화합물의 결합 친화성을 측정하기 위한 키트는 전형적으로 시험 화합물; 표지된 화합물, 예를 들어 IL-B30에 대한 공지된 결합 친화성을 갖는 결합 파트너 또는 항체; IL-B30의 공급원(천연 발생 또는 재조합); 및 자유 표지된 화합물로부터 결합된 것을 분리하기 위한 수단(예: 분자를 고정화시키기 위한 고체상)을 포함할 것이다. 화합물이 스크리닝되면, 항원에 대해 적합한 결합 친화성을 갖는 것들을 본 기술분야에 공지된 바와 같이 적합한 생물학적 검정으로 평가하여, 이들이 IL-B30 시그날링 경로에 대한 효능제 또는 길항제로서 작용하는지의 여부를 측정할 수 있다. 또한, 재조합 IL-B30 폴리펩타이드의 이용성은 이러한 검정물을 측정하기 위한 잘 확립된 표준을 제공한다.

예를 들면, 샘플내에서 IL-B30의 농도를 측정하기 위한 바람직한 키트는 전형적으로 항원에 대해 공지된 결합 친화성을 갖는 표지된 화합물(예: 결합 파트너 또는 항체), 사이토킨의 공급원(천연 발생 또는 재조합) 및 자유 표지된 화합물로부터 결합한 것을 분리하기 위한 수단(예: IL-B30을 고정화시키기 위한 고체상)을 포함할 것이다. 시약을 함유하는 구획, 및 사용법이 통상적으로 제공된다.

IL-B30에 특이적인 항체(항원 결합 단편 포함) 또는 단편은 IL-B30 및/또는 이의 단편의 상승된 수준의 존재를 검출하기 위한 진단 적용에 유용하다. 이러한 진단 검정물은 용해물, 간 세포, 고정된 세포, 면역형광, 세포 배양물, 체액을 사용할 수 있으며, 혈청내의 항원 등과 관련된 항원의 검출을 추가로 수반할 수 있다. 진단 검정물은 균질성(유리 시약와 항원-결합 파트너 복합체 사이의 분리 단계 부재) 또는 이종성(분리 단계 존재)일 수 있다. 방사면역검정(RIA), 효소-결합된 면역흡착 검정(ELISA), 효소 면역검정(EIA), 효소-다중 면역검정 기술(EMIT), 기질-표지된 형광 면역검정(SLFIA) 등과 같은 다양한 시판 검정법이 존재한다[참조: Van Vunakis, et al. (1980) Meth Enzymol. 70: 1-525; Harlow and Lane (1980) Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press, NY; and Coligan, et al. (eds. 1993) Current Protocols in Immunology, Greene and Wiley, NY].

항-유전형 항체는 IL-B30에 대한 항체의 존재를 진단하기 위한 용도와 유사한 용도를 가질 것이며, 자체로서 다양한 비정상 상태를 진단할 수 있다. 예를 들면, IL-B30의 과생성은 특히 증식성 세포 질환(예: 암 또는 비정상 활성화 또는 분화)에 있어서 비정상의 생리학적 상태를 진단할 수 있는 각종 면역학적 반응물의 생성을 유도할 수 있다. 더욱이, 이용가능한 분산 패턴은 사이토킨이 췌장 랑게르한스섬에서 발현된다는 정보를 제공하는데, 이는 사이토킨이 예를 들어 당뇨병 관련 의학적 질환에 있어서 당해 기관의 작용에 관여할 수도 있다는 가능성을 시사한다.

종종, 진단 검정을 위한 시약이 키트에 공급되어 검정 민감성을 최적화한다. 본 발명의 목적상, 검정, 프로토콜 및 표지의 성질에 따라, 표지된 또는 표지되지 않은 항체 또는 결합 파트너 또는 표지된 IL-B30이 제공된다. 이는 통상적으로 다른 첨가제, 예를 들어 완충제, 안정화제, 시그날 생성에 필요한 물질(예: 효소에 대한 기질) 등과 결합하여 존재한다. 바람직하게는, 키트는 또한 적절하게 사용하기 위한 사용법 및 사용후 내용물을 처리하는 사용법을 포함할 것이다. 전형적으로, 키트는 각각의 유용한 시약에 대한 구획을 갖는다. 바람직하게는, 시약은 당해 시약이 검정 수행을 위해 적절한 시약 농도을 제공하는 수성 매질중에서 재구성될 수 있는 경우에 무수 동결건조된 분말로서 제공된다.

약물 스크리닝 및 진단 검정의 상술된 성분중 대다수는 변형시키지 않고서 사용되거나 다양한 방법으로 변형시킬 수 있다. 예를 들면, 표지화는 검출가능한 시그날을 직접 또는 간접적으로 제공하는 잔기를 공유 또는 비-공유 결합시킴으로써 달성할 수 있다. 이들 검정에 있어서, 결합 파트너, 시험 화합물, IL-B30 또는 이에 대한 항체를 직접 또는 간접적으로 표지할 수 있다. 직접 표지를 위한 것들에는 표지 그룹: 방사선표지(예: ^{125}I), 효소(미국 특허 제3,645,090호)(예: 퍼옥시다제

및 알칼리 포스파타제) 및 형광 강도, 파장 이동 또는 형광 분극화의 변화를 모니터링할 수 있는 형광 표지(미국 특허 제 3,940,475호)이 포함된다. 간접 표지를 위한 것들에는 특정 성분을 비오티닐화시킨 후 상기 표지 그룹중 어느 하나에 커플링시킨 아비딘에 결합시키는 것을 포함한다.

또한, 유리 IL-B30으로부터 결합된 것 또는 유리 시험 화합물로부터 결합된 것을 분리하는 많은 방법이 있다. IL-B30은 각종 매트릭스상에 고정시킨 다음 세척할 수 있다. 적합한 매트릭스에는 플라스틱(예: ELISA 플레이트), 필터 및 비드가 포함된다[참조: Coligan, et al. (eds. 1993) Current Protocols in Immunology, Vol. 1, Chapter 2, Greene and Wiley, NY]. 다른 적합한 분리 기술에는, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 문헌[참조: Rattle, et al. (1984) Clin. Chem. 30: 1457-1461]에 기재된 형광체 항체 자기화가능한 입자 방법, 및 미국 특허 제4,659,678호에 기재된 바와 같은 이중 항체 자기 입자 분리가 포함된다.

단백질 또는 이들의 단편을 각종 표지에 결합시키는 방법은 문헌에 광범위하게 보고되어 있으며, 여기서 상세한 설명을 요구하지는 않는다. 이들 기술의 대부분은 카보디이미드 또는 활성 에스테르의 이용에 의해 활성화된 카복실 그룹을 사용하여 펩타이드 결합을 형성하고, 결합을 위해 머캅토 그룹을 활성화된 할로겐(예: 클로로아세틸) 또는 활성화된 올레핀(예: 말레이미드) 등과 반응시켜 티오에테르를 형성하는 것을 포함한다. 융합 단백질을 또한 이들 적용에서 사용할 수 있다.

본 발명의 또다른 진단 양태는 IL-B30의 서열중에서 선택된 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 서열의 용도를 포함한다. 이들 서열은 비정상 질환(예: 염증 또는 자가면역)을 갖는 것으로 추정되는 환자의 샘플내에서 IL-B30 메세지의 수준을 검출하기 위한 프로브로서 사용될 수 있다. 사이토킨은 활성화에 대한 마커 또는 매개인자일 수 있기 때문에, 당해 효과가 중요해지고 중요하게 되기 전에 예방적 방식으로 추가의 치료가 언제 요구되는지를 측정하기 위해 다수의 활성화된 세포를 측정하는데 유용할 수 있다. RNA 및 DNA 뉴클레오타이드 서열의 제조, 당해 서열의 표지 및 당해 서열의 바람직한 크기는 문헌에 충분히 상세하게 기재되어 있다[참조: Langer-Safer, et al. (1982) Proc. Nat'l. Acad. Sci. 79: 4381-4385; Caskey (1987) Science 236: 962-967; and Wilchek et al. (1988) Anal. Biochem. 171: 1-32].

또한, 다른 분자의 정성적 또는 정량적 발현을 시험하는 진단 키트가 포함된다. 진단 또는 예측은 마커로서 사용된 다양한 징후의 조합에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 키트는 마커의 조합을 시험할 수 있다[참조: Viallet, et al. (1989) Progress in Growth Factor Res. 1: 89-97]. 다른 키트를 사용하여 다른 세포 서브세트를 평가할 수도 있다.

X. IL-B30 수용체의 단리

특이적 리간드-수용체 상호반응의 리간드을 단리하기 위해, 수용체를 단리하는 방법이 존재한다[참조: Gearing, et al. (1989) EMBO J. 8: 3667-3676]. 예를 들면, 수용체에 대한 결합을 방해하지 않고서 IL-B30 사이토킨을 표지하는 수단을 결정할 수 있다. 예를 들면, 친화성 표지를 리간드의 아미노- 또는 카복실-말단과 융합시킬 수 있다. 이러한 표지는 FLAG 에피토프 태그 또는 예를 들어 Ig 또는 Fc 도메인일 수 있다. 발현 라이브러리는 예를 들어 세포 분류, 또는 이러한 결합 성분을 발현시키는 아집단을 검출하기 위한 기타 스크리닝에 의해 사이토킨의 특이적 결합에 대해 스크리닝할 수 있다[참조: Ho, et al. (1993) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90: 11267-11271; and Liu, et al. (1994) J. Immunol. 152: 1821-29]. 한편, 패닝 방법을 사용할 수도 있다[참조: Seed and Aruffo (1987) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 84: 3365-3369].

표지를 사용한 단백질 교차-결합 기술을 적용하여 IL-B30 사이토킨의 결합 파트너를 단리할 수 있다. 이로써, 예를 들어 리간드-수용체 유사 방식으로 사이토킨과 특이적으로 상호반응하는 단백질을 확인할 수 있다.

초기의 시험은 공지된 IL-6 또는 G-CSF 수용체 성분이 IL-B30과의 반응에 관여하는지의 여부를 측정하기 위해 수행할 수 있다. 또한, 이들 작용성 수용체 복합체는 대부분 또는 모든 성분, 즉 특이적 수용체 아단위 또는 보조 수용체 아단위를 IL-B30 수용체 복합체와 공유할 수 있다.

본 발명의 많은 변형 및 변화가 본 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 자명한 바와 같이 본 발명의 정신 및 범주를 벗어나지 않고도 이루어질 수 있다. 본원에 기재된 특정한 양태는 단지 예시를 위해 제공된 것이며, 본 발명은 하기 청구의 범위가 포함하는 모든 등가물 범위와 함께 첨부된 청구의 범위에 의해서만 한정되어야 한다.

실시예

I. 일반 방법

하기 표준 방법중 대다수는 문헌[참조: Maniatis, et al. (1982) Molecular Cloning, A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY; Sambrook, et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed.) Vols. 1-3, CSH Press, NY; Ausubel, et al., Biology Greene Publishing Associates, Brooklyn, NY; or Ausubel, et al. (1987 and Supplements) Current Protocols in Molecular Biology Wiley/Greene, NY; Innis, et al. (eds. 1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications Academic Press, NY]에 기재되어 있다. 단백질 정제 방법에는 황산암모늄 침전, 컬럼 크로마토그래피, 전기영동, 원심분리, 결정화 등과 같은 방법이 포함된다[참조: Ausubel, et al. (1987 and periodic supplements); Deutscher (1990) "Guide to Protein Purification," Methods in Enzymology vol. 182, and other volumes in this series; Coligan, et al. (1995 and supplements) Current Protocols in Protein Science John Wiley and Sons, New York, NY; P. Matsudaira (ed. 1993) A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing, Academic Press, San Diego, CA; 및 단백질 정제 생성물의 사용에 대한 제조업자의 문헌, 예를 들어 Pharmacia, Piscataway, NJ, or Bio-Rad, Richmond, CA]. 재조합 기술과의 조합으로 적적한 절편(에피토프 태그)을 예를 들어 FLAG 서열 또는 프로테아제-제거가능한 서열에 의해 융합될 수 있는 등가물에 융합시킨다[참조: Hochuli (1989) Chemische Industrie 12: 69-70; Hochuli (1990) "Purification of Recombinant Proteins with Metal Chelate Absorbent" in Setlow (ed.) Genetic Engineering, Principle and Methods 12: 87-98, Plenum Press, NY; and Crowe, et al. (1992) OIAexpress: The High Level Expression & Protein Purification System QUIAGEN, Inc., Chatsworth, CA].

표준 면역학적 기술도 문헌[참조: Hertzenberg, et al. (eds. 1996) Weir's Handbook of Experimental Immunology vols. 1-4, Blackwell Science; Coligan (1991) Current Protocols in Immunology Wiley/Greene, NY; and Methods in Enzymology vols. 70, 73, 74, 84, 92, 93, 108, 116, 121, 132, 150, 162, and 163]에 기재되어 있다. 사이토킨 검정도 문헌[참조: Thomson (ed. 1994) The Cytokine Handbook (2d ed.) Academic Press, San Diego; Metcalf and Nicola (1995) The Hematopoietic Colony Stimulating Factors Cambridge University Press; and Aggarwal and Gutterman (1991) Human Cytokines Blackwell Pub]에 기재되어 있다.

혈관 생물학적 활성의 검정은 본 기술분야에 공지되어 있다. 이들은 종양 또는 다른 조직에서의 혈관형성 또는 지혈 활성, 예를 들어 동맥 평활근 증식[참조: Koyoma, et al. (1996) Cell 87: 1069-1078], 혈관 상피에 대한 단구 유착[참조: McEvoy, et al. (1997) J. Exp. Med. 185: 2069-2077]을 포함할 것이다[참조: Ross (1993) Nature 362: 801-809; Rekhter and Gordon (1995) Am. J. Pathol. 147: 668-677; Thyberg, et al. (1990) Atherosclerosis 10: 966-990; and Gumbiner (1996) Cell 84: 345-357].

신경 세포 생물학적 활성의 검정은 문헌[참조: Wouterlood (ed. 1995) Neuroscience Protocols modules 10, Elsevier; Methods in Neurosciences Academic Press; and Neuromethods Humana Press, Totowa, NJ]에 기재되어 있다. 성장 시스템의 방법이 문헌[참조: Meisami (ed.) Handbook of Human Growth and Developmental Biology CRC Press; and Chrispeels (ed.) Molecular Techniques and Approaches in Developmental Biology Interscience]에 기재되어 있다.

FACS 분석은 문헌[참조: Melamed, et al. (1990) Flow Cytometry and Sorting Wiley-Liss, Inc., New York, NY; Shapiro (1988) Practical Flow Cytometry Liss, New York, NY; and Robinson, et al. (1993) Handbook of Flow Cytometry Methods Wiley-Liss, New York, NY]에 기재되어 있다.

II. 사람 IL-B30의 클로닝

유전자 서열은 표 1에 제공되어 있다. 이 서열은 흑색 세포, 태아 심장 및 임부 자궁으로부터 제조된 cDNA 라이브러리로부터 유도한다. 또한, 이는 췌장 랑게르한스섬으로부터 유도된 cDNA 라이브러리 서열에서 발견된다. 이들 서열로 PCR 프라이머 또는 프로브를 제조하여 당해 유전자의 세포내 분포를 측정한다. 이들 서열로 당해 메세지를 암호화하는 게놈 DNA를 단리한다.

프로브 또는 PCR 프라이머를 사용하여, 다양한 조직 또는 세포 유형을 프로빙하여 세포내 분포를 측정한다. PCR 생성물은 예를 들어 TA 클로닝 키트(Invitrogen)을 사용하여 클로닝한다. 생성된 cDNA 플라스미드를 자동화 서열분석기(Applied Biosystems)상에서 양 말단으로부터 서열분석한다.

III. IL-B30의 세포내 발현

영장류 IL-B30을 암호화하는 cDNA에 특이적인 적절한 프로브 또는 프라이머를 제조한다. 전형적으로, 예를 들어 랜덤 프라이밍에 의해 프로브를 표지한다. 상술된 세포 유형 및 또한 췌장 랑게르한스섬에서 발현시킨다. 서던 분석: 1차 증폭시킨 cDNA 라이브러리로부터의 DNA(5μg)을 적절한 제한 효소로 분해하여 삽입체를 방출시키고, 1% 아가로즈 겔상에서 작동시켜 나일론 막(Schleicher and Schuell, Keene, NH)으로 이동시킨다.

사람 mRNA 단리를 위한 샘플은 다음을 포함한다: 휴지기의 말초혈 단핵 세포(단구, T 세포, NK 세포, 과립구, B 세포)(T100); 항-CD3으로 2, 6, 12시간 동안 활성화시켜 풀링한 말초혈 단핵 세포(T101); 휴지기의 T 세포, TH0 클론 Mot 72(T102); TH0 클론 Mot 72, 항-CD28 및 항-CD3으로 3, 6, 12시간 동안 활성화시켜 풀링한 T 세포(T103); TH0 클론 Mot 72, 특이적 펩타이드로 2, 7, 12시간 동안 면역성 결핍 처리하여 풀링한 T 세포(T104); 휴지기의 T 세포, TH1 클론 HY06(T107); TH1 클론 HY06, 항-CD28 및 항-CD3으로 3, 6, 12시간 동안 활성화시켜 풀링한 T 세포(T108); TH1 클론 HY06, 특이적 펩타이드로 2, 6, 12시간 동안 면역성 결핍 처리하여 풀링한 T 세포(T109); 휴지기의 T 세포, TH2 클론 HY935(T110); TH2 클론 HY935, 항-CD28 및 항-CD3으로 2, 7, 12시간 동안 활성화시켜 풀링한 T 세포(T111); 휴지기의 T 세포 종양 세포주 Jurkat 및 Hut78(T117); 풀링한 AD130.2, Tc783.12, Tc783.13, Tc783.58, Tc782.69, 휴지기의 T 세포 클론(T118); 휴지기의 T 세포 랜덤 $_{\gamma}\delta$ T 세포 클론(T119); CD-28-T 세포 클론; 휴지기의 비장 세포(B100); 항-CD40 및 IL-4로 활성화시킨 비장 세포(B101); 풀링한 WT49, RSB, JY, CVIR, 721.221, RM3, HSY, 휴지기의 B 세포 EBV 세포주(B102); PMA 및 이오노마이신으로 1, 6시간 동안 활성화시켜 풀링한 B 세포주 JY(B103); 풀링한 휴지기의 NK 20 클론(K100); PMA 및 이오노마이신으로 6시간 동안 활성화시켜 풀링한 NK 20 클론(K101); LGL 백혈구 환자의 말초혈로부터 유도하여 IL-2 처리한 NKL 클론(K106); PMA 및 이오노마이신으로 1, 6시간 동안 활성화시켜 풀링한 조혈세포 전구체 세포주 TF1(C100); 휴지기의 U937 전단구 세포주(M100); PMA 및 이오노마이신으로 1, 6시간 동안 활성화시켜 풀링한 U937 전단구 세포주(M101); LPS, IFNγ, 항-IL-10으로 1, 2, 6, 12, 24시간 동안 활성화시켜 풀링한 세정된 단구(M102); LPS, IFNγ, IL-10으로 1, 2, 6, 12, 24시간 동안 활성화시켜 풀링한 세정된 단구(M103); LPS, IFNγ, 항-IL-10으로 4, 16시간 동안 활성화시켜 풀링한 세정된 단구(M106); LPS, IFNγ, IL-10으로 4, 16시간 동안 활성화시켜 풀링한 세정된 단구(M107); LPS로 1시간 동안 활성화시킨 세정된 단구(M108); LPS로 6시간 동안 활성화시킨 세정된 단구(M109); CD34+ GM-CSF로부터, TNFα 12일, 휴지기의 DC 70% CD1a+ (D101); CD34+ GM-CSF로부터, TNFα 12일, PMA 및 이오노마이신으로 1시간 동안 활성화시킨 DC 70% CD1a+ (D102); CD34+ GM-CSF로부터, TNFα 12일, PMA 및 이오노마이신으로 6시간 동안 활성화시킨 DC 70% CD1a+ (D103); CD34+ GM-CSF로부터, TNFα 12일, FACS로 분류하고, PMA 및 이오노마이신으로 1, 6시간 동안 활성화시켜 풀링한 DC 95% CD1a+ (D104); ex CD34+ GM-CSF, TNFα 12일, FACS로 분류하고, PMA 및 이오노마이신으로 1, 6시간 동안 활성화시켜 풀링한 DC 95% CD14+ (D105); CD34+ GM-CSF로부터, TNFα 12일, FACS로 분류하고, PMA 및 이오노마이신으로 1, 6시간 동안 활성화시켜 풀링한 DC CD1a+ CD86+ (D106); IL-4 5일, 단구 GM-CSF로부터의 휴지기의 DC(D107); IL-4 5일, 단구 GM-CSF로부터의 휴지기의 DC(D108); IL-4 5일, LPS로 4, 16시간 동안 활성화시켜 풀링한, 단구 GM-CSF로부터의 DC(D109); IL-4 5일, TNFα, 단구 supe로 4, 16시간 동안 활성화시켜 풀링한, 단구 GM-CSF로부터의 DC(D110); 비자극시킨 상피 세포; IL-1β 활성화시킨 상피 세포; PMA 및 이오노마이신으로 1, 6시간 동안 활성화시켜 풀링한 폐 섬유아세포 암종 세포주 MRC5(C101); PMA 및 이오노마이신으로 1, 6시간 동안 활성화시켜 풀링한 신장 상피 암종 세포주 CHA(C102). IL-B30 전사체의 발현은 LPS, IFNγ, 항-IL-10으로 4, 16시간 동안 활성화시켜 풀링한 세정된 단구(M106); LPS, INFγ, 항-IL-10으로 1, 2, 6, 12, 14시간 동안 활성화시켜 풀링한 세정된 단구(M102); LPS로 6시간 동안 활성화시킨 세정된 단구(M109); 및 LPS로 1시간 동안 활성화시킨 세정된 단구(M108)에서 매우 높다. 발현은 하기 샘플에서 높다: CD34+ GM-CSF로부터, TNFα 12일, FACS로 분류시키고, PMA 및 이오노마이신으로 1, 6시간 동안 활성화시켜 풀링한 DC 95% CD1a+ (D104); 및 PMA 및 이오노마이신으로 6시간 동안 활성화시켜 풀링한 NK 20 클론(K101). 보다 적은 발현이 하기 샘플에서 검출된다: CD34+ GM-CSF로부터, TNFα 12일, PMA 및 이오노마이신으로 6시간 동안 활성화시킨 DC 70% CD1a+ (D103); CD34+ GM-CSF로부터, TNFα 12일, PMA 및 이오노마이신으로 1시간 동안 활성화시킨 DC 70% CD1a+ (D102); TH1 클론 HY06, 특이적 펩타이드로 2, 6, 12시간 동안 면역성 결핍 처리하여 풀링한 T 세포(T109); 항-CD3으로 2, 6, 12시간 동안 활성화시켜 풀링한 말초혈 단핵 세포(T101); TH0 클론 Mot 72, 항-CD28 및 항-CD3으로 3, 6, 12시간 동안 활성화시켜 풀링한 T 세포(T103); 항-CD40 및 IL-4로 활성화시킨 비장 세포(B101); TH0 클론 Mot 72, 특이적 펩타이드로 2, 7, 12시간 동안 면역성 결핍 처리하여 풀링한 T 세포(T104); 휴지기의 비장 세포(B100); TH1 클론 HY06, 항-CD28 및 항-CD3으로 3, 6, 12시간 동안 활성화시켜 풀링한 T 세포(T108); LPS, IFNγ, IL-10으로 4, 16시간 동안 활성화시켜 풀링한 세정된 단구(M107); 및 PMA 및 이오노마이신으로 1, 6시간 동안 활성화시켜 풀링한 B 세포주 JY(B103). 검출가능한 발현은 다음 샘플에서 관찰된다: IL-4 5일, LPS로 4, 16시간 동안 활성화시켜 풀링한 단구 GM-CSF로부터의 DC(D109); TH0 클론 Mot 72, 휴지기의 T 세포(T102); 휴지기의 말초혈 단핵 세포(단구, T 세포, NK 세포, 과립구, B 세포)(T100); 항-CD-28, IL-4 및 항 IFN-γ에서 27일 동안 분극화시킨 T 세포 CD4+ CD45RO- T 세포, TH2 분극화시키고, 항-CD3 및 항-CD28로 4시간 동안 활성화시킨 T 세포(T116); 풀링한 AD130.2, Tc783.12, Tc783.13, Tc783.58, Tc782.69, 휴지기의 T 세포 클론(T118); 휴지기의 U937 전단구 세포주(M100); PMA 및 이오노

마이신으로 1, 6시간 동안 활성화시켜 풀링한 조혈세포 전구체 세포주 TF1(C100); TH2 클론 HY935, 항-CD28 및 항-CD3으로 2, 7, 12시간 동안 활성화시켜 풀링한 T 세포(T111); CD34+ GM-CSF로부터, TNFα 12일, FACS로 분류하고, PMA 및 이오노마이신으로 1, 6시간 동안 활성화시켜 풀링한 DC CD1a+ CD86+ (D106); LPS, IFNɣ, 항-IL-10으로 1, 2, 6, 12, 24시간 동안 활성화시켜 풀링한 세정된 단구(M103); IL-4 5일, TNFα, 단구 supe로 4, 16시간 동안 활성화시켜 풀링한, 단구 GM-CSF로부터의 DC(D110); IL-4 5일, 휴지기의 단구 GM-CSF로부터의 DC(D108); PMA 및 이오노마이신으로 1, 6시간 동안 활성화시켜 풀링한 U937 전단구 세포주(M101); 휴지기의 T 세포 랜덤 $_{\gamma}\delta$ T 세포 클론(T119); 및 TH1 클론 HY06, 항-CD28 및 항-CD3으로 3, 6, 12시간 동안 활성화시켜 풀링한 T 세포(T108). 다른 샘플에서는 어떠한 시그날도 검출되지 않았다.

요약하면, 분포는 활성화된 마크로파지에서 IL-B30의 증가를 나타내는데, 이는 염증에서의 역할을 시사하고; 활성화된 Th1 세포에서는 T 헬퍼 서브세트, 특히 Th1 면역 반응에서의 조절 또는 효능인자 역할을 시사하며; 활성화된 수지상 세포는 DC와 항원 제시 또는 원시 중심 T 또는 B 세포 상호반응에서의 역할을 시사한다.

마우스 mRNA 단리를 위한 샘플에는 다음이 포함된다: 휴지기의 마우스 섬유아세포 L 세포주(C200); Braf:ER(에스트로겐 수용체에 대한 Braf 융합) 형질감염된 세포, 대조군(C201); 비장으로부터의 휴지기의 Me114+ 천연 T 세포(T209); IFNɣ, IL-12 및 항 IL-4로 자극시켜 TH1 세포로 분극화시키고, IFNɣ 및 IL-4에 6, 12, 24시간 동안 노출시켜 풀링한, 비장으로부터의 휴지기의 Me114+ 천연 T 세포(T210); IL-4 및 항-IFNɣ로 자극시켜 Th2 세포로 분극화시키고, IL-4 및 항 IFNɣ에 6, 13, 24시간 동안 노출시켜 풀링한, 비장으로부터의 Me114+ 천연 T 세포(T211); TH1로 분극화시킨 T 세포(Me114 밝음, 비장으로부터의 CD4+ 세포, 7일 동안 IFN-ɣ 및 항 IL-4로 분극화시킴; T200); TH2로 분극화시킨 T 세포(Me114 밝음, 비장으로부터의 CD4+ 세포, 7일 동안 IL-4 및 항-IFNɣ로 분극화시킴; T201); T 세포, 유전자이식 Balb/c로부터 3회 분극화시킨 고도의 TH1(Openshaw, et al. (1995) J. Exp. Med. 182: 1357-1367; 항-CD3으로 2, 6, 24시간 동안 활성화시켜 풀링함; T202); T 세포, 유전자이식 Balb/C로부터 3회 분극화시킨 고도의 TH2(항-CD3으로 2, 6, 24시간 동안 활성화시켜 분극화시킴(T203); T 세포, 유전자이식 C57 bl 6으로부터 3회 분극화시킨 고도의 TH1(항-CD3으로 2, 6, 24시간 동안 활성화시켜 풀링함; T212); T 세포, 유전자이식 C57 b1/6으로부터 3회 분극화시킨 고도의 TH2(항-CD3으로 2, 6, 24시간 동안 활성화시켜 풀링함; T213); T 세포, 분극화시킨 고도의 TH1(유전자이식 Balb/c로부터의 천연 CD4+ T 세포, IFNɣ, IL-12 및 항-IL-4로 3회 분극화시키고; IGIF, IL-12 및 항 IL-4로 6, 12, 24시간 동안 자극시켜 풀링함); 흉선으로부터 분류한 CD44- CD25+ pre T 세포(T204); 항원으로 마지막 자극시킨 후 3주 동안 휴지된 TH1 T 세포 클론 D1.1(T205); 15시간 동안 ConA 10μg/ml로 자극시킨 TH1 T 세포 클론 D1.1(T206); 항원으로 마지막 자극시킨 후 3주 동안 휴지된 TH2 T 세포 클론 CDC35(T207); 15시간 동안 ConA 10μg/ml로 자극시킨 TH2 T 세포 클론 CDC35(T208); 비자극시킨 B 세포주 CH12(B201); 비자극시킨 성숙한 B 세포 백혈구 세포주 A20(B200); 비장으로부터 비자극시킨 거대한 B 세포(B202); LPS로 활성화시킨 전체 비장으로부터의 B 세포(B203); 비장으로부터 메트리즈아미드 풍부한 휴지기의 수지상 세포(D200); 골수로부터의 휴지기의 수지상 세포(D201); 항 B220, 항 CD3 및 항 부류 II를 제거시켜 GM-CSF 및 IL-4에서 배양한 비자극된 골수 유도된 수지상 세포 (D202); 항 B220, 항 CD3 및 항 부류 II를 제거시켜 GM-CSF 및 IL-4에서 배양시키고, 항 CD40으로 1, 5일 동안 자극시켜 풀링한 골수 유도된 수지상 세포(D203); LPS로 4시간 동안 활성화시킨 단구 세포주 RAW 264.7(M200); GM 및 M-CSF로 유도한 골수 마크로파지(M201); LPS, IFNɣ 및 IL-10으로 24시간 동안 자극시킨 GM-CSF로 유도한 골수 마크로파지(M205); LPS, IFNɣ 및 항 IL-10으로 24시간 동안 자극시킨 GM-CSF로 유도한 골수 마크로파지(M206); 복막 마크로파지(M207); 휴지기의 마크로파지 세포주 J774(M202); 0.5, 1, 3, 6, 12시간에서 풀링한 마크로파지 세포주 J774 + LPS + 항-IL-10(M203); 0.5, 1, 3, 5, 12시간에서 풀링한 마크로파지 세포주 J774 + LPS + IL-10(M204); 비자극시킨 비만 세포주 MC-9 및 MCP-12(M208); 뇌 미세혈관 상피 세포로부터 유도하여 비자극시킨 불멸 내피 세포주(E200); 뇌 미세혈관 내피 세포로부터 유도하여 TNFα로 밤새 자극시킨 불멸 내피 세포주(E201); 뇌 미세혈관 내피 세포로부터 유도하여 TNFα로 밤새 자극시킨 불멸 내피 세포주(E202); 뇌 미세혈관 내피 세포로부터 유도하여 TNFα 및 IL-10으로 밤새 자극시킨 불멸 내피 세포주(E203); wt C57 bl/6 마우스로부터의 전체 대동맥; 5개월령 ApoE KO 마우스로부터의 전체 대동맥(X207); 12개월령 ApoE KO 마우스로부터의 전체 대동맥(X214); 전체 흉선, rag-1(O208); 전체 신장, rag-1(O209); 전체 신장, NZ B/W 마우스; 및 전체 심장, rag-1(O202). 고도의 시그날이 다음 샘플에서 검출된다: LPS로 4시간 동안 활성화시킨 단구 세포주 RAW 264.7(M200); T 세포, 유전자이식 C57 bl 6으로부터 3회 분극화시킨 고도의 TH1(항-CD3으로 2, 6, 24시간 동안 활성화시켜 풀링함; T212); 및 T 세포, 분극화시킨 고도의 TH1(유전자이식 Balb/c로부터의 천연 CD4+ T 세포, IFNɣ, IL-12 및 항-IL-4로 3회 분극화시키고; IGIF, IL-12 및 항 IL-4로 6, 12, 24시간 동안 자극시켜 풀링함). 검출가능한 시그날이 다음 샘플에서 검출되었다: T 세포, 유전자이식 Balb/C로부터 3회 분극화시킨 고도의 TH1(Openshaw, et al. (1995) J. Exp. Med. 182: 1357-1367 참조; 항-CD3으로 2, 6, 24시간 동안 활성화시켜 풀링함; T202); T 세포, 분극화시킨 TH2(Me114 밝음, 비장으로부터의 CD4+ 세포, 7일 동안 IL-4 및 항-IFNɣ로 분극화시킴; T201); T 세포, 분극화시킨 TH1(Me114 밝음, 비장으로부터의 CD4+ 세포, 7일 동안 IFN-ɣ 및 항 IL-4로 분극화시킴; T200); 0.5, 1, 3, 6, 12시간에서 풀링한 마크로파지 세포주 J774+ LPS+ 항-IL-10(M203); 휴지기의 마크로파지 세포주 J774(M202); 0.5, 1, 3, 5, 12시간에서 풀링

한 마크로파지 세포주 J774 + LPS + IL-10(M204); 뇌 미세혈관 내피 세포로부터 유도하여 TNFα로 밤새 자극시킨 불멸 내피 세포주(E201); 및 GM-CSF로 유도하여 LPS, IFNɣ 및 항 IL-10으로 24시간 동안 자극시킨 골수 마크로파지(M206). 다른 샘플에서는 어떠한 시그날도 나타나지 않았다. RAW 264.7 마우스 단구 세포주내에서의 발현은 단백질에 대한 천연 공급원을 시사한다.

IV. IL-B30의 염색체 지도

IL-B30을 암호화하는 단리된 cDNA가 사용된다. 염색체 지도는 표준 기술이다[참조: BIOS Laboratories (New Haven, CT) 및 PCR에 마우스 체세포 하이브리드 패널을 사용하는 방법]. 상황 증거는 마우스 IL-B30 유전자가 염색체 10으로 지도화되는 것을 제시한다.

V. IL-B30 단백질의 정제

다중 형질감염된 세포주를 다른 세포와 비교하여 고도로 사이토킨을 발현하는 것에 대해 스크리닝한다. 다양한 세포주를 스크리닝하여 바람직한 취급 특성에 대해 선별한다. 천연 IL-B30은 천연 공급원으로부터 단리하거나, 적절한 발현 벡터를 사용하여 형질전환된 세포로부터 발현시킴으로써 단리할 수 있다. 발현된 단백질의 정제는 표준 공정에 의해 수행하거나, 세포 분해물 또는 상층액으로부터 고효율로 효과적으로 정제시키는 조작된 수단과 조합할 수 있다. FLAG 또는 His6 절편은 이러한 정제 특징을 위해 사용될 수 있다. 한편, 친화성 크로마토그래피를 특정한 항체에 사용할 수 있다(하기 참조).

단백질은 목적하는 바에 따라 콜라이(coli), 곤충 세포 또는 포유동물 발현 시스템에서 생산한다.

VI. 상동성 IL-B30 유전자의 단리

IL-B30 cDNA, 또는 기타 종의 대응 서열은 목적하는 공급원으로부터 라이브러리(예: 영장류 세포 cDNA 라이브러리)를 스크리닝하기 위한 하이브리드화 프로브로서 사용할 수 있다. 다수의 상이한 종이 용이한 하이브리드화에 요구되는 엄격성 및 프로브를 사용한 존재에 대해 스크리닝될 수 있다. 적절한 하이브리드화 조건을 사용하여 교차 하이브리드화 특이성을 나타내는 클론을 선별할 수 있다.

또한, 상기 펩타이드 서열에 근거한 변성 프로브를 사용하는 하이브리드화에 의한 스크리닝은 적절한 클론을 단리시킨다. 한편, PCR 스크리닝을 위한 적절한 프라이머의 사용은 적절한 핵산 클론을 풍부하게 할 수 있다.

유사한 방법이 종, 다형성 변이체 또는 대립인자 변이체의 단리에도 적용될 수 있다. 종 변이체는 프로브로서 전체 길이의 단리물 또는 특정한 종으로부터 단편의 단리에 근거하는 교차-종 하이브리드화 기술을 사용하여 단리한다.

한편, 사람 IL-B30에 대해 유도된 항체를 사용하여 적절한 cDNA 라이브러리로부터 교차-반응성 단백질을 발현하는 세포를 스크리닝할 수 있다. 정제된 단백질 또는 정의된 펩타이드는 상기 기재된 바와 같이 표준 방법에 의해 항체를 생성하는데 유용하다. 합성 펩타이드 또는 정제된 단백질을 면역계에 제시하여 모노클로날 또는 폴리클로날 항체를 생성한다[참조: Coligan (1991) Current Protocols in Immunology Wiley/Greene; and Harlow and Lane (1989) Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Press]. 생성된 항체는 상술된 바와 같이 스크리닝, 정제 또는 진단에 사용된다.

VII. IL-B30에 특이적인 항체의 제조

합성 펩타이드 또는 정제된 단백질을 면역계에 제시하여 모노클로날 또는 폴리클로날 항체를 생성한다[참조: Coligan (1991) Current Protocols in Immunology Wiley/Greene; and Harlow and Lane (1989) Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Press]. 폴리클로날 혈청, 또는 하이브리도마를 제조할 수 있다. 적절한 상황하에서, 결합 시약을 형광 등으로 상술된 바와 같이 표지하거나, 패닝 방법을 위한 기질에 고정시킨다. 면역선택성 및 관련 기술은 경우에 따라 선택성 시약을 제조하는데 이용할 수 있다.

VIII. 다양한 생물학적 작용의 평가

IL-B30의 생물학적 활성은 IL-B30과 IL-6 및 G-CSF 사이의 서열 및 구조적 상동성에 근거하여 시험하였다. 먼저, IL-6 또는 G-CSF의 생물학적 활성을 나타내는 검정물을 시험한다.

A. 세포 증식에 대한 효과

각종 유형의 세포 증식에 대한 효과를 다양한 사이토킨 농도를 사용하여 시험한다. 관련된 사이토킨 IL-6, G-CSF 등과 배합하여 용량 반응 분석을 수행한다.

B. 사람 단구상에서 세포 표면 분자의 발현에 대한 효과

단구를 정상의 건강한 공여자의 말초혈 단핵 세포로부터 네가티브 선별에 의해 정제한다. 요약하면, 3×10^8 피콜 밴드의 단핵 세포를 200μl의 αCD2(Leu-5A), 200μl의 αCD3(Leu-4), 100μl의 αCD8(Leu 2a),100μl의 αCD19(Leu-12), 100μl의 αCD20(Leu-16), 100μl의 αCD56(Leu-19), 100μl의 αCD67(IOM 67; Immunotech, Westbrook, ME), 및 항-글리코포린 항체(10F7MN, ATCC, Rockville, MD)로 이루어진 모노클로날 항체의 칵테일(Becton-Dickinson; Mountain View, CA)와 함께 얼음상에서 항온처리한다. 항체 결합된 세포를 세척하고, 20:1의 세포 비율로 비드에 양 항-마우스 IgG 커플링된 자기 비드(Dynal, Oslo, Norway)와 함께 항온처리한다. 항체 결합된 세포를 자기장의 적용에 의해 단구로부터 분리한다. 이어서, 사람 단구를 IL-B30, IL-6, G-CSF 또는 이들의 조합물의 존재 또는 부재하에 1% 사람 AB 혈청을 함유하는 이쎌 배지(Yssel's medium)(Gemini Bioproducts, Calabasas, CA)에서 배양한다.

세포 표면 분자의 발현 분석은 직접적인 면역형광에 의해 수행할 수 있다. 예를 들면, 2×10^5 정제된 사람 단구를 1% 사람 혈청을 함유하는 인산염 완충된 염수(PBS)중에서 얼음상에서 20분 동안 항온처리한다. 세포를 200×g으로 펠렛화한다. 세포를 20ml PE 또는 FITC 표지된 mAb중에 재현탁시킨다. 얼음상에서 20분 동안 추가로 항온처리한 후, 세포를 1% 사람 혈청을 함유하는 PBS중에서 세척한 다음 PBS 단독에서 2회 세척한다. 1% 파라포름알데하이드를 함유하는 PBS에서 세포를 고정시키고, FACScan 유동 혈구계산기(Becton Dickinson; Mountain View, CA)상에서 분석한다. 예시적인 mAb는 다음과 같다: CD11b(항-mac1), CD11c(a gp150/95), CD14(Leu-M3), CD54(Leu 54), CD80(항-BB1/B7), Becton-Dickinson으로부터의 HLA-DR(L243) 및 CD86(FUN 1; Pharmingen), CD64(32.2; Medarex), CD40(mAb89; Schering-Plough France).

C. 사람 단구에 의한 사이토킨 생성에 대한 IL-B30의 효과

사람 단구를 기술된 바와 같이 단리하고, IL-B30(1/100 희석된 바쿨로바이러스 발현된 물질)의 존재 또는 부재하에 1% 사람 AB 혈청을 함유하는 이쎌 배지(Gemini Bioproducts, Calabasas, CA)에서 배양한다. 또한, 단구를 IL-B30의 존재 또는 부재하에 LPS(E. coli 0127:B8 Difco)로 자극하고, 세포 배양 상층액중의 사이토킨(IL-1β, IL-6, TNFα, GM-CSF 및 IL-10)의 농도를 ELISA에 의해 측정한다.

사이토킨에 대한 세포질내 염색을 위해, 단구를 IL-B30 및 LPS(E. coli 0127:B8 Difco) 및 1mg/ml 브레펠딘 A (Epicentre technologies Madison WI)의 존재 또는 부재하에 12시간 동안 이쎌 배지에서 배양한다(1밀리온/ml). 세포를 PBS중에서 세척하고, 2% 포름알데하이드/PBS 용액중에서 20분 동안 실온으로 항온처리한다. 이어서, 세포를 세척하고, 투과성 완충제(PBS/BSA(0.5%)/아지드(1mM)중의 0.5% 사포닌(Sigma))중에 재현탁시키며, 20분 동안 실온에서 항온처리한다. 세포(2×10^5)를 원심분리하고, 투과성 완충액중에 1:10으로 희석된 20ml의 직접 접합된 항-사이토킨 mAb중에 20분 동안 실온에서 재현탁시킨다. 하기 항체를 사용할 수 있다: IL-1α-PE(364-3B3-14); IL-6-PE(MQ2-13A5); TNFα-PE(MAb11); GM-CSF-PE(BVD2-21C11); 및 IL-12-PE(C11.5.14; Pharmingen San Diego, CA). 이어서, 세포를 투과성 완충액에서 2회 및 PBS/BSA/아지드 중에서 1회 세척하고, FACScan 유동 혈구계산기(Becton Dickinson; Mountain View, CA)상에서 분석한다.

D. 사람 말초혈 단핵 세포(PBMC)의 증식에 대한 IL-B30의 효과

전체 PBMC는 문헌[참조: Boyum, et al.]에 기재된 바와 같이 피콜-하이파크를 통해 원심분리하여 정상의 건강한 공여체의 담갈색 피복물로부터 단리한다. PBMC를 IL-B30의 존재 또는 부재하에 96 웰 플레이트(Falcon, Becton-Dickinson, NJ)중의 1% 사람 AB 혈청을 함유하는 200μl의 이쎌 배지(Gemini Bioproducts, Calabasas, CA)에서 배양한다. 세포를 배지 단독으로 배양하거나, 100U/ml의 IL-2(R&D System)와 조합하여 120시간 동안 배양한다. 마지막 6시간 배양중에 3H-티미딘(0.1mCi)을 가하고, 액체 신틸레이션 계수에 의해 3H-티미딘 도입을 측정한다.

천연 단백질, 재조합 단백질 및 융합 단백질을 다수의 상이한 생물학적 검정 시스템(예: T-세포, B-세포, NK, 마크로파지, 수지상 세포, 조혈 원종세포 등)에서 효능제 및 길항제 활성에 대해 시험한다. IL-6 및 G-CSF의 구조적 상관관계로 인해, 이들 활성과 관련된 검정물을 분석하여야 한다.

IL-B30은 IL-6 또는 G-CSF 수용체을 발현시키는 형질감염된 세포 및 대조군에 대한 효능제 또는 길항제 활성에 대해 평가한다[참조: Ho, et al. (1993) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90, 11267-11271; Ho, et al. (1995) Mol. Cell. Biol. 15: 5043-5053; and Liu, et al. (1994). J. Immunol. 152: 1821-1829].

IL-B30은 마크로파지/수지상 세포 활성화 및 항원 제시 검정물에서의 효과, T 세포 사이토킨 생성 및 항원 또는 대립유전자 자극인자에 대한 반응시의 증식에 대해 평가한다[참조: de Waal Malefyt et al. (1991) J. Exp. Med. 174: 1209-1220; de Waal Malefyt et al. (1991) J. Exp. Med. 174: 915-924; Fiorentino, et al. (1991) J. Immunol. 147, 3815-3822; Fiorentino, et al. (1991) J. Immunol. 146: 3444-3451; and Groux, et al. (1996) J. Exp. Med. 184: 19-29].

또한, IL-B30은 NK 세포 자극에 대한 효과에 대해 평가할 수 있다. 검정은 문헌[참조: Hsu, et al. (1992) Internat. Immunol. 4: 563-569; and Schwarz, et al. (1994) J. Immunother. 16: 95-104]에 근거할 수 있다.

B 세포 성장 및 분화 효과는 IgG2 및 IgA2 스위치 인자 검정을 포함하여 문헌[참조: Defrance, et al. (1992). J. Exp. Med. 175: 671-682; Rousset, et al. (1992) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89: 1890-1893]에 기재된 방법에 의해 분석할 수 있다. COS7 상층액과는 달리, NIH3T3 및 COP 상층액은 사람 B 세포 검정을 명백하게 간섭하지 않음에 주목하여야 한다.

IX. 유전적으로 변형된 동물의 생성 및 분석

유전자이식 마우스는 표준 방법에 의해 생성할 수 있다. 이러한 동물은 특이적 조직내에서 또는 유기체 전체에 걸쳐 유전자의 결실 효과를 측정하는데 유용하다. 이러한 것은 다양한 단계에서 동물 또는 특정 조직의 성장에 대한 흥미로운 통찰을 제공할 수 있다. 더욱이, 생물학적 스트레스에 대한 다양한 반응 효과를 평가할 수 있다[참조: Hogan, et al. (1995) Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual (2d ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press].

유전자이식 마우스가 생성되었는데, 이 동물은 생존하여 출생하였으나, 생육에 실패하여 전형적으로 수주내에 사망한다. 상기 작제물은 광범위하고 고도의 발현을 유도해야 하는 경우에는 CMV 인핸서를 갖는 액틴 프로모터에 기초한다. 당해 마우스는 IL-6 유전자이식 마우스와 한 배에서 태어났다. 또한, 이들은 팽창된 복부, 위장 및 장내의 염증, 간으로의 세포 침윤 및 전형적으로 50일 이내의 사망을 나타낸다. 이들 마우스는 번식시키지 않는다. 유전자이식 마우스의 제2 서브세트는 덜 엄격한 표현형을 가지며, 이들의 육종 시도가 수행된다.

마우스 IL-B30의 게놈 구조가 결정되었다. IL-B30 녹-아웃(knock-out) 마우스에 대한 생산 전략을 개발하고, 작제를 개시한다.

본원에 인용된 모든 참조 문헌은 각각의 공보 또는 특허원이 이의 전체로서 모든 목적을 위해 참조로서 인용되도록 구체적으로 및 개별적으로 지시되는 바와 동일한 정도로 본원에서 참조로서 인용된다.

본 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 자명한 바와 같이, 본 발명의 많은 변형 및 변화가 본 발명의 정신 및 범주를 벗어나지 않고도 이루어질 수 있다. 본원에 기재된 특정한 양태는 단지 예시를 위해 제공된 것이며, 본 발명은 청구의 범위가 포함하는 전체 범위의 등가물과 함께 첨부된 청구의 범위에 의해서만 제한되어야 한다.

서열목록

<110> Schering Corporation
<120> Mammalian cytokine: interleukin-B20 and related reagents
<130> 5-1998-069738-4
<150> US 08/900,905
<151> 1997-07-25
<160> 16
<170> KOPATIN 1.5
<210> 1
<211> 570

<212> DNA
<213> Primate
<220>
<223> single, linear, cDNA, primate IL-B30 natural nucleic acid sequence
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(567)
<220>
<221> mat_peptide
<222> (64)..(567)
<400> 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 Leu Pro Trp Thr
-21
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
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
```

<210> 2
<211> 189
<212> PRT
<213> Primate
<220>
<223> linear, protein, primate IL-B30 natural amino acid sequence
<400> 2

```
Met Leu Gly Ser Arg Ala Val Met Leu Leu Leu Leu Leu Pro Trp Thr
-21
Ala Gln Gly Arg Ala Val Pro Gly Gly Ser Ser Pro Ala Trp Thr Gln
Cys Gln Gln Leu Ser Gln Lys Leu Cys Thr Leu Ala Trp Ser Ala His
Pro Leu Val Gly His Met Asp Leu Arg Glu Glu Gly Asp Glu Glu Thr
Thr Asn Asp Val Pro His Ile Gln Cys Gly Asp Gly Cys Asp Pro Gln
Gly Leu Arg Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile His Gln Gly
```

60
Leu Ile Phe Tyr Glu Lys Leu Leu Gly Ser Asp Ile Phe Thr Gly Glu
Pro Ser Leu Leu Pro Asp Ser Pro Val Ala Gln Leu His Ala Ser Leu
Leu Gly Leu Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Gly His His Trp Glu Thr
Gln Gln Ile Pro Ser Leu Ser Pro Ser Gln Pro Trp Gln Arg Leu Leu
Leu Arg Phe Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Val Ala Val Ala
140
Ala Arg Val Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Ser Pro
<210> 3
<211> 1203
<212> DNA
<213> Rodent
<220>
<223> single, linear, cDNA, rodent IL-B30 natural nucleic acid sequence
<220>
<221> CDS
<222> (113)..(700)
<220>
<221> mat_peptide
<222> (176)..(700)
<400> 3
cgcttagaag tcggactaca gagttagact cagaaccaaa ggaggtggat agggggtcca 60
caggcctggt gcagatcaca gagccagcca gatctgagaa gcagggaaca ag 112
atg ctg gat tgc aga gca gta ata atg cta tgg ctg ttg ccc tgg gtc 160
Met Leu Asp Cys Arg Ala Val Ile Met Leu Trp Leu Leu Pro Trp Val
-21
act cag ggc ctg gct gtg cct agg agt agc agt cct gac tgg gct cag 208
Thr Gln Gly Leu Ala Val Pro Arg Ser Ser Ser Pro Asp Trp Ala Gln
tgc cag cag ctc tct cgg aat ctc tgc atg cta gcc tgg aac gca cat 256
Cys Gln Gln Leu Ser Arg Asn Leu Cys Met Leu Ala Trp Asn Ala His
gca cca gcg gga cat atg aat cta cta aga gaa gaa gag gat gaa gag 304
Ala Pro Ala Gly His Met Asn Leu Leu Arg Glu Glu Glu Asp Glu Glu
act aaa aat aat gtg ccc cgt atc cag tgt gaa gat ggt tgt gac cca 352
Thr Lys Asn Asn Val Pro Arg Ile Gln Cys Glu Asp Gly Cys Asp Pro
caa gga ctc aag gac aac agc cag ttc tgc ttg caa agg atc cgc caa 400
Gln Gly Leu Lys Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile Arg Gln
60
ggt ctg gct ttt tat aag cac ctg ctt gac tct gac atc ttc aaa ggg 448
Gly Leu Ala Phe Tyr Lys His Leu Leu Asp Ser Asp Ile Phe Lys Gly
gag cct gct cta ctc cct gat agc ccc atg gag caa ctt cac acc tcc 496
Glu Pro Ala Leu Leu Pro Asp Ser Pro Met Glu Gln Leu His Thr Ser
cta cta gga ctc agc caa ctc ctc cag cca gag gat cac ccc cgg gag 544
Leu Leu Gly Leu Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Asp His Pro Arg Glu
acc caa cag atg ccc agc ctg agt tct agt cag cag tgg cag cgc ccc 592
Thr Gln Gln Met Pro Ser Leu Ser Ser Ser Gln Gln Trp Gln Arg Pro
ctt ctc cgt tcc aag atc ctt cga agc ctc cag gcc ttt ttg gcc ata 640
Leu Leu Arg Ser Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Leu Ala Ile
140
gct gcc cgg gtc ttt gcc cac gga gca gca act ctg act gag ccc tta 688
Ala Ala Arg Val Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Thr Glu Pro Leu
gtg cca aca gct taaggatgcc caggttccca tggctaccat gataagacta 740
Val Pro Thr Ala

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
<210> 4
<211> 196
<212> PRT
<213> Rodent
<220>
<223> linear, protein, rodent IL-B30 natural amino acid sequence
<400> 4
Met Leu Asp Cys Arg Ala Val Ile Met Leu Trp Leu Leu Pro Trp Val
-21
Thr Gln Gly Leu Ala Val Pro Arg Ser Ser Ser Pro Asp Trp Ala Gln
Cys Gln Gln Leu Ser Arg Asn Leu Cys Met Leu Ala Trp Asn Ala His
Ala Pro Ala Gly His Met Asn Leu Leu Arg Glu Glu Glu Asp Glu Glu
Thr Lys Asn Asn Val Pro Arg Ile Gln Cys Glu Asp Gly Cys Asp Pro
Gln Gly Leu Lys Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile Arg Gln
60
Gly Leu Ala Phe Tyr Lys His Leu Leu Asp Ser Asp Ile Phe Lys Gly
Glu Pro Ala Leu Leu Pro Asp Ser Pro Met Glu Gln Leu His Thr Ser
Leu Leu Gly Leu Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Asp His Pro Arg Glu
Thr Gln Gln Met Pro Ser Leu Ser Ser Ser Gln Gln Trp Gln Arg Pro
Leu Leu Arg Ser Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Leu Ala Ile
140
Ala Ala Arg Val Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Thr Glu Pro Leu
Val Pro Thr Ala
<210> 5
<211> 102
<212> PRT
<213> Pig
<220>
<223> not relevant, linear, peptide, pig IL-B30
<400> 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

<210> 6
<211> 174
<212> PRT
<213> Bovine
<220>
<223> not relevant, linear, peptide, bovine G-CSF
<400> 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
<210> 7
<211> 174
<212> PRT
<213> Feline
<220>
<223> not relevant, linear, peptide, feline G-CSF
<400> 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

<210> 8
<211> 177
<212> PRT
<213> Human
<220>
<223> not relevant, linear, peptide, human G-CSF
<400> 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

<210> 9
<211> 178
<212> PRT
<213> Mouse
<220>
<223> not relevant, linear, peptide, mouse G-CSF
<400> 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
<210>    10
<211>    186
<212>    PRT
<213>    Otter
<220>
<223>    not relevant, linear, peptide, otter IL-6
<400>    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
<210>    11
<211>    183
<212>    PRT
<213>    Feline
<220>
<223>    not relevant, linear, peptide, feline IL-6
<400>    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
<210>    12
<211>    188
<212>    PRT
<213>    Human
<220>
<223>    single, linear, peptide, human IL-6
<400>    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
<210>    13
<211>    184
<212>    PRT
<213>    Sheep
<220>
<223>    not relevant, linear, peptide, sheep IL-6
<400>    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
<210>    14
<211>    188
<212>    PRT
<213>    Mouse
<220>
<223>    not relevant, linear, peptide, mouse IL-6
<400>    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
<210>    15
<211>    178
<212>    PRT
<213>    Chicken
<220>
<223>    not relevant, linear, peptide, chicken MGF
<400>    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
<210>    16
<211>    185
<212>    PRT
<213>    Kaposi's sarcoma herpes virus (KSHV)
<220>
<223>    not relevant, linear, peptide, KSHV IL-6
<400>    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
```