(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 32 247 T2** 2007.05.31

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 105 485 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 32 247.2**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/18771**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 945 085.1**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/011174**
(86) PCT-Anmeldetag: **20.08.1999**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **02.03.2000**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **13.06.2001**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **05.07.2006**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **31.05.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 15/25*** (2006.01)
C07K 14/545 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

97413 P	**21.08.1998**	**US**
98595 P	**31.08.1998**	**US**
99974 P	**11.09.1998**	**US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Immunex Corp., Thousand Oaks, Calif., US

(72) Erfinder:
SIMS, E., John, Seattle, WA 98105, US; SMITH, E., Dirk, Bainbridge Island, WA 98110, US

(74) Vertreter:
Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg

(54) Bezeichnung: **MENSCHLICHES IL-1 EPSILON DNA UND POLYPEPTIDE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

Gebiet der Erfindung

[0001] Die Erfindung betrifft gereinigte und isolierte neue humane IL-1-epsilon-Polypeptide, für solche Polypeptide kodierende Nukleinsäuren, Verfahren zur Herstellung rekombinanter Formen solcher Polypeptide, Antikörper, die gegen diese Polypeptide erzeugt werden, fragmentierte Peptide, die von diesen Polypeptiden abgeleitet sind, die Verwendung solcher Polypeptide sowie fragmentierter Peptide in zellulären Reaktionen und Immunreaktionen und als Molekulargewichtsmarker, die Verwendung solcher Polypeptide sowie fragmentierter Peptide als Kontrolle für die Peptidfragmentierung, und Kits, die diese Reagenzien umfassen.

BESCHREIBUNG DES STANDES DER TECHNIK

[0002] Interleukin-1 (IL-1) ist Mitglied einer großen Gruppe von Zytokinen, deren Hauptfunktion es ist, Immunantworten und Entzündungsantworten zu vermitteln. Es gibt fünf bekannte IL-1-Familienmitglieder, die IL-1 alpha (IL-1α), IL-1 beta (IL-1β), IL-1 Rezeptor-Antagonist (IL-1ra), IL-1 delta (IL-1δ, wie in PCT US/99/00514 offenbart), und IL-18 (früher bekannt als IGIF und manchmal als IL-1 gamma) umfassen. Das von Makrophagen sekretierte IL-1 ist in Wirklichkeit eine Mischung, die überwiegend aus IL-1β und einigem IL-1α besteht (Abbas et al., 1994). IL-1α und IL-1β, die zunächst als Vorläufermoleküle von 33 kD produziert werden, denen eine Signalsequenz fehlt, werden durch proteolytische Spaltung weiter prozessiert, wobei die aktiven sekretierten Formen entstehen, welche jeweils etwa 17 kD groß sind. Darüber hinaus ist das 33 kD-Vorläufermolekül von IL-1α ebenfalls aktiv. Die beiden Formen von IL-1 sind Produkte zweier verschiedener Gene, die auf dem Chromosom 2 lokalisiert sind. Obwohl diese zwei Formen weniger als 30% homolog zueinander sind, binden beide an dieselben Rezeptoren und haben ähnliche Aktivitäten.

[0003] IL-1ra, eine biologisch inaktive Form von IL-1, ist strukturell zu IL-1 homolog und bindet an dieselben Rezeptoren. Darüber hinaus wird IL-1ra mit einer Signalsequenz produziert, die eine effiziente Sekretion in den extrazellulären Bereich erlaubt, wo es kompetitiv mit IL-1 konkurriert (Abbas et al., 1994).

[0004] Die Liganden der IL-1-Familie binden an zwei IL-1-Rezeptoren, die Mitglieder der Ig-Superfamilie sind. IL-1-Rezeptoren umfassen den 80 kDa-Rezeptor vom Typ I (IL-1RI) und einen 68 kDa-Rezeptor vom Typ II (IL-1RII). Die Liganden binden ferner an ein lösliches proteolytisches Fragment von IL-1RII (sIL-1RII) (Colotta et al., Science 261 (5120):472-75, 1993).

[0005] Die Hauptbezugsquelle für IL-1 ist der aktivierte Makrophage oder der mononukleäre Phagozyt. Andere Zellen, die IL-1 produzieren, umfassen epitheliale und endotheliale Zellen (Abbas et al., 1994). Die IL-1-Sekretion aus Makrophagen tritt auf, nachdem der Makrophage Gram-negativen Bakterien begegnet und diese aufnimmt. Solche Bakterien enthalten in der bakteriellen Zellwand Lipopolysaccharid (LPS)-Moleküle, die auch als Endotoxin bekannt sind. LPS-Moleküle sind aktive Bestandteile, die bei den Makrophagen die Bildung von Tumor-Nekrosefaktor (TNF) und IL-1 stimulieren. In diesem Fall wird IL-1 in Reaktion auf LPS und die Produktion von TNF produziert. Bei niedrigen Konzentrationen stimuliert LPS die Makrophagen und aktiviert B-Zellen und andere Wirt-Reaktionen, die notwendig sind, um die bakterielle Infektion zu beseitigen. Bei hohen Konzentrationen kann LPS jedoch einen schweren Gewebeschaden, einen Schock und sogar den Tod verursachen.

[0006] Die biologischen Funktionen von IL-1 umfassen die Aktivierung von vaskulären endothelialen Zellen und Lymphozyten, eine lokale Gewebezerstörung und Fieber (Janeway et al., 1996). In geringen Mengen stimuliert IL-1 bei Makrophagen und vaskulären endothelialen Zellen die Produktion von IL-6, reguliert Moleküle auf der Oberfläche von vaskulären endothelialen Zellen hoch, um die Adhäsion von Leukozyten zu verstärken, und aktiviert indirekt Entzündungsleukozyten, indem sie bei mononukleären Phagozyten und anderen Zellen die Bildung bestimmter Chemokine stimulieren, welche die Entzündungsleukozyten aktivieren. Diese Funktionen von IL-1 sind bei leichten mikrobiellen Infektionen sehr wichtig. Wenn sich die mikrobielle Infektion jedoch ausweitet, wirkt IL-1 systemisch, indem es Fieber hervorruft, bei mononukleären Phagozyten die Bildung von IL-1 und IL-6 stimuliert, die Bildung von Serumproteinen durch Hepatozyten erhöht und das Koagulationssystem aktiviert. Es ist ferner bekannt, dass IL-1 nicht die hämorrhagische Nekrose von Tumoren oder die Suppression der Teilung von Knochenmarkstammzellen verursacht. Dennoch ist IL-1 für Menschen in hohen Konzentrationen tödlich.

[0007] Im Hinblick auf die wichtige Funktion von IL-1 besteht im Stand der Technik ein Bedürfnis nach zusätzlichen Mitgliedern der IL-1-Ligandenfamilie. Darüber hinaus ist die Entdeckung, Identifizierung und die Funktion der neue Proteine, wie beispielsweise humanes IL-1-epsilon und seiner Rezeptoren, im Hinblick auf das anhaltende Interesse in der Proteinforschung und der Forschung über das Immunsystem für die moderne molekulare Biologie und Biochemie vorrangig. Trotz des wachsenden Wissens besteht weiterhin ein Bedürfnis im Stand der Technik nach der Identität und Funktion von Proteinen, die bei zellulären Reaktionen und Immunreaktionen involviert sind.

[0008] In einem weiteren Aspekt der Erfindung ist die Identifizierung einer Primärstruktur oder Sequenz eines unbekannten Proben-Proteins der Höhepunkt eines beschwerlichen experimentellen Verfahrens. Um eine unbekannte Proteinprobe zu identifizieren kann der Forscher auf einen Vergleich der unbekannten Proteinprobe mit bekannten Peptiden vertrauen, wobei eine Vielzahl von Methoden angewendet werden, die dem Fachmann bekannt sind. Proteine werden beispielsweise routinemäßig unter Verwendung von Methoden, wie beispielsweise Elektrophorese, Sedimentation, Chromatographie und Massenspektrometrie analysiert.

[0009] Der Vergleich einer unbekannten Proteinprobe mit Polypeptiden von bekanntem Molekulargewicht erlaubt die Bestimmung des apparenten Molekulargewichts der unbekannten Proteinprobe (T.D. Brock und M.R. Madigan, Biology of Microorganisms 76-77 (Prentice Hall, 6. Auflage 1991)). Protein-Molekulargewichtstandards sind kommerziell verfügbar, um bei der Schätzung des Molekulargewichts von unbekannten Proteinproben behilflich zu sein (New England Biolabs Inc. Catalog: 130-131, 1995; J.L. Hartley, US-Patent Nr. 5,449,758). Es kann jedoch vorkommen, dass die Molekulargewichtstandards der Größe eines unbekannten Proben-Proteins nicht genau genug entsprechen, um eine genaue Schätzung des apparenten Molekulargewichts zu ermöglichen. Die Schwierigkeit bei der Schätzung des Molekulargewichts wird in Fällen deutlich, bei denen Proteine einer Fragmentierung durch chemische oder enzymatische Mittel unterworfen werden (A.L. Lehninger, Biochemistry 106-108 (Worth Books, 2. Auflage, 1981)).

[0010] Die einzigartige Art der Zusammensetzung eines Proteins im Hinblick auf seine spezifischen Aminosäure-Bestandteile führt zu einer einzigartigen Positionierung von Spaltstellen innerhalb des Proteins. Die spezifische Fragmentierung eines Proteins durch chemische oder enzymatische Spaltung führt zu einem einzigartigen "Peptid-Fingerabdruck" (D.W. Cleveland et al., J. Biol. Chem. 252:1102-1106, 1977; M. Brown et al., J. Gen. Virol. 50:309-316, 1980).

[0011] Somit führt die Spaltung an bestimmten Stellen zu einer reproduzierbaren Fragmentierung eines gegebenen Proteins in Peptide mit präzisem Molekulargewicht. Des Weiteren besitzen diese Proteine einheitliche Ladungseigenschaften, die den isoelektrischen pH des Peptids bestimmen. Diese einzigartigen Eigenschaften können bei einer Vielzahl von elektrophoretischen Methoden und anderen Methoden ausgenutzt werden (T.D. Brock und M.T. Madigan, Biology of Microorganisms 76-77 (Prentice Hall, 6. Auflage 1991)).

[0012] Wenn ein Peptid-Fingerabdruck eines unbekannten Proteins erhalten wird, kann dieser mit einer Datenbank von bekannten Proteinen verglichen werden, um bei der Identifizierung des unbekannten Proteins behilflich zu sein (W.J. Henzel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5011-1515, 1993; B. Thiede et al., Electrophoresis 1996, 17:588-599, 1996). Eine Vielzahl von Computer-Softwareprogrammen ist für den Fachmann per Internet verfügbar, um solche Vergleiche durchzuführen, wie beispielsweise MultiIdent (Internetseite: www.expasy.ch/sprot/multiident.html), PeptideSearch (Internetseite: www.mann.embl-heidelberg.de...de-Search/FR_PeptideSearch Form.html) und ProFound (Internetseite: www.chait-sgi.rockefeller.edu/cgi-bin/prot-id-frag.html). Diese Programme erlauben dem Benutzer, das Spaltungsmittel und die Molekulargewichte der fragmentierten Peptide innerhalb einer ausgewiesenen Toleranz zu bestimmen. Die Programme vergleichen diese Molekulargewichte mit Proteindatenbanken, um bei der Aufklärung der Identität des Proben-Proteins zu helfen. Für die genaue Identifizierung sind präzise Informationen bezüglich der Anzahl der fragmentierten Peptide und des genauen Molekulargewichts dieser Peptide erforderlich. Daher sollte die Erhöhung der Genauigkeit bei der Bestimmung der Anzahl und des präzisen Molekulargewichts der fragmentierten Peptide zu einem verbesserten Erfolg bei der Identifizierung unbekannter Proteine führen.

[0013] Die Fragmentierung von Proteinen wird ferner für die Herstellung von Fragmenten bei der Analyse der Aminosäurezusammensetzung und bei der Protein-Sequenzierung verwendet (P. Matsudiara, J. Biol. Chem. 262:10035-10038, 1987; C. Eckerskorn et al., Electrophoresis 1988, 9:830-838, 1988), insbesondere bei der Herstellung von Fragmenten aus Proteinen mit "blockiertem" N-Terminus. Darüber hinaus kann die Fragmentierung von Proteinen bei der Herstellung von Peptiden für die Massenspektrometrie verwendet werden (W.J. Henzel et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 90:5011-1015, 1993; B. Thiede et al., Electrophoresis 1996, 17:588-599, 1996), bei der Immunisierung, für die Affinitätsselektion (R.A. Brown, US-Patent Nr. 5,151,412),

für die Bestimmung von Modifikationsstellen (z.B. Phosphorylierung), für die Erzeugung von aktiven biologischen Verbindungen (T.D. Brock und M.T. Madigan, Biology of Microorganisms 300-301 (Prentice-Hall, 6. Auflage 1991)) sowie für die Differenzierung von homologen Proteinen (M. Brown et al., J. Gen. Virol. 50:309-316, 1980).

[0014] Es besteht daher ein Bedürfnis im Stand der Technik nach IL-1-Polypeptiden, die für die Verwendung in Peptid-Fragmentierungsuntersuchungen, für die Verwendung in Molekulargewichtsmessungen und für die Verwendung bei der Protein-Sequenzierung unter Verwendung der Tandem-Massenspektrometrie geeignet sind.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0015] Die Erfindung hilft dabei, den im Stand der Technik bestehenden Bedürfnisse nachzukommen, indem sie isolierte humane IL-1-epsilon-Nukleinsäuren sowie Polypeptide, die von diesen Nukleinsäuren kodiert werden, bereitstellt. Die Erfindung umfasst insbesondere ein isoliertes humanes IL-1-epsilon-Nukleinsäuremolekül, einschließlich der DNA-Sequenzen von SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 und SEQ ID NO:12, sowie ein isoliertes humanes IL-1-epsilon-Nukleinsäuremolekül, das für die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 und SEQ ID NO:13 kodiert, sowie auch Nukleinsäuremoleküle, die zu diesen Sequenzen komplementär sind. Sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige RNA- und DNA-Nukleinsäuremoleküle sind von der Erfindung umfasst, sowie auch Nukleinsäuremoleküle, die an eine denaturierte, doppelsträngige DNA hybridisieren, welche SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 oder SEQ ID NO:12 betrifft. Ebenfalls umfasst sind isolierte Nukleinsäuremoleküle, die durch in vitro-Mutagenese von SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 oder SEQ ID NO:12 abgeleitet sind, die in Bezug auf SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 oder SEQ ID NO:12 degeneriert sind, die allelische Varianten der erfindungsgemäßen humanen DNA sind, und die Spezies-Homologe der erfindungsgemäßen DNA sind. Es ist ersichtlich, dass alle diese Nukleinsäuremoleküle für ein Polypeptid kodieren, das die Phosphorylierung IKBα und MAP-Kinase aktiviert, wie es in Beispiel III der vorliegenden Anmeldung beschrieben ist. Die Erfindung umfasst ferner rekombinante Vektoren, die die Expression dieser Nukleinsäuremoleküle steuern, sowie Wirtszellen, die mit diesen Vektoren transformiert oder transfiziert sind. Darüber hinaus umfasst die Erfindung Verfahren zur Verwendung der oben bezeichneten Nukleinsäure in Assays zur Identifizierung von Chromosomen, zur Kartierung humaner Gene und zur Untersuchung des Immunsystems.

[0016] Die Erfindung umfasst isolierte Polypeptide, die von diesen Nukleinsäuremolekülen kodiert werden, synthetische Polypeptide, die von diesen Nukleinsäuremolekülen kodiert werden, sowie Peptide und Fragmente dieser Polypeptide. Isolierte polyklonale oder monoklonale Antikörper, die an diese Polypeptide binden, sind ebenfalls von der Erfindung umfasst. Die Erfindung umfasst ferner Verfahren zur Herstellung von IL-1-epsilon-Polypeptiden, bei denen man eine Wirtszelle unter Bedingungen kultiviert, welche die Expression und Gewinnung des Polypeptids aus dem Kulturmedium fördern. Insbesondere von der Erfindung umfasst ist die Expression von IL-1-epsilon-Polypeptiden in Bakterien, Hefen, Pflanzen, Insekten und tierischen Zellen.

[0017] Die erfindungsgemäßen Polypeptide können im Allgemeinen verwendet werden, um zelluläre Prozesse, wie die Immunregulation, die Zellproliferation, den Zelltod und Entzündungsreaktionen zu untersuchen. Darüber hinaus können die IL-1-epsilon-Liganden-Polypeptide, verwandte IL-1-epsilon-Polypeptide und Fragmente derselben verwendet werden, um Proteine zu identifizieren, die mit IL-1-ähnlichen Liganden und IL-1-ähnlichen Rezeptoren assoziiert sind.

[0018] Darüber hinaus sind Assays, bei denen IL-1-epsilon-Liganden-Polypeptide, verwandte IL-1-epsilon-Polypeptide und Fragmente derselben zum Screening nach potentiellen Inhibitoren der Aktivität, die mit Polypeptid-Gegenstruktur-Molekülen assoziiert ist, verwendet werden, sowie Verfahren der Verwendung von IL-1-epsilon-Ligandenpolypeptiden, verwandten IL-1-epsilon-Polypeptiden und Fragmenten derselben als therapeutische Mittel zur Behandlung von Krankheiten, die durch IL-1-epsilon-Liganden-Polypeptid-Gegenstruktur-Moleküle vermittelt werden, von der Erfindung umfasst. Ferner sind Verfahren der Verwendung von IL-1-epsilon-Liganden-Polypeptiden, verwandten IL-1-epsilon-Polypeptiden und Fragmenten derselben bei der Erzeugung von Inhibitoren derselben ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

[0019] Die Erfindung umfasst ferner ein Verfahren zur Verwendung der Polypeptide und fragmentierten Peptide derselben als Molekulargewichtsmarker, welche die Schätzung des Molekulargewichts eines Proteins oder einer fragmentierten Proteinprobe ermöglicht, sowie ein Verfahren zur Sichtbarmachung der Molekulargewichtsmarker der vorliegenden Erfindung unter Verwendung von Elektrophorese. Die Erfindung umfasst ferner Verfahren zur Verwendung der erfindungsgemäßen Polypeptide und fragmentierten Peptide derselben als Marker zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes eines Probenproteins, sowie Kontrollen für die Etablie-

rung des Ausmaßes der Fragmentierung einer Protein-Probe.

[0020] Ferner umfasst von der vorliegenden Erfindung sind Kits, die bei diesen Bestimmungen helfen.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0021] Die Erfindung wird unter Bezugnahme auf die Zeichnungen vollständiger beschrieben werden, bei denen:

[0022] Fig. 1 die erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen der humanen IL-1-epsilon-DNA darstellt, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 und SEQ ID NO:12.

[0023] Fig. 2 die Aminosäuresequenz der Polypeptide darstellt, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 und SEQ ID NO:13, die von den Nukleotidsequenzen SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 bzw. SEQ ID NO:12 kodiert werden.

[0024] Fig. 3 die Aminosäurehomologie zwischen dem 3'-Exon von humanem IL-1-epsilon und von murinem IL-1-epsilon (lange Form) darstellt.

[0025] Fig. 4 die Aminosäuresequenzhomologie zwischen humanem IL-1-epsilon (Aminosäuren 51-159) und murinem IL-1-epsilon (lange Form) darstellt.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0026] Interleukin-1 (IL-1)-Rezeptoren sind Mitglieder einer großen Ig-Superfamilie von Zytokinrezeptoren, von denen zahlreiche die Reaktion von Zellen des Immunsystems vermitteln, insbesondere von Lymphozyten. In den vergangenen Jahren sind Mitglieder der Ligandenfamilie, die an diese Rezeptoren binden, mit zunehmender Geschwindigkeit entdeckt worden. Die Zunahme der Anzahl von bekannten IL-1-Liganden ist in starkem Maße durch das Aufkommen der Genklonierung und der Sequenzierungsmethoden bedingt. Die Aminosäuresequenzen, die von Nukleotidsequenzen abgeleitet werden, werden als IL-1-Liganden angesehen, sofern sie eine Homologie mit anderen bekannten IL-1-Liganden gemeinsam haben.

[0027] Das IL-1-epsilon der Maus ist ein Homolog der bekannten IL-1-Gene, IL-1α, IL-1β, IL-1δ (offenbart in PCT US/99/00514) und IL-1ra, und dem kürzlich bekannten IL-18, das zuvor gelegentlich als IL-1 gamma bekannt war. Das IL-1-epsilon der Maus wurde erstmals mittels Durchsuchen der EST Datenbank identifiziert, und es wurde ein EST entdeckt, der dem IL-1-epsilon der Maus (Zugriffsnummer AA030324) entsprach. Der gesamte offene Leserahmen für diese "lange Form" (siehe unten) ist in diesem EST enthalten.

DNA-Sequenz von Maus-IL-1-epsilon (lange Form):

```
ATGTTCAGGA TCTTAGTAGT CGTGTGTGGA TCCTGCAGAA CAATATCCTC
ACTGCAGTCC CAAGGAAAGA GCAAACAGTT CCAGGAAGGG AACATAATGG
AAATGTACAA CAAAAAGGAA CCTGTAAAAG CCTCTCTCTT CTATCACAAG
AAGAGTGGTA CAACCTCTAC ATTTGAGTCT GCAGCCTTCC CTGGTTGGTT
CATCGCTGTC TGCTCTAAAG GGAGCTGCCC ACTCATTCTG ACCCAAGAAC
TGGGGGAAAT CTTCATCACT GACTTCGAGA TGATTGTGGT ACATTAA
```

(SEQ ID NO:1)

Aminosäuresequenz von Maus IL-1-epsilon (lange Form):

```
MFRILVVVCG SCRTISSLQS QGKSKQFQEG NIMEMYNKKE PVKASLFYHK
KSGTTSTFES AAFPGWFIAV CSKGSCPLIL TQELGEIFIT DFEMIVVH*
```

(SEQ ID NO:2)

[0028] Obwohl es Homologie zu den IL-1-Genen aufweist, ist das IL-1-epsilon der Maus dahingehend ungewöhnlich, dass der ursprünglich identifizierte EST die C-terminalen 2/3 eines IL-1-ähnlichen Moleküls zu kodieren schien. Darüber hinaus wurde bei Untersuchungen der IL-1-epsilon-Expression deutlich, dass es zwei

alternativ gespleißte Formen der mRNA gibt, die für Proteine mit identischen N-Termini aber abweichenden C-Termini kodieren. Das längere dieser beiden Proteine entsprach demjenigen, das von dem ursprünglichen EST kodiert wurde. Das kürzere (manchmal als "Isoform" bezeichnet) weist ungefähr 1/3 der Länge eines typischen Moleküls der IL-1-Familie auf.

DNA-Sequenz von IL-1-epsilon der Maus (kurze Form):

ATGTTCAGGA TCTTAGTAGT CGTGTGTGGA TCCTGCAGAA CAATATCCTC
ACTGCAGTCC CAAGGAAAGA GCAAACAGTT CCAGTCACTA TTACCTTGCT
CCCATGCCAA TATCTGGACA CTCTTGAGAC GAACAGGGGG GATCCCACGT
ACATGGGAGT GCAAAGGCCG ATGA (SEQ ID NO:3)

Aminosäuresequenz von IL-1-epsilon der Maus (kurze Form):

MFRILVVVCG SCRTISSLQS QGKSKQFQSL LPCSHANIWT LLRRTGGIPR
TWECKGR*
(SEQ ID NO:4)

[0029] Diese zwei Proteine (die lange und die kurze Form), die von alternativ gespleißten Versionen des gleichen ursprünglichen RNA-Transkripts kodiert werden, können nicht-kovalent assoziieren und damit ein "vollständiges" IL-1-ähnliches Molekül bilden.

[0030] Durch Verwenden der gemischten cDNAs für Maus-IL-1-epsilon in der langen Form und Maus-IL-1-epsilon in der kurzen Form als Sonde wurde jedenfalls beim Screening einer humanen genomischen Bibliothek ein humanes IL-1-epsilon identifiziert. Die Sequenzierung eines aus der humanen genomischen Bibliothek erhaltenen Klons ergibt ein DNA-Stück, das einen offenen Leserahmen enthält, der für einen Teil eines Proteins mit hoher Homologie zum Maus-IL-1-epsilon der gleichen Region kodiert. Dieser offene Leserahmen scheint ein Exon zu sein (das am weitesten am 3'-Ende gelegene Exon der kodierenden Region). Die Spleiß-Akzeptorstelle am 5'-Ende dieses Exons ist im Vergleich zur Spleiß-Akzeptorstelle des korrespondierenden Exons in dem Maus-IL-1-epsilon in identischer Position.

[0031] Die DNA- bzw. Aminosäuresequenz dieses Exons, das dem humanen IL-1-epsilon entspricht, ist in SEQ ID NO:5 bzw. in SEQ ID NO:6 gezeigt.

Nukleotidsequenz von humanem IL-1-epsilon:

GAAAAGGATA TAATGGATTT GTACAACCAA CCCGAGCCTG TGAAGTCCTT
TCTCTTCTAC CACAGCCAGA GTGGCAGGAA CTCCACCTTC GAGTCTGTGG
CTTTCCCTGG CTGGTTCATC GCTGTCAGCT CTGAAGGAGG CTGTCCTCTC
ATCCTTACCC AAGAACTGGG GAAAGCCAAC ACTACTGACT TTGGGTTAAC
TATGCTGTTT TAA
(SEQ ID NO:5)

[0032] Ein bevorzugtes Polypeptid, das von der Nukleinsäuresequenz kodiert wird, ist nachfolgend aufgeführt:

Aminosäuresequenz von humanem IL-1-epsilon:

Translation im relevanten Leserahmen (5' 3'):

EKDIMDLYNQ PEPVKSFLFY HSQSGRNSTF ESVAFPGWFI AVSSEGGCPL
ILTQELGKAN TTDPGLTMLF *
(SEQ ID NO:6)

[0033] Die DNA-Sequenz von humanem IL-1-epsilon vollständiger Länge wurde wie in Beispiel I beschrieben isoliert. Die DNA- und Aminosäuresequenz des humanen IL-1-epsilon vollständiger Länge ist in SEQ ID NO:7 bzw. SEQ ID NO:8 gezeigt.

Nukleotidsequenz vollständiger Länge von humaner IL-1-epsilon-DNA:

ATGGAAAAAG CATTGAAAAT TGACACACCT CAGCAGGGGA GCATTCAGGA
TATCAATCAT CGGGTGTGGG TTCTTCAGGA CCAGACGCTC ATAGCAGTCC
CGAGGAAGGA CCGTATGTCT CCAGTCACTA TTGCCTTAAT CTCATGCCGA
CATGTGGAGA CCCTTGAGAA AGACAGAGGG AACCCCATCT ACCTGGGCCT
GAATGGACTC AATCTCTGCC TGATGTGTGC TAAAGTCGGG GACCAGCCCA
CACTGCAGCT GAAGGAAAAG GATATAATGG ATTTGTACAA CCAACCCGAG
CCTGTGAAGT CCTTTCTCTT CTACCACAGC CAGAGTGGCA GGAACTCCAC
CTTCGAGTCT GTGGCTTTCC CTGGCTGGTT CATCGCTGTC AGCTCTGAAG
GAGGCTGTCC TCTCATCCTT ACCCAAGAAC TGGGGAAAGC CAACACTACT
GACTTTGGGT TAACTATGCT GTTTTAA
(SEQ ID NO:7)

Aminosäuresequenz vollständiger Länge von humanem IL-1-epsilon:

Translation im relevanten Leserahmen (5' 3'):

MEKALKIDTP QQGSIQDINH RVWVLQDQTL IAVPRKDRMS PVTIALISCR
HVETLEKDRG NPIYLGLNGL NLCLMCAKVG DQPTLQLKEK DIMDLYNQPE
PVKSFLFYHS QSGRNSTFES VAFPGWFIAV SSEGGCPLIL TQELGKANTT
DFGLTMLF*
(SEQ ID NO:8)

[0034] Darüber hinaus wurde ein Einzelnukleotid-Polymorphismus (single nucleotide polymorphisms) im Gen für das humane IL-1-epsilon identifiziert. Der Polymorphismus umfasst einen Austausch von Adenosin gegen Guanosin in Nukleotid 35. Das Polypeptid, das durch das Polymorphismus-IL-1-epsilon-Gen kodiert wird, weist einen Arginin-Rest in Position 12 auf, und keinen Glutamin-Rest. Die DNA-Sequenz des humanem IL-1-epsilon-Gens, das diesen Einzelnukleotid-Polymorphismus aufweist, ist in SEQ ID NO:12 gezeigt, und die Aminosäuresequenz vollständiger Länge, die diesem Polymorphismus-Gen entspricht, ist in SEQ ID NO:13 gezeigt.

Nukleinsäuresequenz vollständiger Länge der polymorphen humanen IL-1-epsilon-DNA:

ATGGAAAAAG CATTGAAAAT TGACACACCT CAGCGGGGGA GCATTCAGGA
TATCAATCAT CGGGTGTGGG TTCTTCAGGA CCAGACGCTC ATAGCAGTCC
CGAGGAAGGA CCGTATGTCT CCAGTCACTA TTGCCTTAAT CTCATGCCGA
CATGTGGAGA CCCTTGAGAA AGACAGAGGG AACCCCATCT ACCTGGGCCT
GAATGGACTC AATCTCTGCC TGATGTGTGC TAAAGTCGGG GACCAGCCCA
CACTGCAGCT GAAGGAAAAG GATATAATGG ATTTGTACAA CCAACCCGAG
CCTGTGAAGT CCTTTCTCTT CTACCACAGC CAGAGTGGCA GGAACTCCAC
CTTCGAGTCT GTGGCTTTCC CTGGCTGGTT CATCGCTGTC AGCTCTGAAG
GAGGCTGTCC TCTCATCCTT ACCCAAGAAC TGGGGAAAGC CAACACTACT
GACTTTGGGT TAACTATGCT GTTTTAA
(SEQ ID NO:12)

Aminosäuresequenz vollständiger Länge von humanem IL-1-epsilon:

Translation in relevantem Leserahmen (5' zu 3'):

MEKALKIDTP QRGSIQDINH RVWVLQDQTL IAVPRKDRMS PVTIALISCR
HVETLEKDRG NPIYLGLNGL NLCLMCAKVG DQPTLQLKEK DIMDLYNQPE
PVKSFLFYHS QSGRNSTFES VAFPGWFIAV SSEGGCPLIL TQELGKANTT
DFGLTMLF*

(SEQ ID NO:13)

[0035] Die Entdeckung dieser für IL-1-epsilon kodierenden DNA ermöglicht die Konstruktion von Expressionsvektoren, die Nukleinsäuresequenzen umfassen, welche für die erfindungsgemäßen IL-1-epsilon-Polypeptide kodieren; von Wirtszellen, die mit diesen Expressionsvektoren transfiziert oder transformiert sind; von biologisch aktiven humanen IL-1-epsilon-Polypeptiden und Molekulargewichtsmarkern, wie beispielsweise isolierten und gereinigten Proteinen; und von Antikörpern, die mit den erfindungsgemäßen Polypeptiden immunreaktiv sind.

Nukleinsäuremoleküle

[0036] In einer bestimmten Ausführungsform betrifft die Erfindung bestimmte isolierte Nukleotidsequenzen. Eine "Nukleotidsequenz" bezieht sich auf ein Polynukleotidmolekül in Form eines getrennten Fragments oder als Bestandteil eines größeren Nukleinsäurekonstrukts, das von isolierter DNA oder RNA erhalten wurde, welche zumindest einmal in im Wesentlichen reiner Form (d.h. frei von kontaminierenden endogenen Materialien) und in einer Menge oder Konzentration isoliert wurde, welche die Identifizierung, Manipulation und Gewinnung ihrer Nukleotidsequenz-Bestandteile durch biochemische Standardverfahren ermöglicht (wie diejenigen, die in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) beschrieben sind). Solche Sequenzen werden vorzugsweise in Form eines offenen Leserahmens bereitgestellt und/oder konstruiert, der durch interne, nicht-translatierte Sequenzen oder Introns, die üblicherweise in eukaryontischen Genen vorhanden sind, unterbrochen ist. Sequenzen nicht-translatierter DNA können 5' oder 3' von einem offenen Leserahmen vorhanden sein, wo diese nicht mit der Manipulation oder Expression des kodierenden Bereichs interferieren.

[0037] Besonders bevorzugte Nukleotidsequenzen der Erfindung sind SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 und SEQ ID NO:12, wie sie oben gezeigt sind. Die Erfindung umfasst ferner isolierte Fragmente und Oligonukleotide, die von den Nukleotidsequenzen nach SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 und SEQ ID NO:12 abgeleitet sind. Nukleinsäuresequenzen, die im Schutzbereich dieser Erfindung liegen, umfassen isolierte DNA- oder RNA-Sequenzen, die unter Bedingungen moderater oder hoher Stringenz an die vorliegend offenbarten nativen Nukleotidsequenzen hybridisieren, und die die erfindungsgemäßen Polypeptide oder Fragmente derselben kodieren. Diese isolierten DNA- und RNA-Sequenzen umfassen ferner DNA- oder RNA-Moleküle vollständiger Länge, die für IL-1-epsilon-Polypeptide kodieren. Es ist ersichtlich, dass die erfindungsgemäßen Nukleinsäure oder Nukleotidsequenzen auch für ein Polypeptid kodieren, das die Phosphorylierung von IKBα und MAP-Kinase aktiviert, wie es vorliegend beschrieben wird.

[0038] Wie vorliegend verwendet umfassen Bedingungen moderater Stringenz, wie sie dem Fachmann bekannt sind, und wie sie von Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Band 1, Seiten 1.101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989), definiert wurden, die Verwendung einer Vorwasch-Lösung für Nitrocellulosefilter aus 5 × SSC, 0,5% SDS, 1,0 mM EDTA (pH 8,0), Hybridisierungsbedingungen von 50% Formamid, 6 × SSC bei 42°C (oder andere ähnliche Hybridisierungslösungen, wie beispielsweise Stark-Lösung, in 50% Formamid bei 42°C), und Waschbedingungen von etwa 60°C, 0,5 × SSC, 0,1% SDS. Bedingungen hoher Stringenz sind wie die obigen Hybridisierungsbedingungen definiert, mit einem Waschen bei 68°C, 0,2 × SSC, 0,1% SDS. Der Fachmann wird erkennen, dass die Temperatur und die Salzkonzentration der Waschlösung sofern erforderlich angepasst werden kann, gemäß Faktoren, wie beispielsweise der Länge der Sonde.

[0039] Aufgrund der bekannten Degeneration des genetischen Codes, bei dem mehr als ein Codon für dieselbe Aminosäure kodieren kann, kann eine DNA-Sequenz von der in SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 oder SEQ ID NO:12 gezeigten DNA-Sequenz abweichen und trotzdem ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 bzw. SEQ ID NO:13 aufweisen. Solche DNA-Sequenzvarianten können aus stillen Mutationen resultieren (z.B. solchen, die bei der PCR-Amplifikation auftreten), oder sie können das Produkt

der freiwilligen Mutagenese einer nativen Sequenz sein.

[0040] Die Erfindung stellt daher äquivalente isolierte DNA-Sequenzen bereit, die für die erfindungsgemäßen Polypeptide kodieren, und ausgewählt sind aus: (a) DNA, die von dem kodierenden Bereich des nativen Säugetier-Gens abgeleitet ist; (b) cDNA, die die Nukleotidsequenz von SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 oder SEQ ID NO:12 umfasst; (c) DNA, die für die Polypeptide von SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 oder SEQ ID NO:13 kodiert; (d) DNA, die in der Lage ist, mit einer DNA von (a), (b) oder (c) unter Bedingungen moderater Stringenz zu hybridisieren und die für die erfindungsgemäßen Polypeptide kodiert; und (e) DNA, die als Ergebnis des genetischen Codes gegenüber einer wie in (a), (b), (c), oder (d) definierten DNA degeneriert ist und für die erfindungsgemäßen Polypeptide kodiert. Polypeptide, die von solchen äquivalenten DNA-Sequenzen kodiert werden, sind selbstverständlich ebenfalls von der Erfindung umfasst.

[0041] Eine DNA, die zu der DNA-Sequenz von SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 oder SEQ ID NO:12 äquivalent ist, wird unter moderat stringenten Bedingungen an die doppelsträngige native DNA-Sequenz hybridisieren, die für Polypeptide kodiert, welche die Aminosäuresequenzen von SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 oder SEQ ID NO:13 umfassen. Beispiele für Polypeptide, die von solcher DNA kodiert werden, umfassen (sind jedoch nicht beschränkt auf) Polypeptidfragmente und Polypeptide, die (eine) inaktivierte N-Glykosylierungsstelle(n) umfassen, (eine) inaktivierte Protease-Prozessierungsstelle(n) oder (einen) konservative(n) Aminosäureaustausch(e), wie nachfolgend beschrieben wird. Polypeptide, die von DNA kodiert werden, welche von anderen Säugetier-Spezies erhalten wird, sind ebenfalls umfasst, wobei die DNA mit der komplementären DNA von SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 oder SEQ ID NO:12 hybridisieren wird.

Expression

[0042] Die Nukleinsäuresequenz, die für die erfindungsgemäßen Polypeptide kodiert, kann unter Verwendung hinreichend bekannter Verfahren in einen rekombinanten Expressionsvektor inseriert werden. Die Expressionsvektoren umfassen eine erfindungsgemäße DNA-Sequenz, die in funktionsfähiger Weise mit geeigneten transkriptionalen oder translationalen regulatorischen Nukleotidsequenzen verknüpft ist, wie beispielsweise mit denjenigen, die von einem Säugetier-, Mikroben-, Virus- oder Insekten-Gen abgeleitet sind. Beispiele für regulatorische Sequenzen umfassen transkriptionale Promotoren, Operatoren und Enhancer, eine mRNA-ribosomale Bindungsstelle sowie geeignete Sequenzen, die die Initiation und Termination von Transkription und Translation kontrollieren. Nukleotidsequenzen sind "in funktionsfähiger Weise verknüpft" wenn die regulatorische Sequenz funktionell mit der erfindungsgemäßen DNA-Sequenz in Verbindung steht. Eine Promotor-Nukleotidsequenz ist daher in funktionsfähiger Weise mit einer DNA-Sequenz verknüpft, wenn die Promotor-Nukleotidsequenz die Transkription der erfindungsgemäßen DNA-Sequenz kontrolliert. Die Fähigkeit, sich in den gewünschten Wirtszellen zu replizieren, wird üblicherweise durch einen Replikationsursprung (origin of replication) gewährleistet, und es kann ein Selektions-Gen, durch das Transformanten identifiziert werden können, zusätzlich in den Expressionsvektor eingebracht werden.

[0043] Darüber hinaus können Sequenzen, die für geeignete Signalpeptide kodieren, die nicht natürlicherweise mit den erfindungsgemäßen Polypeptiden assoziiert sind, in die Expressionsvektoren eingebracht werden. Beispielsweise kann eine DNA-Sequenz für ein Signalpeptid (sekretorischer Leader) in-frame mit der erfindungsgemäßen Nukleotidsequenz fusioniert werden, so dass das Polypeptid zunächst als Fusionsprotein translatiert wird, das ein Signalpeptid umfasst. Ein Signalpeptid, das in den gewünschten Wirtszellen funktionstüchtig ist, verstärkt die extrazelluläre Sekretion des Polypeptids. Das Signalpeptid kann bei Sekretion des Polypeptids aus der Zelle von dem Polypeptid abgespalten werden.

[0044] Geeignete Wirtszellen zur Expression von erfindungsgemäßen Polypeptiden umfassen Prokaryonten, Hefe oder höhere eukaryontische Zellen. Geeignete Klonierungsvektoren und Expressionsvektoren zur Verwendung in zellulären Wirten von Bakterien, Pilzen, Hefen und Säugetieren werden beispielsweise in Pouwels et al. Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York (1985), beschrieben. Zellfreie Translationssysteme können ebenfalls eingesetzt werden, um die erfindungsgemäßen Polypeptide unter Verwendung von RNAs, die von den vorliegend offenbarten DNA-Konstrukten abgeleitet sind, herzustellen.

Prokaryontische Systeme

[0045] Prokaryonten umfassen Gram-negative und Gram-positive Organismen. Geeignete prokaryontische Wirtszellen für die Transformation umfassen beispielsweise Escherichia coli, Bacillus subtilis, Salmonella typhimurium und verschiedene andere Spezies innerhalb der Gattung Bacillus, Pseudomonas, Streptomyces und Staphylococcus. In einer prokaryontischen Wirtszelle, wie beispielsweise Escherichia coli, kann ein erfin-

dungsgemäßes Polypeptid einen N-terminalen Methionin-Rest umfassen, um die Expression des rekombinanten Polypeptids in der prokaryontischen Wirtszelle zu ermöglichen. Das N-terminale Met kann von dem exprimierten rekombinanten Polypeptid abgespalten werden.

[0046] Expressionsvektoren zur Verwendung in prokaryontischen Wirtszellen umfassen im Allgemeinen ein oder mehrere phänotypisch selektierbare Marker-Gene. Ein phänotypisch selektierbares Marker-Gen ist beispielsweise ein Gen, das für ein Protein kodiert, welches Antibiotikaresistenz verleiht oder ein autotrophes Erfordernis erfüllt. Beispiele für geeignete Expressionsvektoren für prokaryontische Wirtszellen umfassen diejenigen, die von kommerziell verfügbaren Plasmiden wie dem Klonierungsvektor pBR322 (ATCC 37017) abgeleitet sind. pBR322 umfasst Gene für eine Ampicillin- und eine Tetracyclin-Resistenz und stellt somit ein einfaches Mittel für die Identifizierung transformierter Zellen bereit. Um einen Expressionsvektor unter Verwendung von pBR322 zu konstruieren werden ein geeigneter Promotor und eine geeignete erfindungsgemäße DNA-Sequenz in den Vektor pBR322 inseriert. Andere kommerziell verfügbare Vektoren umfassen beispielsweise pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) und pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA). Andere kommerziell verfügbare Vektoren umfassen diejenigen, die speziell für die Expression von Proteinen gestaltet sind; diese würden umfassen: die pMAL-p2- und pMAL-c2-Vektoren, die zur Expression von Proteinen verwendet werden, welche an das Maltose-Bindungsprotein fusioniert sind (New England Biolabs, Beverly, MA, USA).

[0047] Die Promotorsequenzen, die üblicherweise für rekombinante prokaryontische Wirtszellexpressionsvektoren verwendet werden, umfassen β-Lactamase (Penicillinase), das Lactose-Promotorsystem (Chang et al., Nature 275:615, 1978; und Goeddel et al., Nature 281:544, 1979), das Trypthophan (trp)-Promotorsystem (Goeddel et al., Nucl. Acids. Res. 8:4057, 1980 und EP-A-36776), und den tac-Promotor (Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Seite 412, 1982). Ein besonders nützliches prokaryontisches Wirtszellexpressionssystem umfasst einen P_L-Promotor aus dem Phagen λ und eine thermolabile Repressorsequenz cI857ts. Plasmidvektoren, die von der American Type Culture Collection verfügbar sind und Derivate des λ-P_L-Promotors einschließen, umfassen das Plasmid pHUB2 (enthalten im E. coli-Stamm JMB9 (ATCC 37092)) und pPLc28 (enthalten in E. coli RR1 (ATCC 53082)).

[0048] Die erfindungsgemäße DNA kann in-frame in die multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site; MCS) eines gewöhnlichen bakteriellen Expressionsvektors kloniert werden. Der Vektor enthält idealerweise einen induzierbaren Promotor stromaufwärts der Klonierungsstelle, so dass die Zugabe eines Inducers zur Produktion des rekombinanten Proteins in hohen Mengen zu einem vom Forscher gewählten Zeitpunkt erfolgt. Bei einigen Proteinen können die Expressionsmengen durch Einbringen eines Codons, das für einen Fusionspartner (z.B. ein Hexahistidin) kodiert, zwischen dem Promotor und dem jeweiligen Gen verstärkt werden.

[0049] Für die Expression eines rekombinanten Proteins werden die bakteriellen Zellen in Wachstumsmedium vermehrt, bis sie eine vorbestimmte optische Dichte erreichen. Die Expression des rekombinanten Proteins wird anschließend induziert, z.B. durch Zugabe von IPTG (Isopropyl-b-D-thiogalactopyranosid), das die Expression der Proteine von Plasmiden, welche einen lac Operator/Promotor umfassen, aktiviert. Nach Induktion (üblicherweise für 1 bis 4 Stunden) werden die Zellen durch Pelletieren in einer Zentrifuge, z.B. bei 5000 × G für 20 Minuten bei 4°C, abgeerntet.

[0050] Zur Gewinnung des exprimierten Proteins können die pelletierten Zellen in 10 Volumen 50 mM Tris-HCl (pH 8)/1 M NaCl resuspendiert werden und anschließend zwei- oder dreimal durch eine French-Presse geleitet werden. Die am stärksten exprimierten rekombinanten Proteine bilden unlösliche Aggregate, die als Einschlusskörper (inclusion bodies) bekannt sind. Die Einschlusskörper können durch Reinigung von den löslichen Proteinen entfernt werden, indem man sie in einer Zentrifuge bei 5000 × G für 20 Minuten, 4°C pelletiert. Das Pellet mit den Einschlusskörpern wird mit 50 mM Tris-HCl (pH 8)/1% Triton X-100 gewaschen und anschließend in 50 mM Tris-HCl (pH 8)/8 M Harnstoff/0,1 M DTT gelöst. Material, das nicht gelöst werden kann, wird durch Zentrifugation (10 000 × G für 20 Minuten, 20°C) entfernt. Das Protein von Interesse wird in den meisten Fällen das am stärksten vertretene Protein in dem resultierenden klaren Überstand sein. Das Protein kann durch Dialyse gegen 50 mM Tris-HCl (pH 8)/5 mM $CaCl_2$/5 mM $Zn(OAc)_2$/1 mM GSSG/0,1 mM GSH in seine aktive Konformation "zurückgefaltet" werden. Nach dem Zurückfalten kann die Aufreinigung mittels einer Vielzahl von chromatischen Verfahren, wie beispielsweise Ionenaustausch oder Gelfiltration durchgeführt werden. In einigen Protokollen kann die anfängliche Aufreinigung vor dem Zurückfalten durchgeführt werden. Zum Beispiel werden Fusionsproteine, die mit einem Hexahistitin-Anhang (tag) versehen sind, partiell auf immobilisiertem Nickel auf gereinigt.

[0051] Während die obigen Aufreinigungs- und Zurückfaltungs-Verfahren von der Annahme ausgehen, dass

das Protein am besten aus den Einschlusskörpern gewonnen wird, ist es für den Fachmann verständlich, dass zahlreiche rekombinante Proteine am besten aus der löslichen Fraktion der Zelllysate gereinigt werden. In diesen Fällen ist das Zurückfalten oftmals nicht erforderlich, und die Aufreinigung kann direkt mittels chromatographischer Standardverfahren durchgeführt werden.

Hefesysteme

[0052] Die erfindungsgemäßen Polypeptide können alternativ dazu in Hefe-Wirtszellen exprimiert werden, vorzugsweise in solchen der Gattung Saccharomyces (z.B. S. cerevisiae). Andere Hefe-Gattungen, wie beispielsweise Pichia, K. lactis oder Kluyveromyces, können ebenfalls verwendet werden. Hefe-Vektoren werden oftmals eine Replikationsursprungssequenz aus einem 2µ-Hefeplasmid, eine autonom replizierende Sequenz (ARS), eine Promotorregion, Sequenzen für die Polyadenylierung, Sequenzen für die Termination der Transkription sowie ein selektives Marker-Gen umfassen. Geeignete Promotorsequenzen für Hefe-Vektoren umfassen unter anderem die Promotoren für Metallothionein, 3-Phosphoglyceratkinase (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255:2073, 1980), oder für andere glykolytische Enzyme (Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg. 7:149, 1968; und Holland et al., Biochem, 17:4900, 1978), wie beispielsweise Enolase, Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase, Hexokinase, Pyruvatdecarboxylate, Phosphofruktokinase, Glucose-6-Phosphatisomerase, 3-Phosphoglyceratmutase, Pyruvatkinase, Triosephosphatisomerase, Phosphoglucose-Isomerase und Glucokinase. Andere geeignete Vektoren und Promotoren zur Verwendung bei der Hefe-Expression sind darüber hinaus in Hitzeman, EP-A-73,657 oder in Fleer et al., Gene 107:285-195 (1991); und in van den Berg et al., Bio/Technology, 8:135-139 (1990), beschrieben. Eine weitere Alternative ist der Glucose-reprimierbare ADH2-Promotor, der von Russel et al. (J. Biol. Chem. 258:2674, 1982) und Beier et al. (Nature 300:724, 1982) beschrieben worden ist. Shuttle-Vektoren, die sowohl in Hefe als auch in E. coli replizierbar sind, können konstruiert werden, indem man DNA-Sequenzen aus pBR322 für die Selektion und Replikation in E. coli (Amp^r-Gen und Replikationsursprung) in die oben beschriebenen Hefe-Vektoren einbringt.

[0053] Die Leader-Sequenz des α-Faktors aus der Hefe kann verwendet werden, um die Sekretion eines erfindungsgemäßen Polypeptids zu steuern. Die Leader-Sequenz des α-Faktors wird oftmals zwischen der Promotorsequenz und der Sequenz des Struktur-Gens inseriert. Siehe beispielsweise Kurjan et al., Cell 30:933, 1982; Bitter et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 81:5330, 1984; US-Patent 4,546,082; und EP 324,274. Andere Leader-Sequenzen, die geeignet sind, für die Sekretion von rekombinanten Polypeptiden aus Hefe-Wirten zu sorgen, sind dem Fachmann bekannt. Eine Leader-Sequenz kann nahe ihres 3'-Endes modifiziert werden, so dass sie ein oder mehrere Restriktionsstellen enthält. Dies wird die Fusion der Leader-Sequenz mit dem Strukturgen ermöglichen.

[0054] Protokolle zur Transformation der Hefe sind dem Fachmann bekannt. Ein solches Protokoll wird von Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 75:1929, 1978, beschrieben. Das Protokoll von Hinnen et al. selektiert Trp^+-Transformanten in einem selektiven Medium, wobei das selektive Medium aus 0,67% Hefestickstoff-Base, 0,5% Casaminosäuren, 2% Glucose, 10 µg/ml Adenin und 20 µg/ml Uracil besteht.

[0055] Hefe-Wirtszellen, die mit Vektoren transformiert sind, welche die ADH2-Promotorsequenz enthalten, können in einem "reichhaltigen" Medium angezüchtet werden, um die Expression zu induzieren. Ein Beispiel für ein reichhaltiges Medium ist ein Medium, das aus 1% Hefeextrakt, 2% Pepton und 1% Glucose besteht, und mit 80 µg/ml Adenin und 80 µg/ml Uracil supplementiert ist. Wenn die Glucose im Medium erschöpft ist, kommt es zur Derepression des ADH2-Promotors.

Säugetier- und Insektensysteme

[0056] Alternativ dazu können auch Säugetier- oder Insektenwirtszellsysteme verwendet werden, um die erfindungsgemäßen, rekombinanten Polypeptide zu exprimieren. Baculovirussysteme zur Herstellung heterologer Proteine in Insektenzellen sind von Luckow und Sommers, Bio/Technology 6:47 (1988) zusammengefasst worden. Etablierte Zelllinien, die von Säugetieren abstammen, können ebenfalls verwendet werden. Beispiele für geeignete Säugetierwirtszelllinien umfassen die COS-7-Zelllinie von Affen-Nierenzellen (ATCC CRL 1651) (Glutzman et al., Cell 23:175, 1981), L-Zellen, C127-Zellen, 3T3-Zellen (ATCC CCL 163), Zellen des Eierstocks von Chinesischen Hamstern (Chinese hamster ovary, CHO), HeLa-Zellen und BHK (ATCC CRL 10)-Zelllinien, sowie die CV-1/EBNA-1-Zelllinie (ATCC CRL 10478), die von der African Green Monkey Nierenzelllinie CVI (ATCC CCL 70) erhalten wurde, wie es von McMahan et al. (EMBO J. 10:2821, 1991) beschrieben wurde.

[0057] Etablierte Verfahren zur Einbringung von DNA in Säugetierzellen sind beschrieben worden (Kaufman, R.J., Large Scale Mammalian Cell Culture, 1990, Seiten 15-69). Zusätzliche Protokolle, die kommerziell ver-

fügbare Reagenzien, wie beispielsweise Lipofectamin (Gibco/BRL) oder Lipofectamin-Plus verwenden, können angewendet werden, um Zellen zu transfizieren (Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 84:7413-7417, 1987). Darüber hinaus kann eine Elektroporation verwendet werden, um Säugetierzellen unter Verwendung herkömmlicher Verfahren, wie beispielsweise derjenigen aus Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Band 1-2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, zu transfizieren. Die Selektion stabiler Transformanten kann unter Verwendung im Stand der Technik bekannter Verfahren, wie beispielsweise Resistenz gegen zytotoxische Wirkstoffe, durchgeführt werden. Kaufman et al., Meth. in Enzymology 185:487-511, 1990, beschreiben mehrere Selektionssysteme, wie beispielsweise die Resistenz gegen Dihydrofolatreduktase (DHFR). Ein geeigneter Wirtsstamm für die DHFR-Selektion kann der CHO-Stamm DX-B11 sein, der bezüglich DHFR defizient ist (Urlaub und Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci USA 77:4216-4220, 1980). Ein Plasmid, das die DHFR-cDNA exprimiert, kann in den Stamm DX-B11 eingebracht werden, und nur Zellen, die das Plasmid enthalten, können in geeigneten selektiven Medien wachsen. Andere Beispiele für selektierbare Marker, die in einen Expressionsvektor eingebracht werden können, umfassen cDNAs, die eine Resistenz gegen Antibiotika, wie beispielsweise G418 und Hygromycin B, verleihen. Zellen, die diesen Vektor umfassen, können auf Basis der Resistenz gegen diese Verbindungen selektiert werden.

[0058] Transkriptionale und translationale Kontrollsequenzen für Säugetierwirtszell-Expressionsvektoren können aus viralen Genomen ausgeschnitten werden. Üblicherweise verwendete Promotorsequenzen und Enhancer-Sequenzen sind vom Polyomavirus, Adenovirus 2, Simianvirus 40 (SV40) und dem humanen Zytomegalovirus abgeleitet. DNA-Sequenzen, die vom SV40-Virus-Genom abgeleitet sind, beispielsweise der SV40-Ursprung (origin), der frühe und späte Promotor, der Enhancer, Spleiß- und Polyadenylierungsstellen, können dazu verwendet werden, andere genetische Elemente zur Expression einer Sequenz eines Struktur-Gens in einer Säugetier-Wirtszelle bereitzustellen. Der virale frühe Promotor und der virale späte Promotor sind besonders nützlich, weil sie problemlos als ein Fragment vom viralen Genom erhältlich sind, das auch den viralen Replikationsursprung umfasst (Fiers et al., Nature 273:113, 1978; Kaufman, Meth. in Enzymology, 1990). Kleinere oder größere SV40-Fragmente können ebenfalls verwendet werden, vorausgesetzt, dass die im SV40-Virus-Replikationsursprung lokalisierte Sequenz von etwa 250 bp, die sich von der HindIII-Schnittstelle zur BglI-Schnittstelle hin erstreckt, eingeschlossen ist.

[0059] Zusätzliche Kontrollsequenzen, von denen gezeigt wurde, dass sie die Expression heterologer Gene von Säugetier-Expressionsvektoren verbessern, umfassen solche Elemente, wie das die Expression steigernde Sequenzelement (expression augmentating sequence element; EASE), das von CHO-Zellen erhalten wird (Morris et al., Animal Cell Technology, 1997, Seiten 529-534), sowie den Tripartit-Leader (TPL) und VA-Gen-RNAs von Adenovirus 2 (Gingeras et al., J. Biol. Chem. 257:13475-13491, 1982). Die Sequenzen der internen Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) viralen Ursprungs erlauben die effiziente Translation von dicistronischen RNAs (Oh und Sarnow, Current Opinion in Genetics and Development 3:295-300, 1993; Ramesh et al., Nucleic Acids Research 24:2697-2700, 1996). Es ist gezeigt worden, dass die Expression einer heterologen cDNA, die Teil einer dicistronischen mRNA ist und der ein Gen für einen selektierbaren Marker (z.B. DHFR) folgt, die Transfizierbarkeit des Wirtes und die Expression der heterologen cDNA verbessert (Kaufman, Meth. in Enzymology, 1990). Beispielhafte Expressionsvektoren, die dicistronische mRNAs verwenden, sind pTR-DC/GFP, der von Mosser et al., Biotechniques 22:150-161, 1997, beschrieben wurde, und p2A5I, der von Morris et al., Animal Cell Technology, 1997, Seiten 529-534, beschrieben wurde.

[0060] Ein nützlicher Vektor für die Expression in hohem Ausmaß, PCA-VNOT, wurde von Mosley et al., Cell 59:335-348, 1989, beschrieben. Andere Expressionsvektoren zur Verwendung in Säugetier-Wirtszellen können konstruiert werden, wie es von Okayama und Berg (Mol. Cell. Biol. 3:280, 1983) beschrieben wurde. Ein nützliches System für die stabile Expression von Säugetier-cDNAs in hohem Ausmaß kann in murinen C127-Brustepithelzellen konstruiert werden, wie es von Cosman et al. (Mol. Immunol. 23:935, 1986) beschrieben wurde. Ein nützlicher Vektor für die Expression in hohem Ausmaß, PMLSV N1/M4, der von Cosman et al., Nature 312:768, 1984) beschrieben wurde, ist als ATCC 39890 hinterlegt worden. Zusätzliche nützliche Säugetier-Expressionsvektoren sind in EP-A-0 367 566 und in der am 16. März 1991 eingereichten US-Patentanmeldung mit der Seriennummer 07/710,415 beschrieben, die durch Verweis eingeschlossen sind. Die Vektoren können von Retroviren abgeleitet sein.

[0061] Anstelle der nativen Signalsequenz kann eine heterologe Signalsequenz zugefügt werden, wie beispielsweise die Signalsequenz für IL-7, die in US-Patent 4,965,195 beschrieben ist; die Signalsequenz für den IL-2-Rezeptor, die in Cosman et al., Nature 312:768 (1984) beschrieben ist; das IL-4-Signalpeptid, das in EP 367,566 beschrieben ist; das Signalpeptid des IL-1-Rezeptors vom Typ I, das in US-Patent 4,968,607 beschrieben ist; und das Signalpeptid des IL-1-Rezeptors vom Typ II, das in EP 460,846 beschrieben ist.

[0062] Ein weiterer nützlicher Expressionsvektor, pFLAG, kann verwendet werden. Die FLAG-Technologie ist auf die Fusion eines niedermolekulargewichtigen (1 kD), hydrophilen FLAG-Markerpeptids an den N-Terminus eines rekombinanten Proteins ausgerichtet, das von dem pFLAG-1™-Expressionsvektor (1) (erhalten von IBI Kodak) exprimiert wird.

Polypeptide der Erfindung

[0063] Wie oben angemerkt wird, umfasst die vorliegende Erfindung auch isolierte und gereinigte Polypeptide. Wie vorliegend verwendet bezeichnen erfindungsgemäße "Polypeptide" eine Gattung von Polypeptiden, die ferner Proteine mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 oder SEQ ID NO:13 umfasst, sowie auch solche Proteine, die einen hohen Grad an Ähnlichkeit (mindestens 90% Homologie) mit solchen Aminosäurensequenzen aufweisen, wobei diese Proteine biologisch aktiv sind. Darüber hinaus betreffen die erfindungsgemäßen Polypeptide die Genprodukte der Nukleotide nach SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 und SEQ ID NO:12.

Isolierung und Aufreinigung

[0064] Der Begriff "isoliert und gereinigt" bedeutet wie vorliegend verwendet, dass die Polypeptide oder Fragmente der vorliegenden Erfindung im Wesentlichen frei von einer Assoziation mit anderen Proteinen oder Polypeptiden sind, beispielsweise als Aufreinigungsprodukt von einer rekombinanten Wirtszellkultur oder als gereinigtes Produkt von einer nicht rekombinanten Quelle. Der Begriff "im Wesentlichen gereinigt" betrifft wie vorliegend verwendet eine Mischung, die erfindungsgemäße Polypeptide und Fragmente enthält und im Wesentlichen frei von einer Assoziation mit anderen Proteinen oder Polypeptiden ist, wobei jedoch die Gegenwart von bekannten Proteinen, welche unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers entfernt werden können, erlaubt ist, und wobei im Wesentlichen gereinigte Polypeptide oder Fragmente derselben als Molekulargewichtsmarker verwendet werden können. Der Begriff "gereinigt" bezieht sich entweder auf die "isolierte und gereinigte" Form der erfindungsgemäßen Polypeptide oder auf die "im Wesentlichen gereinigte" Form der erfindungsgemäßen Polypeptide, wie sie beide vorliegend beschrieben werden.

[0065] Ein isoliertes und gereinigtes erfindungsgemäßes Polypeptid kann wie oben beschrieben durch rekombinante Expressionssysteme hergestellt werden oder aus natürlich vorkommenden Zellen gereinigt werden.

[0066] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform kann die Expression von rekombinanten IL-1-epsilon-Polypeptiden erreicht werden, indem man Fusionen aus Sequenzen verwendet, die für IL-1-epsilon-Polypeptide kodieren, und Sequenzen, die für andere Polypeptide kodieren, welche bei der Reinigung der erfindungsgemäßen Polypeptide helfen sollen. Ein Beispiel für eine solche Fusion ist eine Fusion von Sequenzen, die für ein IL-1-epsilon-Polypeptid kodieren, mit Sequenzen, die für das Produkt des malE-Gens aus dem pMAL-c2-Vektor von New England Biolabs Inc. kodieren. Eine solche Fusion erlaubt die Affinitätsreinigung von Fusionsprotein sowie die Trennung des Maltosebindeproteinteils des Fusionsproteins von dem erfindungsgemäßen Polypeptid nach der Reinigung.

[0067] Die Insertion von DNA, die für das IL-1-epsilon-Polypeptid kodiert, in den pMAL-c2-Vektor kann auf eine Vielzahl von Wegen unter Verwendung bekannter molekularbiologischer Methoden erreicht werden. Die bevorzugte Konstruktion der Insertion enthält ein Terminationscodon, das an das carboxyterminale Codon des erfindungsgemäßen Polypeptids grenzt. Darüber hinaus führt die bevorzugte Konstruktion der Insertion zur Fusion des Aminoterminus des erfindungsgemäßen Polypeptids unmittelbar an den Carboxyterminus der Faktor Xa-Spaltstelle im pMAL-c2-Vektor. Unter Verwendung der erfindungsgemäßen DNA als Matrize und zwei Oligonukleotidprimern kann mittels PCR ein DNA-Fragment erzeugt werden. Die Verwendung der Oligonukleotidprimer erzeugt ein DNA-Fragment mit glatten Enden, das mittels herkömmlicher Verfahren isoliert werden kann. Dieses PCR-Produkt kann unter Verwendung herkömmlicher Verfahren mit pMAL-p2 (mit der Restriktionsendonuklease XmnI geschnitten) ligiert werden. Positive Klone können durch herkömmliche Verfahren identifiziert werden. Die Induktion der Expression und die Reinigung des Fusionsproteins können gemäß den Anweisungen des Herstellers und wie oben beschrieben durchgeführt werden. Diese Konstruktion ermöglicht eine präzise Trennung des erfindungsgemäßen Polypeptids von dem fusionierten Maltosebindeprotein unter Verwendung einer einfachen Protease-Behandlung gemäß den Anweisungen des Herstellers. Auf diese Weise kann gereinigtes IL-1-epsilon-Polypeptid erhalten werden. Darüber hinaus kann ein solch konstruierter Vektor unter Verwendung bekannter molekularbiologischer Verfahren problemlos modifiziert werden, um zusätzliche Fusionsproteine zu erzeugen. Es ist natürlich verständlich, dass zahlreiche verschiedene Vektoren und Methoden wie oben dargestellt für die Expression und Reinigung des erfindungsgemäßen Polypeptids verwendet

werden können, und dass diese Ausführungsform den Umfang der Erfindung in keiner Weise beschränkt.

[0068] Ein rekombinantes Protein, das in bakterieller Kultur hergestellt worden ist, wird üblicherweise dadurch isoliert, dass man zunächst die Wirtszellen durch ein beliebiges, angemessenes Verfahren aufschließt (einschließlich Zyklen aus Einfrieren und Auftauen, Ultraschall, mechanischer Aufschluss oder Verwendung von Zell-lysierenden Mitteln), zentrifugiert, aus Zellpellets extrahiert, sofern es sich um ein unlösliches Polypeptid handelt, oder aus der Flüssigkeit des Überstands, sofern es sich um ein lösliches Polypeptid handelt, gefolgt von einem oder mehreren Schritten des Aufkonzentrierens, des Aussalzens, des Ionenaustauschs, der Affinitätsaufreinigung oder der Größenausschlußchromatographie. Wie dem Fachmann bekannt ist, werden Verfahren zur Reinigung eines rekombinanten Proteins von Faktoren wie beispielsweise der Art der verwendeten Wirtszellen abhängen, oder davon, ob das rekombinante Protein ins Kulturmedium sekretiert wird oder nicht. Wenn beispielsweise Expressionssysteme verwendet werden, die das rekombinante Protein sekretieren, kann das Kulturmedium zunächst unter Verwendung eines kommerziell verfügbaren Proteinkonzentrationsfilters aufkonzentriert werden, z.B. mit Hilfe einer Pellicon-Ultrafiltrationseinheit von Amicon oder Millipore. Nach dem Konzentrationsschritt kann das Konzentrat auf eine Aufreinigungsmatrix, wie beispielsweise auf ein Gelfiltrationsmedium aufgebracht werden. Alternativ dazu kann eine Anionenaustauschsäule verwendet werden, beispielsweise eine Matrix oder ein Substrat mit angehängten Diethylaminoethyl (DEAE)-Gruppen. Die Matrizes können Acrylamid, Agarose, Dextran, Cellulose oder andere herkömmlicherweise bei der Proteinaufreinigung verwendete Arten von Matrizes sein. Alternativ dazu kann ein Kationenaustauschschritt durchgeführt werden. Geeignete Kationenaustauscher umfassen verschiedene unlösliche Matrizes, die Sulfopropyl- oder Carboxymethylgruppen umfassen. Sulfopropylgruppen sind bevorzugt. Schließlich können eine oder mehrere Reverse-Phase-Hochleistungs-Flüssigchromatographie (RP-HPLC)-Schritte unter Verwendung hydrophober RP-HPLC-Medien (z.B. Silikagel mit angehängtem Methyl oder mit anderen aliphatischen Gruppen) verwendet werden, um die Polypeptide weiter aufzureinigen. Einige oder alle der oben aufgeführten Reinigungsschritte sind in verschiedenen Kombinationen hinreichend bekannt und können eingesetzt werden, um ein isoliertes und gereinigtes rekombinantes Protein bereitzustellen.

[0069] Es ist darüber hinaus möglich, eine Affinitätssäule zu verwenden, die ein Polypeptid-bindendes Protein der vorliegenden Erfindung umfasst, z.B. einen monoklonalen Antikörper, der gegen die erfindungsgemäßen Polypeptide erzeugt worden ist, um die exprimierten Polypeptide mittels Affinität zu reinigen. Diese Polypeptide können unter Verwendung herkömmlicher Verfahren von der Affinitätssäule entfernt werden, z.B. in einem Elutionspuffer mit hohem Salzgehalt und anschließender Dialyse in einen Puffer mit geringerem Salzgehalt für die Verwendung, oder durch Wechsel des pH-Werts oder anderer Komponenten in Abhängigkeit von der verwendeten Affinitätsmatrix.

[0070] In diesem Aspekt der Erfindung können Polypeptid-bindende Proteine, wie beispielsweise die erfindungsgemäßen anti-Polypeptid-Antikörper oder andere Proteine, die mit den erfindungsgemäßen Polypeptid interagieren, an einen Festphasenträger gebunden werden, wie beispielsweise an eine Säulenchromatographiematrix oder an ein ähnliches Substrat, das zur Identifizierung, Trennung oder Reinigung von Zellen geeignet ist, die das erfindungsgemäße Polypeptid an ihrer Oberfläche exprimieren. Das Anheften von Polypeptid-bindenden Proteinen der vorliegenden Erfindung an eine Festphasen-Kontaktoberfläche kann durch beliebige Mittel erreicht werden; es können z.B. magnetische Microspheres mit diesen Polypeptid-bindenden Proteinen beschichtet und im Inkubationsbehälter durch ein magnetisches Feld gehalten werden. Es werden Suspensionen von Zellmischungen mit der Festphase in Kontakt gebracht, die solche Polypeptid-bindenden Proteine auf ihrer Oberfläche umfasst. Zellen mit erfindungsgemäßen Polypeptiden auf ihrer Oberfläche binden an die fixierten Polypeptid-bindenden Proteine und ungebundene Zellen werden anschließend weggewaschen. Dieses Affinitäts-Bindungsverfahren ist zur Reinigung, zum Screenen oder zum Abtrennen solcher Polypeptid-exprimierenden Zellen aus einer Lösung geeignet. Verfahren zum Ablösen positiv selektierter Zellen von der Festphase sind im Stand der Technik bekannt und umfassen beispielsweise die Verwendung von Enzymen. Solche Enzyme sind vorzugsweise nicht toxisch und nicht schädlich für die Zellen und sind vorzugsweise auf die Spaltung des Bindungspartners auf der Zell-Oberfläche gerichtet.

[0071] Alternativ dazu können Mischungen von Zellen, von denen man annimmt, dass sie die erfindungsgemäßen Polypeptid-exprimierenden Zellen umfassen, zunächst mit einem biotinylierten Polypeptid-bindenden Protein der vorliegenden Erfindung inkubiert werden. Die Inkubationszeiträume betragen üblicherweise mindestens eine Stunde und stellen sicher, dass eine ausreichende Bindung der erfindungsgemäßen Polypeptide erfolgt. Die resultierenden Mischungen werden anschließend über eine Säule geleitet, die mit Avidin-beschichteten Beads gepackt ist, wobei die hohe Affinität von Biotin für Avidin die Bindung der Polypeptid-bindenden Zellen an die Beads bereitstellt. Die Verwendung von Avidin-beschichteten Beads ist im Stand der Technik bekannt. Siehe Berenson et al., J. Cell. Biochem., 10D:239 (1986). Das Waschen von ungebundenem Material

und die Freisetzung der gebundenen Zellen wird unter Verwendung herkömmlicher Verfahren durchgeführt.

[0072] In den oben beschriebenen Verfahren sind geeignete Polypeptid-bindende Proteine anti-Polypeptid-Antikörper und andere Proteine, die in der Lage sind, mit hoher Affinität die erfindungsgemäßen Polypeptide zu binden. Ein bevorzugtes Polypeptid-bindendes Protein ist ein monoklonaler anti-Polypeptid-Antikörper.

[0073] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform werden transformierte Hefe-Wirtszellen verwendet, um die erfindungsgemäßen Polypeptide als sekretiertes Polypeptid zu exprimieren, um die Aufreinigung zu erleichtern. Sekretiertes rekombinantes Polypeptid aus einer Fermentation mit Hefe-Wirtszellen kann durch Verfahren gereinigt werden, die zu denjenigen analog sind, die von Urdal et al. (J. Chromatog. 296:171, 1986) beschrieben worden sind (und die die Verwendung von zwei nacheinander erfolgenden Reverse-Phase-HPLC-Schritten für die Aufreinigung betreffen).

Varianten

[0074] Die Erfindung umfasst ferner Varianten der erfindungsgemäßen Polypeptide. Eine Polypeptid-"Variante" betrifft wie vorliegend verwendet ein Polypeptid, das im Wesentlichen homolog zu dem nativen erfindungsgemäßen Polypeptiden ist, das jedoch eine Aminosäuresequenz aufweist, welche von denjenigen der nativen Polypeptide (humane, murine oder von einer anderen Säugetier-Spezies) der Erfindung aufgrund von einer oder mehreren Deletionen, Insertionen oder Substitutionen abweicht. Die Aminosäuresequenz der Variante ist mindestens 95% identisch, mindestens 98% identisch, mindestens 99% identisch oder mindestens 99,9% identisch zu dem bevorzugten Polypeptid oder wird von einer der Nukleinsäuresequenzen der vorliegenden Erfindung, wie sie zuvor definiert worden sind, kodiert. Das prozentuale Ausmaß der Identität kann beispielsweise durch Vergleich der Sequenzinformation unter Verwendung des GAP-Computerprogramms, Version 6.0, welches von Devereux et al. (Nucl. Acids. Res. 12:387 (1984) beschrieben worden ist, und das von der University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG) erhältlich ist, bestimmt werden. Das GAP-Programm verwendet das Alignment-Verfahren von Needleman und Wunsch (J. Mol. Biol. 48:443, 1970), wie es von Smith und Waterman (Adv. Appl. Math. 2:482, 1981) überarbeitet worden ist. Die bevorzugten vorgegebenen Parameter für das GAP-Programm umfassen: (1) eine unäre Vergleichsmatrix (enthaltend einen Wert 1 für Identitäten und einen Wert 0 für Nicht-Identitäten) für Nukleotide und die gewichtete Vergleichsmatrix von Gribskov und Burgess, Nucl. Acids. Rest. 14:6745, 1986), wie sie von Schwartz und Dayhoff, Hrsg., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Seiten 353-358, 1979, beschrieben worden ist; (2) eine Strafe von 3,0 für jede Lücke und eine zusätzliche Strafe von 0,10 für jedes Symbol in jeder Lücke; und (3) keine Strafe für Lücken am Ende.

[0075] Varianten können konservativ ausgetauschte Sequenzen umfassen, was bedeutet, dass ein gegebener Aminosäurerest durch einen Rest mit ähnlichen physiochemischen Eigenschaften ersetzt wird. Beispiele für konservative Substitutionen umfassen die Substitution eines aliphatischen Rests gegen einen anderen, wie beispielsweise Ile, Val, Leu oder Ala gegeneinander, oder Substitutionen eines polaren Rests gegen einen anderen, wie beispielsweise zwischen Lys und Arg; Glu und Asp; oder Gln und Asn. Andere solche konservativen Substitutionen, beispielsweise Substitutionen ganzer Bereiche mit ähnlichen Hydrophobizitätseigenschaften, sind hinreichend bekannt. Natürlich vorkommende Varianten sind ebenfalls von der Erfindung umfasst. Beispiele für solche Varianten sind Proteine, die aus dem wechselnden mRNA-Spleißvorgängen resultieren, aus der proteolytischen Spaltung von IL-1-epsilon-Polypeptiden oder aus der Transkription/Translation von verschiedenen Allelen. Variationen, die sich einer Proteolyse zuordnen lassen, umfassen z.B. Unterschiede im N- oder C-Terminus bei Expression in verschiedenen Arten von Wirtszellen aufgrund des proteolytischen Entfernens von einer oder von mehreren terminalen Aminosäuren von den Polypeptiden der vorliegenden Erfindung (üblicherweise von 1 bis 5 terminalen Aminosäuren).

Oligomere

[0076] Die erfindungsgemäßen Polypeptide können ferner als Oligomere vorkommen, wie beispielsweise kovalent verknüpfte oder nicht-kovalent verknüpfte Dimere oder Trimere. Oligomere können durch Disulfidbrücken verknüpft sein, die zwischen Cysteinresten von verschiedenen Polypeptiden gebildet werden.

[0077] Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung wird ein Polypeptid-Dimer derart durch Fusion der erfindungsgemäßen Polypeptide an eine Fc-Region eines Antikörpers (z.B. IgG1) erzeugt, dass die biologische Aktivität dieser Polypeptide nicht gestört wird. Die Fc-Region wird vorzugsweise an den C-Terminus eines löslichen erfindungsgemäßen Polypeptids fusioniert, um eine Fc-Fusion oder ein Fc-Polypeptid zu bilden. Die Begriffe "Fc-Fusionsprotein" oder "Fc-Polypeptide" umfassen wie vorliegend verwendet native Formen und Mute-

in-Formen, sowie trunkierte Fc-Polypeptide, welche die Hinge-Region, die eine Dimerisierung fördert, umfassen. Beispielhafte Verfahren zur Herstellung der oben dargestellten Fc-Polypeptide werden in den US-Patenten 5,426,048 und 5,783,672 offenbart, die beide durch Verweis eingeschlossen sind.

[0078] Die allgemeine Herstellung von Fusionsproteinen, die heterologe Polypeptide umfassen, welche an verschiedene Teile von Antikörper-abgeleiteten Polypeptiden fusioniert sind (einschließlich der Fc-Domäne), sind beispielsweise von Ashkenazi et al. (PNAS USA 88:10535, 1991) und von Byrn et al. (Nature 344:677, 1990) beschrieben, die vorliegend durch Verweis eingeschlossen sind. Eine Genfusion, die für das Polypeptid:Fc-Fusionsprotein der vorliegenden Erfindung kodiert, wird in einen geeigneten Expressionsvektor inseriert. Dem Polypeptid:Fc-Fusionsprotein wird es erlaubt, sich ähnlich wie Antikörpermoleküle zusammenzulagern, wobei sich zwischen den Fc-Polypeptiden Disulfidbindungen zwischen den Ketten (interchain) ausbilden, was zu divalenten erfindungsgemäßen Polypeptiden führt. Wenn Fusionsproteine sowohl mit der leichten als auch mit der schweren Kette eines Antikörpers hergestellt werden, ist es möglich, ein Polypeptid-Oligomer mit bis zu 4 extrazellulären Polypeptidregionen zu bilden. Alternativ dazu kann man zwei lösliche Polypeptiddomänen mit einem Peptidverbindungsmolekül (peptide linker) verknüpfen.

Änderungen

[0079] Wie oben dargelegt stellt die Erfindung isolierte und gereinigte Polypeptide und Fragmente derselben bereit, sowohl rekombinante als auch nicht-rekombinante. Varianten und Derivate der nativen Polypeptide können durch Mutationen von Nukleotidsequenzen erhalten werden, die für native Polypeptide kodieren. Alternativen der nativen Aminosäuresequenz können durch ein beliebiges von mehreren herkömmlichen Verfahren erreicht werden. Mutationen können an bestimmten Stellen durch Synthetisieren von Oligonukleotiden eingebracht werden, die eine mutierte Sequenz enthalten, welche von Restriktionsschnittstellen flankiert ist, die die Ligation an Fragmente der nativen Sequenz ermöglichen. Nach der Ligation kodiert die resultierende rekonstruierte Sequenz ein Analog mit der gewünschten Aminosäureinsertion, -Substitution oder -Deletion.

[0080] Alternativ dazu kann ein Oligonukleotid-gesteuertes, ortsspezifisches Mutageneseverfahren durchgeführt werden, um ein verändertes Gen bereitzustellen, wobei vorbestimmte Codons durch Substitution, Deletion oder Insertion verändert werden können. Beispielhafte Verfahren zur Herstellung der oben beschriebenen Änderungen sind in Walder et al. (Gene 42:133 1986); Bauer et al. (Gene 37:73, 1985); Craik (BioTechniques, Januar 1985, 12-19); Smith et al. (Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press, 1981); Kunkel (Proc. Natl. Acid. Sci. USA 82:488, 1985); Kunkel et al. (Methods in Enzymol. 154:367, 1987); und in den US-Patent Nrn. 4,518,584 und 4,737,462 offenbart, die alle durch Verweis eingeschlossen sind.

[0081] Die erfindungsgemäßen Polypeptide können ferner modifiziert werden, um Polypeptid-Derivate herzustellen, indem kovalente oder aggregative Konjugate mit anderen chemischen Resten gebildet werden, wie beispielsweise mit Glykosylgruppen, Polyethylenglykol (PEG)-Gruppen, Lipiden, Phosphaten, Acetylgruppen und Ähnlichen. Kovalente Derivate der erfindungsgemäßen Polypeptide können durch Anknüpfen der chemischen Reste an funktionale Gruppen von Polypeptidaminosäureseitenketten oder an den N-Terminus oder C-Terminus eines erfindungsgemäßen Polypeptids oder die extrazelluläre Domäne desselben hergestellt werden. Andere Derivate der Polypeptide im Bereich dieser Erfindung umfassen kovalente oder aggregative Konjugate dieser Polypeptide oder Peptidfragmente mit anderen Proteinen oder Polypeptiden, wie beispielsweise durch Synthese in rekombinanter Kultur als N-terminale oder C-terminale Fusion. Die Konjugate können beispielsweise ein Signal oder eine Leader-Polypeptidsequenz (z.B. den α-Faktor-Leader von Saccharomyces) am N-Terminus des erfindungsgemäßen Polypeptids umfassen. Das Signal- oder Leader-Peptid steuert co-translational oder post-translational den Transfer des Konjugats vom Ort seiner Synthese zu einem Ort innerhalb oder außerhalb der Zellmembran oder Zellwand.

[0082] Polypeptidkonjugate können Peptide umfassen, die zugesetzt wurden, um die Reinigung oder Identifizierung des erfindungsgemäßen Polypeptids zu ermöglichen. Solche Peptide umfassen beispielsweise Poly-His oder die antigenischen Identifizierungspeptide, die in US-Patent Nr. 5,011,912 und in Hopp et al., Bio/Technology 6:1204, 1988 beschrieben ist.

[0083] Die Erfindung umfasst ferner Polypeptide der Erfindung mit oder ohne assoziierte Glykosylierung nach nativem Muster. Die Polypeptide, die in Hefe oder in Säugetier-Expressionssystemen (z.B. COS-1- oder COS-7-Zellen) exprimiert werden, können abhängig von der Wahl des Expressionssystems hinsichtlich ihres Molekulargewichts und Glykosylierungsmusters einem nativen Polypeptid ähnlich sein oder von diesem in signifikanter Weise abweichen. Die Expression der erfindungsgemäßen Polypeptide in bakteriellen Expressionssystemen, wie beispielsweise in E. coli, stellt nicht-glykosylierte Moleküle bereit. Glykosylgruppen können

durch herkömmliche Verfahren entfernt werden, insbesondere durch solche, bei denen eine Glykopeptidase verwendet wird. Im Allgemeinen können glykosylierte Polypeptide der Erfindung mit einem molaren Überschuss an Glykopeptidase (Boehringer Mannheim) inkubiert werden.

[0084] Entsprechend sind gleichwertige DNA-Konstrukte, welche für verschiedene Additionen oder Substitutionen von Aminosäureresten oder -Sequenzen kodieren, oder für Deletionen von terminalen oder internen Resten oder Sequenzen, ebenfalls von der Erfindung umfasst. Beispielsweise können N-Glykosylierungsstellen in der extrazellulären Domäne des Polypeptids modifiziert werden, so dass eine Glykosylierung unterbunden wird, was die Expression eines reduzierten Kohlenhydratanalogs in Säugetier- und Hefe-Expressionssystemen erlaubt. Die N-Glykosylierungsstellen in eukaryontischen Polypeptiden sind durch ein Aminosäuretriplet Asn-X-Y charakterisiert, wobei X jede Aminosäure außer Pro ist, und Y Ser oder Thr ist. Geeignete Substitutionen, Additionen oder Deletionen der Nukleotidsequenz, die für diese Triplets kodiert, wird dazu führen, dass das Anheften von Kohlenhydratresten an die Asn-Seitenkette verhindert wird. Eine Veränderung eines einzelnen Nukleotids, das so gewählt ist, dass Asn durch eine andere Aminosäure ersetzt wird, ist beispielsweise ausreichend, um eine N-Glykosylierungsstelle zu inaktivieren. Bekannte Verfahren zur Inaktivierung von N-Glykosylierungsstellen in Proteinen umfassen diejenigen, die in US-Patent 5,071,972 und EP 276 846 beschrieben sind, die vorliegend durch Verweis eingeschlossen sind.

[0085] In einem weiteren Beispiel können Sequenzen, die für Cys-Reste kodieren, welche nicht für die biologische Aktivität wichtig sind, verändert werden, um zu bewirken, dass die Cys-Reste deletiert oder gegen andere Aminosäuren ersetzt werden, was die Bildung von inkorrekten intramolekularen Disulfidbrücken bei der Renaturierung verhindert. Andere Äquivalente werden durch Modifikation von benachbarten dibasischen Aminosäurereste hergestellt, um die Expression in Hefesystemen zu verstärken, in denen eine KEX2-Proteaseaktivität vorhanden ist. EP 212,914 offenbart die Verwendung einer ortsspezifischen Mutagenese, um die KEX2-Proteaseprozessierungsstellen in einem Protein zu inaktivieren. Die KEX2-Proteaseprozessierungsstellen werden durch Deletieren, Zufügen oder Substituieren von Resten inaktiviert, wobei Arg-Arg-, Arg-Lys- und Lys-Arg-Paare verändert werden, um das Vorkommen dieser benachbarten basischen Reste zu beseitigen. Lys-Lys-Paarungen sind in beträchtlichem Maße weniger empfindlich gegenüber einer Spaltung durch KEX2, und die Umwandlung von Arg-Lys oder Lys-Arg zu Lys-Lys stellt ein konservatives und bevorzugtes Vorgehen zur Inaktivierung der KEX2-Stellen dar.

Fragmente und Verwendung derselben

[0086] In einem weiteren Aspekt der Erfindung können die erfindungsgemäßen Polypeptide einer Fragmentierung in Peptide durch chemische und enzymatische Mittel unterworfen werden. Die so hergestellten Fragmente können für eine Vielzahl von Zwecken verwendet werden, einschließlich als Molekulargewichtsmarker und als Marker für den isoelektrischen Punkt. Die Polypeptide und Peptidfragmente können ferner für die Analyse des Ausmaßes der Fragmentierung verwendet werden. Daher umfasst die Erfindung diese Polypeptide und Peptidfragmente sowie Kits, die bei der Bestimmung des apparenten Molekulargewichts und des isoelektrischen Punktes eines Proben-Proteins helfen, sowie Kits zur Bestimmung des Ausmaßes einer Fragmentierung eines Proben-Proteins.

[0087] Obwohl alle Verfahren der Fragmentierung von der Erfindung umfasst sind, ist die chemische Fragmentierung eine bevorzugte Ausführungsform und umfasst die Verwendung von Cyanogenbromid, um unter neutralen oder sauren Bedingungen zu spalten, sodass eine spezifische Spaltung an Methioninresten auftritt (E. Gross, Methods in Enz. 11:238-255, 1967). Dies kann darüber hinaus weitere Schritte umfassen, sowie beispielsweise einen Carboxymethylierungsschritt, um Cysteinreste in eine nicht-reaktive Spezies umzuwandeln.

[0088] Die enzymatische Fragmentierung ist eine weitere bevorzugte Ausführungsform und umfasst die Verwendung einer Protease, wie beispielsweise Asparaginylendo-Peptidase, Arginylendo-Peptidase, Achromobacter-Protease I, Trypsin, Staphylococcus aureus V8-Protease, Endoproteinase Asp-N oder Endoproteinase Lys-C unter herkömmlichen Bedingungen, um die Spaltung bei spezifischen Aminosäureresten zu erreichen. Eine Asparaginylendo-Peptidase kann spezifisch auf der Carboxyl-Seite der Asparaginreste spalten, die in dem erfindungsgemäßen Polypeptid vorhanden sind. Die Arginylendo-Peptidase kann spezifisch auf der Carboxyl-Seite der Argininreste spalten, die in den Polypeptiden vorhanden sind.

[0089] Die Achromobacter-Protease I kann spezifisch auf der Carboxyl-Seite von Lysinresten spalten, die in den Polypeptiden vorhanden sind (Sakiyama und Nakat, US-Patent Nr. 5,248,599; T. Masaki et al., Biochim. Biophys. Acta 660:44-50, 1981; T. Masaki et al., Biochim. Biophys. Acta 660:51-55, 1981). Trypsin kann spezifisch auf der Carboxyl-Seite der Arginin- und Lysinreste spalten, die in den erfindungsgemäßen Polypeptiden

vorhanden sind. Die enzymatische Fragmentierung kann auch mit einer Protease erfolgen, die an mehreren Aminosäureresten spaltet. Beispielsweise kann die Staphylococcus aureus V8-Protease spezifisch auf der Carboxyl-Seite von Asparaginsäure- und Glutaminsäureresten spalten, die in den Polypeptiden vorhanden sind (D.W. Cleveland, J. Biol. Chem. 3:1102-1106, 1977). Die Endoproteinase Asp-N kann spezifisch auf der Amino-Seite der Asparaginreste spalten, die in den Polypeptiden vorhanden sind. Die Endoproteinase Lys-C kann spezifisch auf der Carboxyl-Seite von Lysinresten spalten, die in den erfindungsgemäßen Polypeptiden vorhanden sind. Andere enzymatische und chemische Behandlungen können in ähnlicher Weise verwendet werden, um diese Polypeptide spezifisch in eine einzigartige Gruppe von spezifischen Peptiden zu fragmentieren.

[0090] Selbstverständlich können die Peptide und Fragmente der erfindungsgemäßen Polypeptide auch durch herkömmliche rekombinante Verfahren und synthetische Verfahren, die im Stand der Technik hinreichend bekannt sind, hergestellt werden. In Bezug auf die rekombinanten Verfahren können die Polypeptide und Peptidfragmente, die von der vorliegenden Erfindung umfasst sind, variable Molekulargewichte aufweisen, abhängig von der Wirtszelle, in der sie exprimiert werden. Die Glykosylierung der erfindungsgemäßen Polypeptide und Peptidfragmente in verschiedenen Zelltypen kann abhängig vom Ausmaß der Modifikation dieser Stücke zu Änderungen hinsichtlich des Molekulargewichts führen. Die Größe dieser Stücke kann bei Fragmenten von Polypeptiden, die von extrazellulären Teilen des Polypeptids abgeleitet sind, am stärksten heterogen sein. Einheitliche Polypeptide und Peptidfragmente können erhalten werden, indem man Polypeptide verwendet, die gänzlich von Transmembranregionen und zytoplasmatischen Regionen abgeleitet sind, eine Vorbehandlung mit N-Glycanase durchführt, um die Glykosylierung zu entfernen, oder die Polypeptide in bakteriellen Wirten exprimiert.

[0091] Das Molekulargewicht der Polypeptide kann auch verändert werden, indem man zusätzlich Peptidsequenzen sowohl an den Amino-Terminus als auch an den Carboxy-Terminus der erfindungsgemäßen Polypeptide fusioniert. Fusionen von zusätzlichen Peptidsequenzen an das aminoterminale und das carboxyterminale Ende der erfindungsgemäßen Polypeptide können verwendet werden, um die Expression dieser Polypeptide zu verstärken oder bei der Aufreinigung dieser Proteine zu helfen. Darüber hinaus werden die Fusionen zusätzlicher Peptidsequenzen an das aminoterminale und das carboxyterminale Ende der erfindungsgemäßen Polypeptide einige (jedoch üblicherweise nicht alle) der fragmentierten Peptide des Polypeptids, die durch enzymatische oder chemische Behandlung erzeugt worden sind, verändern. Selbstverständlich können unter Verwendung von Routineverfahren und bekannten Methoden der Molekularbiologie Mutationen in die erfindungsgemäßen Polypeptide eingebracht werden. Beispielsweise kann eine Mutation so gestaltet sein, dass sie eine Stelle der proteolytischen Spaltung durch ein spezifisches Enzym oder eine Stelle der Spaltung durch einen spezifischen, chemisch induzierten Fragmentierungsprozess beseitigt. Die Beseitigung dieser Stelle wird den Peptid-Fingerabdruck des erfindungsgemäßen Polypeptids bei der Fragmentierung mit dem spezifischen Enzym oder durch den chemischen Prozess verändern.

[0092] Da die einzigartige Aminosäuresequenz jedes Stücks ein Molekulargewicht spezifiziert, können diese Teile anschließend als Molekulargewichtsmarker bei solchen Analysemethoden dienen, um bei der Bestimmung des Molekulargewichts eines Proteins, Polypeptids oder Fragments desselben in einer Probe behilflich zu sein. Die Molekulargewichtsmarker der vorliegenden Erfindung dienen besonders gut als Molekulargewichtsmarker zur Abschätzung des apparenten Molekulargewichts von Proben-Proteinen, die ähnliche apparente Molekulargewichte aufweisen, und sie ermöglichen daher eine höhere Genauigkeit bei der Bestimmung des apparenten Molekulargewichts von Proteinen.

[0093] Wenn die Erfindung die Verwendung von Molekulargewichtsmarkern aus fragmentierten Peptiden betrifft, sind diese Marker vorzugsweise mindestens 10 Aminosäuren lang. Es ist mehr bevorzugt, dass diese Molekulargewichtsmarker aus fragmentierten Peptiden zwischen 10 und 100 Aminosäuren lang sind. Noch mehr bevorzugt sind Molekulargewichtsmarker aus fragmentierten Peptiden, die zwischen 10 und 50 Aminosäuren, und insbesondere zwischen 10 und 35 Aminosäuren lang sind. Am meisten bevorzugt sind Molekulargewichtsmarker aus fragmentierten Peptiden, die zwischen 10 und 20 Aminosäuren lang sind.

[0094] Unter den Verfahren zur Bestimmung des Molekulargewichts sind Sedimentation, Gelelektrophorese, Chromatographie und Massenspektrometrie. Eine besonders bevorzugte Ausführungsform ist die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (U.K. Laemmli, Nature 227:680-685, 1970). Das Verfahren verwendet üblicherweise zwei getrennte Bahnen eines Gels, das Natriumdodecylsulfat und eine Acrylamidkonzentration von zwischen 6 und 20% enthält. Die Fähigkeit, den Marker und die Probe gleichzeitig unter identischen Bedingungen aufzulösen erlaubt eine erhöhte Genauigkeit. Es ist natürlich verständlich, dass zahlreiche verschiedene Methoden zur Bestimmung des Molekulargewichts eines Proben-Proteins unter Verwendung der er-

findungsgemäßen Polypeptide angewendet werden können, und dass diese Ausführungsform in keiner Weise den Umfang der Erfindung einschränkt.

[0095] Darüber hinaus besitzen die Polypeptide und fragmentierten Peptide der vorliegenden Erfindung einheitliche Ladungseigenschaften und können daher als spezifische Marker dienen, um unter Verwendung von Methoden, wie beispielsweise der isoelektrischen Fokussierung, bei der Bestimmung des isoelektrischen Punktes eines Proben-Proteins, Polypeptids oder fragmentierten Peptids behilflich zu sein. Diese Polypeptide oder fragmentierten Peptidmarker sind besonders gut für die Abschätzung des apparenten isoelektrischen Punktes eines Proben-Proteins zu gebrauchen, und sie weisen apparente isoelektrische Punkte auf, welche dicht bei denen der erfindungsgemäßen Marker aus Polypeptiden oder fragmentierten Peptiden liegen.

[0096] Die Methoden der isoelektrischen Fokussierung können ferner mit anderen Methoden, wie beispielsweise einer Gelelektrophorese kombiniert werden, um gleichzeitig ein Protein auf Basis des Molekulargewichts und der Ladung zu trennen. Die Fähigkeit, gleichzeitig diese Marker aus Polypeptiden oder fragmentierten Peptiden und das Proben-Protein unter identischen Bedingungen gleichzeitig aufzulösen, erlaubt eine erhöhte Genauigkeit bei der Bestimmung des apparenten isoelektrischen Punktes des Proben-Proteins. Dies ist von besonderem Interesse bei Methoden wie der zweidimensionalen Elektrophorese (T.D. Brock und M.T. Madigan, Biology of Microorganisms 76-77 (Prentice Hall, 6. Auflage, 1991)), bei denen die Art des Verfahrens vorschreibt, dass jeglicher Marker gleichzeitig mit dem Proben-Protein aufgelöst werden muss. Darüber hinaus können diese Polypeptide und fragmentierten Peptide derselben bei solchen Verfahren sowohl bei der Bestimmung des isoelektrischen Punktes als auch bei der Bestimmung des Molekulargewichts eines Proben-Proteins oder eines fragmentierten Peptids helfen.

[0097] Polypeptide und fragmentierte Peptide können unter Verwendung von zwei verschiedenen Verfahren sichtbar gemacht werden, die eine Unterscheidung zwischen dem Proben-Protein und den Molekulargewichtsmarkern erlauben. In einer Ausführungsform können die erfindungsgemäßen Molekulargewichtsmarker aus Polypeptiden und fragmentierten Peptiden unter Verwendung von Antikörpern, die gegen diese Marker erzeugt worden sind, und mittels herkömmlicher Immunblotmethoden sichtbar gemacht werden. Diese Detektion wird unter herkömmlichen Bedingungen durchgeführt, die nicht zur Detektion des Proben-Proteins führen. Es ist verständlich, dass es möglicherweise nicht möglich sein wird, Antikörper gegen alle Polypeptidfragmente der vorliegenden Erfindung herzustellen, da kleine Peptide möglicherweise keine immunogenen Epitope aufweisen. Es ist ferner verständlich, dass nicht alle Antikörper in diesem Assay funktionieren werden; diejenigen Antikörper jedoch, die in der Lage sind, an die erfindungsgemäßen Polypeptide und Fragmente zu binden, können problemlos unter Verwendung herkömmlicher Methoden bestimmt werden.

[0098] Das Proben-Protein wird unter Verwendung herkömmlicher Färbungsverfahren ebenfalls sichtbar gemacht. Der molare Überschuss des Proben-Proteins gegenüber dem erfindungsgemäßen Molekulargewichtsmarker aus Polypeptiden oder fragmentierten Peptiden ist so gewählt, dass die herkömmlichen Färbungsverfahren vornehmlich das Proben-Protein detektieren. Die Menge dieser Molekulargewichtsmarker aus Polypeptiden oder fragmentierten Peptiden ist so gewählt, dass sie keine oder eine geringe Detektion dieser Marker durch herkömmliche Färbungsverfahren erlaubt. Der bevorzugte molare Überschuss des Proben-Proteins gegenüber dem erfindungsgemäßen Polypeptid-Molekulargewichtsmarker beträgt zwischen 2- und 100000-fach. Noch mehr bevorzugt ist es, dass der bevorzugte molare Überschuss des Proben-Proteins gegenüber diesen Polypeptid-Molekulargewichtsmarkern zwischen 10- und 10000-fach, und insbesondere zwischen 100- und 1000-fach beträgt.

[0099] Es ist natürlich verständlich, dass zahlreiche Methoden für die Bestimmung und die Detektion des Molekulargewichts und des isoelektrischen Punkts eines Proben-Proteins, von Polypeptiden und von fragmentierten Peptiden derselben unter Verwendung dieser Polypeptid-Molekulargewichtsmarker und der Peptidfragmente derselben angewendet werden können, und dass diese Ausführungsformen in keiner Weise den Umfang der Erfindung einschränken.

[0100] Gemäß einer weiteren Ausführungsform kann die Analyse der fortschreitenden Fragmentierung der erfindungsgemäßen Polypeptide in spezifische Peptide (D.W. Cleveland et al., J. Biol. Chem. 252:1102-1106, 1977), wie beispielsweise durch Veränderung der Dauer oder der Temperatur der Fragmentierungsreaktion, als Kontrolle für das Ausmaß der Spaltung eines Proben-Proteins verwendet werden. Beispielsweise kann die Spaltung derselben Menge Polypeptid und Proben-Protein unter identischen Bedingungen einen direkten Vergleich des Ausmaßes der Fragmentierung erlauben. Bedingungen, die zur vollständigen Fragmentierung des Polypeptids führen, können auch zu einer vollständigen Fragmentierung des Proben-Proteins führen.

[0101] Im Hinblick auf die spezifische Verwendung der erfindungsgemäßen Polypeptide und fragmentierten Peptide als Molekulargewichtsmarker erzeugt die Fragmentierung eines bevorzugten Polypeptids der vorliegenden Erfindung mit Cyanogenbromid eine einzigartige Gruppe von fragmentierten Peptid-Molekulargewichtsmarkern mit Molekulargewichten von ungefähr 6933, 625 und 238 Da, bei Fehlen einer Glykosylierung. Ein zusätzliches Fragment von 149 Da ergibt sich, wenn das initiale Methionin vorhanden ist. Die Spaltung von SEQ ID NO:8 durch Cyanogenbromid erzeugt Fragmente mit Molekulargewichten von 149,2; 260,3; 2017,4; 3954,6; 4442,1 und 6932,7. Die Spaltung von SEQ ID NO:13 durch Cyanogenbromid erzeugt Fragmente mit Molekulargewichten von 149,2; 260,3; 2017,4; 3954,6; 4470,1 und 6932,7. Die Verteilung der Methioninreste bestimmt die Anzahl von Aminosäuren in jedem Peptid, und die einzigartige Aminosäurezusammensetzung eines jeden Peptids bestimmt sein Molekulargewicht.

[0102] Darüber hinaus weisen die bevorzugten isolierten und aufgereinigten Polypeptide der vorliegenden Erfindung (SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:13) berechnete Molekulargewichte von ungefähr 7810 (7941 Da nach Addition eines Methionins an Position 1), 17684 bzw. 17712 Da auf, bei Fehlen einer Glykosylierung. Die beobachteten Molekulargewichte der bekannten IL-1-Polypeptide umfassen 17, 25, 31, 33 und 35 kDa und stellen daher einen Bereich von Molekulargewichten zur Verwendung bei diesen Bestimmungen dar.

[0103] Wenn ein intaktes Protein verwendet wird, ermöglicht die Verwendung dieser Polypeptid-Molekulargewichtsmarker eine erhöhte Genauigkeit bei der Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes von Proteinen, die apparente Molekulargewichte aufweisen, welche nahe bei 7810, 17684 oder 17712 Da liegen. Wenn Fragmente verwendet werden, ergibt sich eine erhöhte Genauigkeit bei der Bestimmung des Molekulargewichtes über den Bereich der Molekulargewichte der Fragmente.

[0104] In Bezug auf die Kits, die von der vorliegenden Erfindung umfasst sind, läßt sich schließlich feststellen, dass die Bestandteile solcher Kits verändert werden können, wobei diese allerdings üblicherweise die Molekulargewichtsmarker aus Polypeptiden und fragmentierten Peptiden enthalten. Darüber hinaus können diese Kits die Polypeptide enthalten, bei denen eine für die Fragmentierung notwendige Stelle entfernt worden ist. Darüber hinaus können die Kits Reagenzien für die spezifische Spaltung des Polypeptids und des Proben-Proteins durch chemische oder enzymatische Spaltung enthalten. Die Kits können ferner Antikörper enthalten, die gegen die erfindungsgemäßen Polypeptide oder Fragmente derselben gerichtet sind.

Sense- und Antisense-Oligonukleotide

[0105] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung können Antisense- oder Sense-Oligonukleotide gemäß der Erfindung hergestellt werden, die eine einzelsträngige Nukleinsäuresequenz (entweder RNA oder DNA) umfassen, welche in der Lage ist, an eine Ziel-mRNA-Sequenz zu binden (wobei ein Duplex gebildet wird), oder an eine Sequenz in einer doppelsträngigen DNA-Helix (wobei eine Triple-Helix gebildet wird). Antisense- oder Sense-Oligonukleotide umfassen gemäß der vorliegenden Erfindung ein Fragment der kodierenden Region der cDNA (SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 oder SEQ ID NO:12). Ein solches Fragment umfasst üblicherweise mindestens etwa 14 Nukleotide, vorzugsweise von etwa 14 bis etwa 30 Nukleotide. Die Fähigkeit, basierend auf einer cDNA-Sequenz für ein gegebenes Protein ein Antisense- oder ein Sense-Oligonukleotid zu erzeugen, ist beispielsweise in Stein und Cohen, Cancer Res. 48:2659, 1988, und in van der Krol et al., BioTechniques 6:958, 1988, beschrieben.

[0106] Die Bindung von Antisense- oder Sense-Oligonukleotiden an Zielnukleinsäuresequenzen führt zur Bildung von Komplexen, die die Translation (RNA) oder Transkription (DNA) durch eine von mehreren Arten blockieren, einschließlich durch verstärkten Abbau von Duplexen, durch vorzeitige Termination der Transkription oder Translation oder auf andere Art. Die Antisense-Oligonukleotide können daher verwendet werden, um die Expression der erfindungsgemäßen Polypeptide zu blockieren. Antisense- oder Sense-Oligonukleotide umfassen ferner Oligonukleotide mit modifiziertem Zucker-Phosphodiester-Rückgrat (oder anderen Zuckerverbindungen, wie beispielsweise diejenigen, die in WO 91/06629 beschrieben sind), wobei solche Zuckerverbindungen resistent gegenüber endogenen Nukleasen sind. Solche Oligonukleotide mit resistenten Zuckerverbindungen sind in vivo stabil (d.h. in der Lage, einem enzymatischen Abbau Stand zu halten), behalten jedoch ihre Sequenzspezifität bei, wodurch sie in der Lage sind, an Zielnukleotidsequenzen zu binden. Andere Beispiele für Sense- oder Antisense-Oligonukleotide umfassen diejenigen Oligonukleotide, die kovalent an organische Reste gebunden sind, wie beispielsweise diejenigen, die in WO 90/10448 beschrieben sind, oder andere Reste, die die Affinität des Oligonukleotids für eine Zielnukleinsäuresequenz erhöhen, wie beispielsweise Poly-(L-Lysin). Des Weiteren können interkalierende Mittel, wie beispielsweise Ellipticin, und alkylierende Mittel oder Metallkomplexe an Sense- oder antisense-Oligonukleotide gebunden werden, um die Bindungsspezifitäten der Antisense- oder Sense-Oligonukleotide für die Zielnukleotidsequenz zu modifizieren.

[0107] Antisense- oder Sense-Oligonukleotide können durch ein beliebiges Gentransferverfahren in eine die Zielnukleinsäuresequenz enthaltende Zelle eingebracht werden, z.B. durch $CaPO_4$-vermittelte DNA-Transfektion, Elektroporation oder unter Verwendung von Gentransfervektoren, wie dem Epstein-Barr-Virus. Antisense- oder Sense-Oligonukleotide werden vorzugsweise in eine die Zielnukleinsäuresequenz enthaltende Zelle eingebracht, indem die Antisense- oder Sense-Oligonukleotide in einen geeigneten retroviralen Vektor inseriert werden, und anschließend die Zelle mit dem Retrovirusvektor, der die inserierte Sequenz enthält, entweder in vivo oder ex vivo in Kontakt gebracht wird. Geeignete retrovirale Vektoren umfassen (sind jedoch nicht beschränkt auf) den murinen Retrovirus M-MuLV, N2 (ein Retrovirus, der sich von M-MuLV ableitet), oder die Doppelkopie-Vektoren, die als DCT5A, DCT5B und DCT5C bezeichnet werden (siehe PCT-Anmeldung US 90/02656).

[0108] Alternativ dazu können Sense- oder Antisense-Oligonukleotide in eine die Zielnukleinsäuresequenz enthaltende Zelle eingebracht werden, indem ein Konjugat mit einem Liganden-bindenden Molekül gebildet wird, wie es in WO 91/04753 beschrieben ist. Geeignete Liganden-bindende Moleküle umfassen (sind jedoch nicht beschränkt auf) Zelloberflächenrezeptoren, Wachstumsfaktoren, andere Zytokine oder andere Liganden, die an Zell-Oberflächenrezeptoren binden. Vorzugsweise interferiert die Konjugation des Liganden-bindenden Moleküls im Wesentlichen nicht mit der Fähigkeit des Liganden-bindenden Moleküls, an sein entsprechendes Molekül oder an seinen entsprechenden Rezeptor zu binden; sie blockiert im Wesentlichen auch nicht den Eintritt des Sense- oder Antisense-Oligonukleotids oder seiner konjugierten Version in die Zelle.

[0109] In einer weiteren Ausführungsform kann ein Sense- oder Antisense-Oligonukleotid in eine die Zielnukleinsäuresequenz enthaltende Zelle eingebracht werden, indem ein Oligonukleotid-Lipid-Komplex gebildet wird, wie es in WO 90/10488 beschrieben ist. Der Sense- oder Antisense-Oligonukleotid-Lipid-Komplex wird vorzugsweise innerhalb der Zelle durch eine endogene Lipase getrennt.

Chromosomen-Kartierung

[0110] In einer weiteren Ausführungsform können Oligonukleotide, die die Gesamtheit oder einen Teil von SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 oder SEQ ID NO:12 darstellen, vom Fachmann unter Verwendung hinreichend bekannter Methoden verwendet werden, um das humane Chromosom 2 und den spezifischen Locus desselben zu identifizieren, der die DNA von IL-1-Familienmitgliedern, wie beispielsweise IL-1-epsilon, enthält. Wie nachfolgend dargelegt wurden SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 und SEQ ID NO:12 durch Radiation-Hybrid-Kartierung auf den Bereich des langen Arms (2q) von Chromosom 2 kartiert. Diese Region ist mit spezifischen Erkrankungen assoziiert, die Glaukom, ektodermale Dysplasie, Insulin-abhängige Diabetes mellitus, Wrinkly-Skin-Syndrom, T-Zellen-Leukämie/-Lymphom, Asthma und tibiale Muskeldystrophie. Daher kann SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:12 oder ein Fragment dieser Sequenzen vom Fachmann unter Verwendung hinreichend bekannter Methoden verwendet werden, um die oben beschriebenen Erkrankungen oder andere Abnormalitäten, die mit Chromosom 2 assoziiert sind, zu untersuchen. Dies würde es ermöglichen, Zustände zu unterscheiden, in denen dieser Marker umgelagert oder deletiert ist. Darüber hinaus können SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 oder SEQ ID NO:12 oder ein Fragment derselben als Positionsmarker verwendet werden, um andere humane Gene unbekannter Lokalisierung zu kartieren.

Verwendungen in Therapie und Forschung

[0111] Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft therapeutische Verwendungen von IL-1-epsilon. IL-1-Liganden spielen eine zentrale Rolle beim Schutz gegen Infektionen und bei der Unterstützung einer Immunantwort und einer Entzündungsantwort, was eine zelluläre Signaltransduktion, eine Aktivierung vaskulärer Endothelzellen und Lymphozyten, eine Induktion von inflammatorischen Zytokinen, Akute-Phase-Proteinen, Hämatopoese, Fieber, Knochenresorption, Prostaglandinen, Metalloproteinasen und Adhäsionsmolekülen einschließt. Mit der kontinuierlich zunehmenden Zahl von bekannten IL-1-Familienmitgliedern ist ein geeignetes Klassifikationsschema ein solches, das auf dem Vergleich der Polypeptidstruktur und der Funktion (Aktivierung und regulatorische Eigenschaften) beruht. Daher ist es wahrscheinlich, dass IL-1-epsilon, sowie auch IL-1α, IL-1β und IL-18, an zahlreichen der oben beschriebenen Funktionen beteiligt ist. Darüber hinaus ist es wahrscheinlich, dass IL-1-epsilon an der Unterstützung von Entzündungsantworten beteiligt ist, und somit wesentlich an der Auslösung und Beibehaltung von Entzündungs- und/oder Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise rheumatoide Arthritis, inflammatorische Darmerkrankung und Psoriasis, beteiligt sein könnte. Daher können Veränderungen der Expression und/oder Aktivierung von IL-1-Familienmitgliedern, wie beispielsweise IL-1-epsilon, tiefgreifenden Auswirkungen auf eine Fülle von zellulären Prozessen haben, einschließlich (jedoch nicht beschränkt auf) Aktivierung oder Inhibierung von Zell-spezifischen Antworten, Proliferation und Entzündungsreaktionen, die auf einer Veränderung der Signaltransduktion basieren.

[0112] Dementsprechend weist IL-1-epsilon therapeutische Anwendungen auf, wie beispielsweise den Schutz gegen Infektionen und die Erzeugung von Immunantworten oder Entzündungsantworten in Individuen, deren Immunantworten und Entzündungsantworten ungeeignet oder wirkungslos sind. Beispielsweise kann IL-1-epsilon bei der Stimulierung des Immunsystems von Individuen nützlich sein, deren Immunsystem immunsupprimiert ist. In ähnlicher Weise können Antagonisten von IL-1-epsilon bei der Inhibierung oder Behandlung von Entzündungs- und/oder Autoimmunerkrankungen nützlich sein, da IL-1-epsilon wahrscheinlich Entzündungsantworten fördert und an der Auslösung und Beibehaltung von Entzündungs- und/oder Autoimmunerkrankungen beteiligt ist.

[0113] An der IL-1-vermittelten zellulären Signalgebung ist oftmals eine molekulare Aktivierungskaskade beteiligt, in deren Verlauf ein Rezeptor ein Ligand-Rezeptor-vermitteltes Signal weiterleitet, indem er spezifisch intrazelluläre Kinasen aktiviert, die Zielsubstrate phosphorylieren, was zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFkB und der Proteinkinasen Jun-N-terminale Kinase und p38-map-Kinase führt. Diese Substrate können wiederum selbst Kinasen sein, die nach einer Phosphorylierung aktiviert werden. Alternativ dazu können sie Adaptermoleküle sein, die die stromabwärts gerichtete Signalübertragung nach einer Phosphorylierung durch Protein-Protein-Interaktion ermöglichen.

[0114] IL-1-epsilon könnte als Antagonist wirken und eine inhibitorische Wirkung auf Immunantworten und Entzündungsantworten aufweisen. IL-1-epsilon könnte beispielsweise eine Funktion aufweisen, die der von IL-1ra ähnlich ist, sodass das isolierte und auf gereinigte erfindungsgemäße IL-1-epsilon-Polypeptid oder Fragmente desselben als therapeutische Mittel bei der Inhibierung der Signalübertragung und bei der Behandlung von Entzündungserkrankungen und/oder Autoimmunerkrankungen nützlich sein können. Im Hinblick auf die Daten, die in Beispiel III angeführt werden, ist es jedoch wahrscheinlicher, dass IL-1-epsilon ein Agonist ist, wie beispielsweise Il-1α oder IL-18. Wie oben aufgeführt sind solche Agonisten bei der Unterstützung von Immunantworten und Entzündungsantworten in Individuen nützlich, deren eigene Immunsysteme unter den Bedingungen einer Immunantwort ungeeignet sind. Zum Zwecke der Antagonisierung der IL-1-epsilon-Aktivität können Inhibitoren von Il-1-epsilon unter Verwendung von im Stand der Technik bekannten Methoden erzeugt oder gestaltet werden. Die erfindungsgemäßen Polypeptide, einschließlich der IL-1-epsilon-Inhibitoren, können durch hinreichend bekannte Verfahren in die extrazelluläre Umgebung eingebracht werden, beispielsweise durch intravenöse Verabreichung des Proteins oder durch Kopplung des Proteins an einen monoklonalen Antikörper, der auf einen spezifischen Zelltyp gerichtet ist, um dadurch die Signalübertragung zu beeinflussen.

[0115] Sofern die erfindungsgemäßen Polypeptide als therapeutisches Mittel verwendet werden, können sie nach bekannten Verfahren in pharmazeutische Zusammensetzungen formuliert werden. Die Polypeptide können entweder als alleinige aktive Substanz oder gemeinsam mit anderen bekannten aktiven Substanzen in einer Mischung mit pharmazeutisch geeigneten Verdünnungsmitteln (z.B. Tris-HCl, Acetat, Phosphat), Konservierungsstoffen (z.B. Thimerosal, Benzylalkohol, Parabenen), Emulgatoren, löslichkeitsvermittelnden Substanzen, Adjuvantien und/oder Trägern kombiniert werden. Geeignete Träger und ihre Formulierungen sind in Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. Auflage, 1980, Mack Publishing Co., beschrieben. Darüber hinaus können solche Zusammensetzungen die Polypeptide in Form eines Komplexes mit Polyethylenglykol (PEG) oder Metall-Ionen enthalten, oder eingebracht in polymere Verbindungen, wie beispielsweise Polyessigsäure, Polyglykolsäure, Hydrogele, usw., oder eingebracht in Liposomen, Mikroemulsionen, Mizellen, unilamellare oder multilamellare Vesikel, Erythrozyten-Ghosts oder Sphäroblasten. Solche Zusammensetzungen werden den physikalischen Zustand, die Löslichkeit, die Stabilität, die Rate der in vivo-Freisetzung und die Rate der in vivo-Beseitigung der erfindungsgemäßen Polypeptide beeinflussen.

[0116] Die Dosierung der Zusammensetzung kann problemlos durch den Fachmann bestimmt werden. Die zu verabreichende Menge und die Häufigkeit der Verabreichung können empirisch bestimmt werden, wobei Alter und Größe des zu behandelnden Patienten sowie die zu behandelnde Krankheit Berücksichtigung finden werden.

[0117] Die Behandlung umfasst die Verabreichung der Zusammensetzung durch ein beliebiges, dem Fachmann bekanntes Verfahren, einschließlich intravenös, intraperitoneal, durch intrakorporeale Injektion, intraartikulär, intraventrikulär, intrathekal, intramuskulär, subkutan, topisch, tonsillär, intranasal, intravaginal und oral. Die Zusammensetzung kann ferner lokal verabreicht werden, z.B. durch Injektion in den jeweiligen Bereich, entweder intramuskulär oder subkutan.

[0118] Darüber hinaus können die DNA, die Polypeptide und die gegen Polypeptide gerichteten Antikörper der vorliegenden Erfindung als Reagenzien in einer Vielzahl von Forschungsprotokollen verwendet werden. Ein Beispiel für ein solches Forschungsprotokoll ist in Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual,

2. Auflage, Band 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), angegeben. Diese Reagenzien können beispielsweise als Marker für die zellspezifische oder gewebespezifische Expression von RNA oder Proteinen dienen. In ähnlicher Weise können diese Reagenzien verwendet werden, um die konstitutive und transiente Expression von RNA oder Polypeptiden zu untersuchen. Wie oben erwähnt kann die DNA verwendet werden, um die chromosomale Lokalisierung von DNA zu bestimmen und Gene in Relation zu dieser chromosomalen Lokalisierung zu kartieren. Die DNA kann ferner verwendet werden, um genetische Heterogenität und Vererbung unter Verwendung von Methoden, wie dem genetischen Fingerabdruck, zu untersuchen, und um Risiken zu identifizieren, die mit genetischen Störungen assoziiert sind. Die DNA kann ferner verwendet werden, um zusätzliche Gene zu identifizieren, die mit der DNA in Beziehung stehen, und um basierend auf dem Vergleich von Sequenzen Stammbäume zu etablieren. Die DNA und Polypeptide können verwendet werden, um durch positive Screening-Verfahren, wie beispielsweise Southernblotting oder Immunoblot, und durch negative Screening-Verfahren, wie beispielsweise Subtraktion, diejenigen Gene und Proteine zu selektieren, die homolog zu der DNA oder zu den Polypeptiden sind.

[0119] Da IL-1-epsilon ferner ein Ligand ist, nimmt es an Protein-Protein-Interaktionen mit mindestens einem oder mit mehreren Proteinen teil, d.h. seinem Rezeptor (seinen Rezeptoren). Daher können die erfindungsgemäßen Polypeptide und Fragmente als Reagenzien verwendet werden, um (a) Proteine zu identifizieren, die diese Polypeptide regulieren, und (b) Proteine zu identifizieren, die mit diesen interagieren könnten. Daher können IL-1-epsilon-Liganden oder Polypeptide, die Teile eines IL-1-epsilon-Liganden umfassen, nach hinreichend bekannten molekularbiologischen Verfahren verwendet werden, indem rekombinantes Protein an eine Affinitätsmatrix gekoppelt wird, oder indem man sie als "Köder" (baits) im Hefe-2-Hybridsystem verwendet, um Proteine zu identifizieren, die direkt mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid interagieren. Darüber hinaus werden die IL-1-epsilon-Polypeptide und Fragmente der vorliegenden Erfindung in Untersuchungen verwendet, die auf die Entdeckung von IL-1-Rezeptoren und/oder IL-1-epsilon-Rezeptoren gerichtet sind. Beispielsweise können IL-1-epsilon-Polypeptide und IL-1-epsilon-Polypeptidfragmente in Bindungsstudien verwendet werden, um Zellen zu identifizieren, die den Rezeptor exprimieren. Geeignete Bindungsstudien sind im Stand der Technik hinreichend bekannt und gehören zum allgemeinen Wissen des Fachmanns. In ähnlicher Weise finden die IL-1-epsilon-Polypeptide und Polypeptidfragmente der vorliegenden Erfindung darüber hinaus Verwendung bei Klonierungsrezeptoren unter Verwendung von Expressionsklonierungsmethoden.

[0120] Die Polypeptide und Fragmente derselben können als Reagenzien bei der Untersuchung der Signalgebungswege, die von IL-1- und Il-1R-Homologen oder Familienmitgliedern benutzt werden, und/oder bei der Blockierung dieser Signalgebungswege verwendet werden. Solche neuen IL-1-Rezeptorhomologe können insbesondere als Reagenzien verwendet werden, um neue an den Signaltransduktionswegen beteiligte Moleküle zu identifizieren, um die Expression in Zellen und Geweben zu charakterisieren, um ihre Funktionen bei der Entwicklung und bei Immun- und Entzündungsantworten zu verstehen, und um regulatorische Moleküle und physiologisch relevante Proteinsubstrate zu identifizieren.

[0121] Alternativ dazu können die Polypeptide der vorliegenden Erfindung vor der Expression mit einem Anhang (tag), wie beispielsweise einem Poly-His oder einem FLAG, ausgestattet werden, anschließend exprimiert und mittels Nickelchelatchromatographie oder mittels eines an die Säulenmatrix gekoppelten Anti-FLAG-Antikörpers aufgereinigt werden. Sobald das erfindungsgemäße Polypeptid an die Säule gebunden hat, kann es unter Verwendung eines bifunktionalen quervernetzten Mittels unter Verwendung herkömmlicher Methoden kovalent gebunden werden. Das kovalent an die Säule gebundene Polypeptid kann anschließend verwendet werden, um Moleküle aus Zelllysaten oder Zellüberständen (nach Behandlung mit verschiedenen Mitteln) über ihre Affinität für das erfindungsgemäße Polypeptid zu reinigen.

Antikörper

[0122] Im Rahmen der therapeutischen Aspekte und Forschungs-Aspekte der vorliegenden Erfindung können erfindungsgemäße Polypeptide und Peptide, die auf der Aminosäuresequenz derselben basieren, verwendet werden, um Antikörper zu erzeugen, die spezifisch an die Polypeptide binden. Der Begriff "Antikörper" soll polyklonale Antikörper, monoklonale Antikörper, Fragmente derselben, wie beispielsweise F(ab')2-Fragmente und Fab-Fragmente umfassen, sowie auch rekombinant hergestellte Bindungspartner. Antikörper werden als spezifisch bindend definiert, wenn sie die erfindungsgemäßen Polypeptide mit einem K_a-Wert von mehr als etwa $10^7\ M^{-1}$ oder mit etwa $10^7\ M^{-1}$ binden. Die Affinitäten von Bindungspartnern oder Antikörpern können problemlos unter Verwendung herkömmlicher Verfahren, wie beispielsweise derjenigen, die von Scatchard et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660 (1949) beschrieben wurden, bestimmt werden.

[0123] Polyklonale Antikörper können ausgehend von einer Vielzahl von Quellen problemlos erzeugt werden,

beispielsweise ausgehend von Pferden, Kühen, Ziegen, Schafen, Hunden, Hühnern, Kaninchen, Mäusen oder Ratten, wobei im Stand der Technik hinreichend bekannte Verfahren verwendet werden. Im Allgemeinen werden gereinigte erfindungsgemäße Polypeptide oder ein Peptid, das auf der Aminosäuresequenz der erfindungsgemäßen Polypeptide basiert und das in geeigneter Weise konjugiert ist, einem Wirtstier verabreicht, üblicherweise durch parenterale Injektion. Die Immunogenität dieser Polypeptide kann durch Verwendung eines Adjuvans, z.B. Freudsches vollständiges oder unvollständiges Adjuvans verstärkt werden. Nach Auffrischungsimmunisierungen werden kleine Serum-Proben gesammelt und hinsichtlich ihrer Reaktivität auf die Polypeptide untersucht. Beispiele für verschiedene Assays, die für eine solche Bestimmung nützlich sind, umfassen diejenigen, die in Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow und Lane (Hrsg.), Cold Spring Laboratory Press, 1988, beschrieben worden sind, sowie Verfahren, wie beispielsweise Gegenstrom-Immunelektrophorese (countercurrent immuno-electrophoresis; CIEP), Radioimmunassay, Radioimmunpräzipitation, enzymgebundener Immunosorbentassay (ELISA), Dotblotassays und Sandwichassays, vgl. US-Patent Nrn. 4,376,110 und 4,486,530.

[0124] Monoklonale Antikörper können problemlos unter Verwendung hinreichend bekannter Verfahren hergestellt werden, siehe beispielsweise die Verfahren, die in US-Patent Nrn. RE 32,011, 4,902,614, 4,543,439 und 4,411,993 beschrieben sind; Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, Kennett, McKearn und Bechtol (Hrsg.), 1980. Den Wirtstieren, wie beispielsweise Balb/c-Mäusen, werden mindestens einmal und vorzugsweise mindestens zweimal in Intervallen von etwa 3 Wochen isolierte und gereinigte Polypeptide oder konjugierte erfindungsgemäße Polypeptide intraperitoneal injiziert, wahlweise in Gegenwart eine Adjuvans. 10 µg isoliertes und gereinigtes erfindungsgemäßes Polypeptid oder Peptide, die auf der Aminosäuresequenz der erfindungsgemäßen Polypeptide basieren, in Gegenwart von RIBI Adjuvans (RIBI Corp., Hamilton, Montana). Die Maus-Seren werden anschließend durch herkömmliche Dotblot-Technik oder Antikörper-Capture (ABC) untersucht, um zu bestimmen, welches Tier die höchste Menge Antikörper produziert und wessen Milzzellen die besten Kandidaten für eine Fusion sind. Ungefähr 2 oder 3 Wochen später wird den Mäusen eine intravenöse Auffrischung der Polypeptide oder konjugierten Polypeptide gegeben, wie beispielsweise 3 µg suspendiert in sterilem PBS. Die Mäuse werden später getötet, und die Milzzellen werden nach etablierten Protokollen mit kommerziell verfügbaren Myelomzellen fusioniert, wie beispielsweise mit Ag8.653 (ATCC). Kurz gesagt werden die Myelomzellen einige Male in Medien gewaschen und mit Milzzellen der Maus fusioniert, wobei ein Verhältnis von etwa 3 Milzzellen pro 1 Myelomzelle verwendet wird. Das fusionierende Mittel kann jedes geeignete im Stand der Technik verwendete Mittel sein, beispielsweise Polyethylenglykol (PEG) oder mehr bevorzugt 50% PEG: 10% DMSO (Sigma). Die Fusion wird ausplattiert, beispielsweise auf 20 Platten mit flachem Boden und 96 Vertiefungen (Corning), die ein geeignetes Medium enthalten, wie beispielsweise HAT, welches mit DMEM-Medium supplementiert ist, und es wird ihr erlaubt, für 8 Tage zu wachsen. Die Überstände der resultierenden Hybridome werden gesammelt und z.B. für 60 Minuten zu einer Platte mit 96 Vertiefungen gegeben, die zunächst mit Ziege-anti-Maus-Ig beschichtet worden ist. Nach den Waschschritten werden ^{125}I-Polypeptid oder erfindungsgemäße Polypeptide in jede Vertiefung gegeben, für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und viermal gewaschen. Positive Vertiefungen können anschließend durch herkömmliche Verfahren detektiert werden, wie beispielsweise durch Audioradiographie bei –70°C unter Verwendung eines Kodak X-Omat S Films. Positive Klone können in größeren Kulturen angezüchtet werden, und die Überstände werden anschließend gereinigt, wie beispielsweise über eine Protein-A-Säule (Pharmacia). Es ist natürlich verständlich, dass zahlreiche Methoden angewendet werden können, um Antikörper gegen die erfindungsgemäßen Polypeptide und die fragmentierten Peptide zu erzeugen, und dass dies unter keinen Umständen den Umfang der Erfindung beschränkt.

[0125] Die monoklonalen Antikörper der vorliegenden Erfindung können unter Verwendung alternativer Methoden hergestellt werden, wie beispielsweise durch diejenigen, die von Alting-Mees et al., „Monoclonal Antibody Expression Libraries: A Rapid Alternative to Hybridomas", Strategies in Molecular Biology 3:1-9 (1990) beschrieben sind, das vorliegend durch Verweis eingeschlossen ist. Auf ähnliche Weise können unter Verwendung von rekombinanten DNA-Methoden Bindungspartner konstruiert werden, um die variablen Regionen eines Gens, das für einen spezifischen bindenden Antikörper kodiert, einzuschließen. Eine solche Methode wird in Larrick et al., Biotechnology, 7:394 (1989), beschrieben.

[0126] Andere Arten von "Antikörpern" können unter Verwendung der vorliegend bereitgestellten Informationen in Verbindung mit dem Standardwissen im Stand der Technik hergestellt werden. Beispielsweise sind Antikörper, die so konstruiert sind, dass sie Elemente humaner Antikörper enthalten, welche in der Lage sind, spezifisch die erfindungsgemäßen Polypeptide zu binden, ebenfalls von der Erfindung umfasst.

[0127] Sobald die Antikörper gegen die erfindungsgemäßen Polypeptide isoliert und gereinigt worden sind, können diese verwendet werden, um die Gegenwart der Polypeptide in einer Probe unter Verwendung etab-

lierter Assay-Protokolle zu detektieren. Darüber hinaus können die erfindungsgemäßen Antikörper therapeutisch oder für Forschungszwecke verwendet werden, um die Polypeptide zu binden und ihre Aktivität in vivo oder in vitro zu inhibieren.

[0128] Antikörper, die mit den erfindungsgemäßen Polypeptiden immunreaktiv sind, und insbesondere monoklonale Antikörper gegen diese Polypeptide werden nunmehr durch die Erfindung verfügbar gemacht. Solche Antikörper können für die Inhibierung der Polypeptidaktivität in vivo und für die Detektion des Vorhandenseins von erfindungsgemäßen Polypeptiden in einer Probe nützlich sein.

[0129] Gemäß einer weiteren Ausführungsform können Antikörper, die gegen ein erfindungsgemäßes Polypeptid und gegen erfindungsgemäße fragmentierte Peptide erzeugt worden sind, in Kombination mit den erfindungsgemäßen Molekulargewichtsmarkern verwendet werden, die aus den Polypeptiden oder den fragmentierten Peptiden bestehen, um die Genauigkeit bei der Verwendung dieser Molekulargewichtsmarker zur Bestimmung des apparenten Molekulargewichts und des isoelektrischen Punkts eines Proben-Proteins zu erhöhen. Die erfindungsgemäßen Molekulargewichtsmarker aus Polypeptiden oder fragmentierten Peptiden können mit einem molaren Überschuss eines Proben-Proteins gemischt werden, und die Mischung kann durch zweidimensionale Elektrophorese mittels herkömmlicher Verfahren aufgetrennt werden. Die Polypeptide können durch herkömmliche Verfahren auf eine geeignete Protein-Bindungsmembran, wie beispielsweise auf Nitrocellulose transferiert werden, und durch die erfindungsgemäßen Antikörper detektiert werden.

Wirkstoff-Entdeckung

[0130] Die erfindungsgemäßen, gereinigten Polypeptide werden die Entdeckung von Inhibitoren dieser Polypeptide ermöglichen. Die Verwendung eines erfindungsgemäßen, gereinigten Polypeptids beim Screening nach potentiellen Inhibitoren desselben ist wichtig und kann die Möglichkeit von interferierenden Reaktionen mit Kontaminanten beseitigen oder verringern.

[0131] Darüber hinaus können die erfindungsgemäßen Polypeptide für die strukturbasierte Gestaltung von Polypeptid-Inhibitoren verwendet werden. Eine solche strukturbasierte Gestaltung wird auch als "rational drug design" bezeichnet. Die Polypeptide können beispielsweise durch Röntgenkristallographie, kernmagnetische Resonanz oder durch Homologiemodellierung dreidimensional analysiert werden, wobei diese Verfahren hinreichend bekannt sind. Die Verwendung der strukturellen Informationen über das Polypeptid in Softwaresystemen zur molekularen Modellierung, die bei der Gestaltung von Inhibitoren und bei Inhibitor-Polypeptid-Interaktionen behilflich sind, ist ebenfalls von der vorliegenden Erfindung eingeschlossen. Eine solche computergestützte Modellierung und die Gestaltung von Wirkstoffen kann Informationen, wie die chemische Konformations-Analyse, das elektrostatische Potential der Moleküle, die Proteinfaltung usw., verwenden. Beispielsweise war der größte Teil der Gestaltung von klassenspezifischen Inhibitoren der Metalloproteasen auf Versuche gerichtet, dass katalytische Zinkatom zu chelatieren oder zu binden. Synthetische Inhibitoren werden üblicherweise so gestaltet, dass sie einen negativ geladenen Rest enthalten, an den eine Reihe von anderen Gruppen angeheftet wird, die so ausgestaltet sind, dass sie an die Spezifitätstaschen der jeweiligen Protease angepaßt sind. Ein bestimmtes Verfahren der vorliegenden Erfindung umfasst die Untersuchung der dreidimensionalen Struktur der erfindungsgemäßen Polypeptide auf wahrscheinliche Bindungsstellen von Substraten, die Synthese eines neuen Moleküls, das eine vorhergesagte reaktive Stelle aufweist, und die Überprüfung des neuen Moleküls, wie es oben beschrieben ist.

[0132] Die folgenden Beispiele werden aufgeführt, um ein umfassenderes Verständnis der Erfindung zu fördern.

Beispiel I

Isolierung und Identifizierung eines neuen humanen IL-1-Liganden

[0133] Wir haben eine humane genomische Phagen-Bibliothek (Stratagene Katalog # 946205) durch Screening untersucht, wobei eine Mischung von ^{32}P-markierten Einzelstrang-DNA-Sonden verwendet wurde, die der gesamten kodierenden Sequenz des Maus-IL-1-epsilon entsprachen. Nach Waschen bei geringer Stringenz (Waschen mit geringer Stringenz ist definiert als 0,2 × SSC/0,1 SDS, bei Raumtemperatur, Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Band 2, Seite 10.3, John Wiley & Sons, Inc., (1996)) wurde ein positiver Klon mit einem starken Hybridisierungssignal identifiziert. DNA, die ausgehend von diesem Klon hergestellt und einer Southern-Analyse unterzogen wurde, führte zur Identifikation eines SalI-Asp 718 Restriktionsfragments von 5,5 kB, das in pBluescript subkloniert und sequenziert wurde. Die Homologie-Analyse des 5,5

kB-Fragments unter Verwendung des UWGCG-Computerprogramms "bestfit" ergab, dass eine Region von 212 bp innerhalb des Klons auf der Nukleotidebene zu 74% mit dem 3'-Exon des Maus-IL-1-epsilons ähnlich war. Wie in Fig. 3 dargestellt ist, enthält diese 212 bp-Sequenz einen offenen Leserahmen von 70 Aminosäuren mit 66%iger Ähnlichkeit (64% Identität) zu dem 3'-Exon des Maus-IL-1-epsilon.

[0134] Die genomische Sequenz um den Locus des humanen IL-1-epsilon wurde unter Verwendung eines Genome Walking Kits (erhältlich von Clonetech) nach Anweisungen des Herstellers um weitere 5 kB in 5'-Richtung ausgedehnt. Die Analyse der Sequenz dieser stromaufwärts gelegenen Region ergab drei zusätzliche putative Exons. Es wurde eine RT-PCR verwendet, um die Expression dieser Exons zu bestätigen, und ihre Verknüpfung zu einer einzelnen IL-1-epsilon-cDNA wurde anhand von RNA aus vier verschiedenen humanen Gewebequellen bestätigt (Thymus, Mandel und die Zelllinien HL-60 und THP-1). Zusätzlich wurde ein cDNA-Klon aus dem Universal Human cDNA Library Array I von Stratagene erhalten, der ebenfalls die Verknüpfung der drei am nächsten zum 3'-Terminus gelegenen Exons zeigte. Der cDNA-Klon von dem Universal Human cDNA Library Array I war ein partieller Klon, der sich nicht bis zum 5'-Ende des offenen Leserahmens erstreckte. Die DNA-Sequenzen für das humane IL-1-epsilon vollständiger Länge sind in SEQ ID NO:7 und SEQ ID NO:12 offenbart. Die Polypeptide, die von SEQ ID NO:7 und SEQ ID NO:12 kodiert werden, sind in SEQ ID NO:8 bzw. SEQ ID NO:13 offenbart. Wie in Fig. 4 dargestellt ist, weisen die Aminosäuren 51-159 von SEQ ID NO:8 und SEQ ID NO:13 53% Ähnlichkeit (49% Identität) mit dem Maus-IL-1-epsilon (lange Form) auf.

Beispiel II

Chromosomenkartierung von humanem IL-1-epsilon durch Radiation-Hybrid-Kartierung

[0135] Die PCR wurde unter Verwendung des Whitehead Institut/MIT Center for Genome Research Genebridge4 panel aus 93 Radiation-Hybriden verwendet (http://www-genome.wi.mit.edu/ftp/distribution/human_STS_relea ses/july97/rhmap/genebridge4.html). Es wurden Primer verwendet, die innerhalb des putativen 3'-Exons des humanen IL-1-epsilon liegen und ein 195 bp-Produkt der humanen genomischen DNA amplifizieren, jedoch keine genomische DNA aus Hamster amplifizieren. Die Ergebnisse dieser PCRs wurden in einen Datenvektor umgewandelt, der an das Whitehead/MIT Radiation Mapping site im Internet (http://www-seq.wi.mit.edu) übermittelt wurde. Die Daten wurden abgeglichen, und es wurde die chromosomale Zuordnung und Lokalisierung relativ zu bekannten Sequence Tag Site (STS)-Markern in der Radiation-Hybridkarte bereitgestellt. Nach den Ergebnissen liegt das humane IL-1-epsilon auf Chromosom 2, bei 11,54 cR von STS D2S121 und 4,3 cR von dem Marker CHLC.GART11C03. Die folgende Website stellt zusätzliche Informationen über Radiation-Hybrid-Kartierung bereit: http://www-genome.wi.mit.edu/ftp/distribution/human_STS_releas es/july97/07-97.INTRO.html).

Beispiel III

Aktivierung von signalgebenden Molekülen in humanen Zellen durch humanes IL-1-epsilon

[0136] Im Folgenden werden Tests und Ergebnisse beschrieben, die durchgeführt wurden, um zu bestimmen, ob IL-1-epsilon in der Lage ist, einige derselben signalgebenden Moleküle zu aktivieren, die auch an Stress-Antworten beteiligt sind und durch IL-1α-, IL-1β und andere Entzündungs-Zytokine aktiviert werden.

[0137] Humanes IL-1-epsilon wurde in COS-1-Zellen transfiziert. Einige Tage nach der Transfektion wurde konditioniertes Medium (welches das transient exprimierte IL-1-epsilon enthielt) geerntet. Testzellen wurde mit dem konditionierten Medium inkubiert oder alternativ dazu mit konditioniertem Medium von den COS-1-Zellen, die mit dem leeren Expressionsvektor transfiziert worden waren. Ungefähr 10 Minuten nach der Inkubation wurden Zellextrakte aus den Testzellen hergestellt, und das Vorhandensein von aktivierten signalgebenden Molekülen wurde durch Verwenden von Antikörpern, die spezifisch für die phosphorylierten Formen von IKBα (Phosphorylierung am Ser32), p38-MAP-Kinase (Phosphorylierung an Thr180 und Tyr182) und Stressaktivierte Proteinkinase (SAPK/JNK) (Phosphorylierung am Thr183/Tyr185) sind, untersucht (die Antikörper wurden von New England Biolabs, Beverly, MA erhalten). Es ist bekannt, dass diese Signaltransduktionsmoleküle an einer großen Vielzahl von zellulären Antworten auf Stimuli, wie beispielsweise UV-Bestrahlung, Endotoxin und Entzündungs-Zytokine einschließlich IL-1β, beteiligt sind. Im Vergleich zu Kontrollen aus konditioniertem Medium aktivierte konditioniertes Medium, das humanes IL-1-epsilon enthielt, die Phosphorylierung von IKBα und p38-MAP-Kinase in mehreren der humanen Zelllinien, einschließlich in humanen Vorhaut-Fibroblasten und in umbilikal-venösen Endothelzellen (ATCC CRL-1730). In der Non-Hodgkin-Lymphomzelllinie K299 aktivierte humanes IL-1-epsilon spezifisch die JNK/SAPK-Phosphorylierung. Diese Ergebnisse zeigen, dass IL-1-epsilon an signalgebenden Wegen bei der Stress-Antwort beteiligt ist.

Beispiel IV

Gewebeverteilung von humanem IL-1-epsilon

[0138] Die Gewebeverteilung von humaner IL-1-epsilon-mRNA wurde unter Verwendung einer PCR-Amplifikation mit einer Gruppe von Erststrang-cDNA-Matrizen untersucht. Ein Clontech (Palo Alto, CA) Human Multiple Tissue cDNA Panel wurde unter Verwendung eines Vorwärtsprimers in Exon 2 und eines Rückwärtsprimers in Exon 4 durch Screening untersucht, wobei diese gemeinsam ein 450 bp-Fragment von IL-1-epsilon amplifizierten. Die PCR-Reaktion wurde mit 35 Zyklen bei einer Anlagerungstemperatur von 60°C durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel unter Verwendung von Ethidiumbromid detektiert.

[0139] Humane IL-1-epsilon-mRNA wurde in der Milz, den Lymphknoten, dem Thymus, der Mandel und in Leukozytengeweben gefunden. Das Gewebe mit den höchsten Mengen an humanem IL-1-epsilon-mRNA ist die Mandel.

Beispiel V

Aktivierung von ICMA-1-Mengen in humanen Zellen durch humanes IL-1-epsilon

[0140] Im Folgenden werden Tests und Ergebnisse beschrieben, die ausgeführt wurden, um zu bestimmen, ob IL-1-epsilon in der Lage ist, einige der gleichen Zelloberflächenmoleküle zu aktivieren, die an Stress-Antworten beteiligt sind und durch IL-1α, IL-1β und andere Entzündungs-Zytokine aktiviert werden.

[0141] Humanes IL-1-epsilon wurde in COS-1-Zellen transfiziert. Einige Tage nach der Transfektion wurde konditioniertes Medium (das transient exprimiertes IL-1-epsilon enthielt) geerntet.

[0142] Humane Vorhaut-Fibroblasten (human foreskin fibroblast (HFF))-Zellen wurden für 18 Stunden bei 37°C in diesem konditionierten Medium inkubiert, das 1 : 1 mit frischem, 0,5% Serum enthaltendem Medium verdünnt war, oder alternativ dazu mit konditioniertem Medium von Kontroll-COS-1-Zellen, die mit leeren Expressionsvektor transfiziert worden waren, 1 : 1 verdünnt mit frischem, 0,5% Serum enthaltendem Medium.

[0143] Nach der Behandlung mit dem konditionierten Medium von COS-1-Zellen wurden die HFF-Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit Versene (Nicht-Trypsin-Reagenz) aus den Gewebekulturgefäßen entfernt. Die Mengen an Zelloberflächen ICAM-1 wurden durch Färbung mit anti-CD54-PE-Antikörper (Pharmingen, San Diego, CA) auf Eis für 1 Stunde, gefolgt von Waschen und einer auf FACS basierenden Detektion gemessen.

[0144] Die HFF-Zellen, die in konditioniertem Medium von Kontroll-COS-Zellen inkubiert worden waren, zeigten relativ zu den unbehandelten Zellen ein leichtes Ansteigen der ICAM-1-Mengen. Auf der anderen Seite zeigten die HFF-Zellen, die mit konditioniertem Medium von COS-1-Zellen behandelt worden waren, welche mit IL-1-epsilon transfiziert worden waren, einen zweifachen Anstieg der Zelloberflächen-ICAM-1-Mengen. Die Menge der ICAM-1-Färbung, die bei den IL-1-epsilon-behandelten HFF-Zellen beobachtet wurde, war vergleichbar mit der, die bei denselben Zellen durch gereinigtes IL-1β induziert wird.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Sims, John E.

Smith, Dirk E.

<120> Human IL-1 Epsilon DNA and Polypeptides

<130> 03260.XXXX-00304

<140>

<141>

<150> 60/097,413

<151> 1998-08-21

<150> 60/098,595

<151> 1998-08-31

<150> 60/099,974

<151> 1998-09-11

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 297

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 1

atgttcagga tcttagtagt cgtgtgtgga tcctgcagaa caatatcctc actgcagtcc 60

caaggaaaga gcaaacagtt ccaggaaggg aacataatgg aaatgtacaa caaaaaggaa 120

cctgtaaaag cctctctctt ctatcacaag aagagtggta caacctctac atttgagtct 180

gcagccttcc ctggttggtt catcgctgtc tgctctaaag ggagctgccc actcattctg 240

acccaagaac tgggggaaat cttcatcact gacttcgaga tgattgtggt acattaa 297

<210> 2

<211> 98

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 2

Met Phe Arg Ile Leu Val Val Val Cys Gly Ser Cys Arg Thr Ile Ser

1 5 10 15

Ser Leu Gln Ser Gln Gly Lys Ser Lys Gln Phe Gln Glu Gly Asn Ile

20 25 30

Met Glu Met Tyr Asn Lys Lys Glu Pro Val Lys Ala Ser Leu Phe Tyr

35 40 45

His Lys Lys Ser Gly Thr Thr Ser Thr Phe Glu Ser Ala Ala Phe Pro

50 55 60

Gly Trp Phe Ile Ala Val Cys Ser Lys Gly Ser Cys Pro Leu Ile Leu

65 70 75 80

Thr Gln Glu Leu Gly Glu Ile Phe Ile Thr Asp Phe Glu Met Ile Val

85 90 95

Val His

<210> 3

<211> 174

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 3

atgttcagga tcttagtagt cgtgtgtgga tcctgcagaa caatatcctc actgcagtcc 60

caaggaaaga gcaaacagtt ccagtcacta ttaccttgct cccatgccaa tatctggaca 120

ctcttgagac gaacaggggg gatcccacgt acatgggagt gcaaaggccg atga 174

<210> 4

<211> 57

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 4

Met Phe Arg Ile Leu Val Val Val Cys Gly Ser Cys Arg Thr Ile Ser

1 5 10 15

Ser Leu Gln Ser Gln Gly Lys Ser Lys Gln Phe Gln Ser Leu Leu Pro

20 25 30

Cys Ser His Ala Asn Ile Trp Thr Leu Leu Arg Arg Thr Gly Gly Ile

35 40 45

Pro Arg Thr Trp Glu Cys Lys Gly Arg

50 55

<210> 5

<211> 213

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

gaaaaggata taatggattt gtacaaccaa cccgagcctg tgaagtcctt tctcttctac 60

cacagccaga gtggcaggaa ctccaccttc gagtctgtgg ctttccctgg ctggttcatc 120

gctgtcagct ctgaaggagg ctgtcctctc atccttaccc aagaactggg gaaagccaac 180

actactgact ttgggttaac tatgctgttt taa 213

<210> 6

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Glu Lys Asp Ile Met Asp Leu Tyr Asn Gln Pro Glu Pro Val Lys Ser

1 5 10 15

Phe Leu Phe Tyr His Ser Gln Ser Gly Arg Asn Ser Thr Phe Glu Ser

20 25 30

Val Ala Phe Pro Gly Trp Phe Ile Ala Val Ser Ser Glu Gly Gly Cys

35 40 45

Pro Leu Ile Leu Thr Gln Glu Leu Gly Lys Ala Asn Thr Thr Asp Phe

50 55 60

Gly Leu Thr Met Leu Phe

65 70

<210> 7

<211> 477

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

atggaaaaag cattgaaaat tgacacacct cagcagggga gcattcagga tatcaatcat 60

cgggtgtggg ttcttcagga ccagacgctc atagcagtcc cgaggaagga ccgtatgtct 120

ccagtcacta ttgccttaat ctcatgccga catgtggaga cccttgagaa agacagaggg 180

aaccccatct acctgggcct gaatggactc aatctctgcc tgatgtgtgc taaagtcggg 240

gaccagccca cactgcagct gaaggaaaag gatataatgg atttgtacaa ccaacccgag 300

cctgtgaagt cctttctctt ctaccacagc cagagtggca ggaactccac cttcgagtct 360

gtggctttcc ctggctggtt catcgctgtc agctctgaag gaggctgtcc tctcatcctt 420

acccaagaac tggggaaagc caacactact gactttgggt taactatgct gttttaa 477

<210> 8

<211> 158

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Glu Lys Ala Leu Lys Ile Asp Thr Pro Gln Gln Gly Ser Ile Gln
1 5 10 15

Asp Ile Asn His Arg Val Trp Val Leu Gln Asp Gln Thr Leu Ile Ala
20 25 30

Val Pro Arg Lys Asp Arg Met Ser Pro Val Thr Ile Ala Leu Ile Ser
35 40 45

Cys Arg His Val Glu Thr Leu Glu Lys Asp Arg Gly Asn Pro Ile Tyr
50 55 60

Leu Gly Leu Asn Gly Leu Asn Leu Cys Leu Met Cys Ala Lys Val Gly
65 70 75 80

Asp Gln Pro Thr Leu Gln Leu Lys Glu Lys Asp Ile Met Asp Leu Tyr
85 90 95

Asn Gln Pro Glu Pro Val Lys Ser Phe Leu Phe Tyr His Ser Gln Ser
100 105 110

Gly Arg Asn Ser Thr Phe Glu Ser Val Ala Phe Pro Gly Trp Phe Ile

115 120 125

Ala Val Ser Ser Glu Gly Gly Cys Pro Leu Ile Leu Thr Gln Glu Leu

130 135 140

Gly Lys Ala Asn Thr Thr Asp Phe Gly Leu Thr Met Leu Phe

145 150 155

<210> 9

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

His Val Glu Thr Leu Glu Lys Asp Arg Gly Asn Pro Ile Tyr Leu Gly

1 5 10 15

Leu Asn Gly Leu Asn Leu Cys Leu Met Cys Ala Lys Val Gly Asp Gln

20 25 30

Pro Thr Leu Gln Leu Lys Glu Lys Asp Ile Met Asp Leu Tyr Asn Gln

35 40 45

Pro Glu Pro Val Lys Ser Phe Leu Phe Tyr His Ser Gln Ser Gly Arg

50 55 60

Asn Ser Thr Phe Glu Ser Val Ala Phe Pro Gly Trp Phe Ile Ala Val

65 70 75 80

Ser Ser Glu Gly Gly Cys Pro Leu Ile Leu Thr Gln Glu Leu Gly Lys

85 90 95

Ala Asn Thr Thr Asp Phe Gly Leu Thr Met Leu Phe

100 105

--

<210> 10

<211> 69

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Glu Lys Asp Ile Met Asp Leu Tyr Asn Gln Pro Glu Pro Val Lys Ser

1 5 10 15

Phe Leu Phe Tyr His Ser Gln Ser Gly Arg Asn Ser Thr Phe Glu Ser

20 25 30

Val Ala Phe Pro Gly Trp Phe Ile Ala Val Ser Ser Glu Gly Gly Cys

35 40 45

Pro Leu Ile Leu Thr Gln Glu Leu Gly Lys Ala Asn Thr Thr Asp Phe

50 55 60

Gly Leu Thr Met Leu

65

<210> 11

<211> 77

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 11

Gln Gly Lys Ser Lys Gln Phe Gln Glu Gly Asn Ile Met Glu Met Tyr

1 5 10 15

Asn Lys Lys Glu Pro Val Lys Ala Ser Leu Phe Tyr His Lys Lys Ser

20 25 30

Gly Thr Thr Ser Thr Phe Glu Ser Ala Ala Phe Pro Gly Trp Phe Ile

35 40 45

Ala Val Cys Ser Lys Gly Ser Cys Pro Leu Ile Leu Thr Gln Glu Leu

50 55 60

Gly Glu Ile Phe Ile Thr Asp Phe Glu Met Ile Val Val

65 70 75

<210> 12

<211> 477

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

atggaaaaag cattgaaaat tgacacacct cagcggggga gcattcagga tatcaatcat 60

cgggtgtggg ttcttcagga ccagacgctc atagcagtcc cgaggaagga ccgtatgtct 120

ccagtcacta ttgccttaat ctcatgccga catgtggaga cccttgagaa agacagaggg 180

aaccccatct acctgggcct gaatggactc aatctctgcc tgatgtgtgc taaagtcggg 240

gaccagccca cactgcagct gaaggaaaag gatataatgg atttgtacaa ccaacccgag 300

cctgtgaagt cctttctctt ctaccacagc cagagtggca ggaactccac cttcgagtct 360

gtggctttcc ctggctggtt catcgctgtc agctctgaag gaggctgtcc tctcatcctt 420

acccaagaac tggggaaagc caacactact gactttgggt taactatgct gttttaa 477

<210> 13

<211> 158

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Glu Lys Ala Leu Lys Ile Asp Thr Pro Gln Arg Gly Ser Ile Gln

1 5 10 15

Asp Ile Asn His Arg Val Trp Val Leu Gln Asp Gln Thr Leu Ile Ala

20 25 30

Val Pro Arg Lys Asp Arg Met Ser Pro Val Thr Ile Ala Leu Ile Ser

35 40 45

Cys Arg His Val Glu Thr Leu Glu Lys Asp Arg Gly Asn Pro Ile Tyr

50 55 60

Leu Gly Leu Asn Gly Leu Asn Leu Cys Leu Met Cys Ala Lys Val Gly

65 70 75 80

Asp Gln Pro Thr Leu Gln Leu Lys Glu Lys Asp Ile Met Asp Leu Tyr

85 90 95

Asn Gln Pro Glu Pro Val Lys Ser Phe Leu Phe Tyr His Ser Gln Ser

100 105 110

Gly Arg Asn Ser Thr Phe Glu Ser Val Ala Phe Pro Gly Trp Phe Ile

115 120 125

Ala Val Ser Ser Glu Gly Gly Cys Pro Leu Ile Leu Thr Gln Glu Leu

130 135 140

Gly Lys Ala Asn Thr Thr Asp Phe Gly Leu Thr Met Leu Phe

145 150 155

Patentansprüche

1. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:
(a) einer DNA-Sequenz, welche die Nukleotidsequenz von SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 oder SEQ ID NO:12 umfasst;
(b) einem Nukleinsäuremolekül, das für eine Aminosäuresequenz kodiert, welche die Sequenz von SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 oder SEQ ID NO:13 umfasst, oder für eine Aminosäuresequenz kodiert, die mindestens 90% Homologie zu diesen Aminosäuresequenzen aufweist;
(c) einer DNA, die in der Lage ist, mit einer DNA von (a) unter moderat stringenten Bedingungen zu hybridisieren;
(d) DNA, die aufgrund des genetischen Codes in Bezug auf eine in (a) definierte DNA degeneriert ist; und
(e) Fragmenten von (a)
wobei die Nukleinsäure für ein Polypeptid kodiert, das in mehreren humanen Zellinien, einschließlich in Vorhaut-Fibroblasten und in humanen umbilikal-venösen Endothelzellen, die Phosphorylierung von IKB_{α} und p38-MAP-Kinase aktiviert.

2. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:
(a) einer DNA-Sequenz, welche die Nukleotidsequenz von SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 oder SEQ ID NO:12

umfasst; und
(b) einem Nukleinsäuremolekül, das für eine Aminosäuresequenz kodiert, welche die Sequenz von SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 oder SEQ ID NO:13 umfasst.

3. Rekombinanter Vektor, der die Expression des Nukleinsäuremoleküls nach Anspruch 1 oder 2 steuert.

4. Isoliertes Polypeptid, das von dem Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1 oder 2 kodiert wird.

5. Zusammensetzung, die ein Polypeptid nach Anspruch 4 und ein physiologisch akzeptables Verdünnungsmittel, einen Hilfsstoff oder einen Träger umfasst.

6. Isoliertes Polypeptid nach Anspruch 4 in nicht-glykosylierter Form.

7. Antikörper, der an ein Polypeptid nach Anspruch 4 bindet.

8. Antikörper nach Anspruch 7, wobei der Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist.

9. Isoliertes Polypeptid, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 oder SEQ ID NO:13 umfasst.

10. Isoliertes IL-1-epsilon-Polypeptid, das eine Aminosäuresequenz umfasst, welche mindestens zu 95% identisch mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 oder SEQ ID NO:13 ist.

11. Wirtszelle, die mit einem Vektor nach Anspruch 3 transfiziert oder transduziert ist.

12. Verfahren zur Herstellung eines IL-1-epsilon-Polypeptids, bei dem man eine Wirtszelle nach Anspruch 11 unter Bedingungen kultiviert, welche die Expression und Gewinnung des Polypeptids aus dem Kulturmedium fördern.

13. Verfahren nach Anspruch 12, bei dem die Wirtszelle ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus bakteriellen Zellen, Hefezellen, Pflanzenzellen und tierischen Zellen.

14. Verwendung eines Polypeptids nach Anspruch 4, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Stimulierung des Immunsystems eines immunsupprimierten Patienten.

15. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 5 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Stimulierung des Immunsystems eines immunsupprimierten Patienten.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Name: Humane IL-1-epsilon-DNA

Nukleotidsequenz:

GAAAAGGATA TAATGGATTT GTACAACCAA CCCGAGCCTG TGAAGTCCTT
TCTCTTCTAC CACAGCCAGA GTGGCAGGAA CTCCACCTTC GAGTCTGTGG
CTTTCCCTGG CTGGTTCATC GCTGTCAGCT CTGAAGGAGG CTGTCCTCTC
ATCCTTACCC AAGAACTGGG GAAAGCCAAC ACTACTGACT TTGGGTTAAC
TATGCTGTTT TAA
(SEQ ID NO:5)

ATGGAAAAAG CATTGAAAAT TGACACACCT CAGCAGGGGA GCATTCAGGA
TATCAATCAT CGGGTGTGGG TTCTTCAGGA CCAGACGCTC ATAGCAGTCC
CGAGGAAGGA CCGTATGTCT CCAGTCACTA TTGCCTTAAT CTCATGCCGA
CATGTGGAGA CCCTTGAGAA AGACAGAGGG AACCCCATCT ACCTGGGCCT
GAATGGACTC AATCTCTGCC TGATGTGTGC TAAAGTCGGG GACCAGCCCA
CACTGCAGCT GAAGGAAAAG GATATAATGG ATTTGTACAA CCAACCCGAG
CCTGTGAAGT CCTTTCTCTT CTACCACAGC CAGAGTGGCA GGAACTCCAC
CTTCGAGTCT GTGGCTTTCC CTGGCTGGTT CATCGCTGTC AGCTCTGAAG
GAGGCTGTCC TCTCATCCTT ACCCAAGAAC TGGGGAAAGC CAACACTACT
GACTTTGGGT TAACTATGCT GTTTTAA
(SEQ ID NO:7)

ATGGAAAAAG CATTGAAAAT TGACACACCT CAGCGGGGGA GCATTCAGGA
TATCAATCAT CGGGTGTGGG TTCTTCAGGA CCAGACGCTC ATAGCAGTCC
CGAGGAAGGA CCGTATGTCT CCAGTCACTA TTGCCTTAAT CTCATGCCGA
CATGTGGAGA CCCTTGAGAA AGACAGAGGG AACCCCATCT ACCTGGGCCT
GAATGGACTC AATCTCTGCC TGATGTGTGC TAAAGTCGGG GACCAGCCCA
CACTGCAGCT GAAGGAAAAG GATATAATGG ATTTGTACAA CCAACCCGAG
CCTGTGAAGT CCTTTCTCTT CTACCACAGC CAGAGTGGCA GGAACTCCAC
CTTCGAGTCT GTGGCTTTCC CTGGCTGGTT CATCGCTGTC AGCTCTGAAG
GAGGCTGTCC TCTCATCCTT ACCCAAGAAC TGGGGAAAGC CAACACTACT
GACTTTGGGT TAACTATGCT GTTTTAA
(SEQ ID NO:12)

FIGUR 1

Name: Humanes IL-1-epsilon-Polypeptid

Translation im relevanten Leserahmen (5' 3')

EKDIMDLYNQ PEPVKSFLFY HSQSGRNSTF ESVAFPGWFI AVSSEGGCPL
ILTQELGKAN TTDFGLTMLF *
(SEQ ID NO:6)

MEKALKIDTP QQGSIQDINH RVWVLQDQTL IAVPRKDRMS PVTIALISCR
HVETLEKDRG NPIYLGLNGL NLCLMCAKVG DQPTLQLKEK DIMDLYNQPE
PVKSFLFYHS QSGRNSTFES VAFPGWFIAV SSEGGCPLIL TQELGKANTT
DFGLTMLF*
(SEQ ID NO:8)

MEKALKIDTP QRGSIQDINH RVWVLQDQTL IAVPRKDRMS PVTIALISCR
HVETLEKDRG NPIYLGLNGL NLCLMCAKVG DQPTLQLKEK DIMDLYNQPE
PVKSFLFYHS QSGRNSTFES VAFPGWFIAV SSEGGCPLIL TQELGKANTT
DFGLTMLF*
(SEQ ID NO:13)

FIGUR 2

3'-Exon des humanen IL-1-epsilon (oben) vs. Maus-IL-1-epsilon (lange Form) (unten): (64% Identität)

```
 1 EKDIMDLYNQPEPVKSFLFYHSQSGRNSTFESVAFPGWFIAVSSEGGCPL 50
   |  .||::||.  ||||.  ||||  .||   ||.|||  |||||||||  |.|  |||
29 EGNIMEMYNKKEPVKASLFYHKKSGTTSTFESAAFPGWFIAVCSKGSCPL 78

51 ILTQELGKANTTDFGLTML 69  (SEQ ID NO: 10)
   |||||||.    |||  :  ..
79 ILTQELGEIFITDFEMIVV 97  (SEQ ID NO: 11)
```

FIGUR 3

Humanes IL-1-epsilon (Aminosäuren 51-159) (oben)

vs.

Maus-IL-1-epsilon (lange Form) (unten)

```
          .         .         .         .         .
 51 HVETLEKDRGNPIYLGLNGLNLCLMCAKVGDQ.PTLQLKEKDIMDLYNQP 99
               : .     |   . .  |  . | .| .||::||.
  1 ...........MFRILVVVCGSCRTISSLQSQGKSKQFQEGNIMEMYNKK 39
          .         .         .         .         .
100 EPVKSFLFYHSQSGRNSTFESVAFPGWFIAVSSEGGCPLILTQELGKANT 149
    ||||. |||| .||  ||||| ||||||||| |.| ||||||||||.
 40 EPVKASLFYHKKSGTTSTFESAAFPGWFIAVCSKGSCPLILTQELGEIFI 89
          .
150 TDFGLTMLF* 159     (SEQ ID NO:9)
    ||| : .. |
 90 TDFEMIVVH* 99      (SEQ ID NO:2)
```

(53% Ähnlichkeit, 49% Identität)

FIGUR 4