



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **329329**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C12N 15/24 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20000343	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1998.07.24 PCT/US1998/15423
(22)	Inng.dag	2000.01.24	(85)	Videreføringsdag	2000.01.24
(24)	Løpedag	1998.07.24	(30)	Prioritet	1997.07.25, US, 900905
(41)	Alm.tilgj	2000.03.24			
(45)	Meddelt	2010.09.27			
(73)	Innehaver	Schering Corp, 2000 Galloping Hill Road, US-NJ07033-0530 KENILWORTH, USA			
(72)	Oppfinner	J. Fernando Bazan, Menlo Park, CA, US-, USA			
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Isolert eller rekombinant polynukleotid, ekspresjonsvektor, vertscelle, fremgangsmåte for fremstilling av et polypeptid, antistoff- eller antigenbindende fragment derav, fremgangsmåte for anvendelse av antistoffet eller det antigenbindende fragment derav, sett, isolert polypeptid.		
(56)	Anførte publikasjoner	OPPMANN et al., Novel p19 Protein Engages IL-12p40 to Form a Cytokine, IL-23, with Biological Activities Similar as Well as Distinct from IL-12, Immunity, 2000, vol 13 (5), s. 715-725, CUA et al, Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain, Nature, 2003, vol 421, s. 744-748, MURPHY et al, Divergent Pro- and Antiinflammatory Roles for IL-23 and IL-12 in Joint Autoimmune Inflammation, J.Exp.Med., 2003, vol 198 (12), s. 1951-1957, Ito Y. et al., EMBL DATABASE ENTRY SSAB4061, ACCESSION NO AB0004061, Pig STAT2 cDNA, Takeda J., EMBL DATABASE ENTRY HSC3686, ACCESSION NO C06368, Human pancreatic islet cDNA, Hillier L. et al., EMBL DATABASE ENTRY HS1214377, ACCESSION NO AA418955, WashU-Merck EST Project 1997		
(57)	Sammendrag			

Rensede gener som koder for cytokin fra et pattedyr, reagenser relatert til disse, inkludert rensede proteiner, spesifikke antistoffer og nukleinsyrer som koder for dette molekyl. Metoder for anvendelse av reagensene og diagnostiske sett er også beskrevet.

Oppfinnelsens område

Foreliggende oppfinnelse angår isolert eller rekombinant polynukleotid, ekspresjonsvektor, vertscelle, fremgangsmåte for fremstilling av et polypeptid, antistoff-
 5 eller antigenbindende fragment derav, fremgangsmåte for anvendelse av antistoffet eller det antigenbindende fragment derav, sett, isolert polypeptid.

Oppfinnelsens bakgrunn

10 Rekombinant DNA-teknologi refererer generelt til teknikken med integrering av genetisk informasjon fra en donorkilde i vektorer for etterfølgende bearbeidelse, slik som gjennom innføring i en vert, hvorved den overførte genetiske informasjon kopieres og/eller uttrykkes i det nye miljø.
 15 Vanligvis eksisterer den genetiske informasjon i form av komplementært DNA (cDNA) avledet fra messenger-RNA (mRNA) som koder for et ønsket proteinprodukt. Bæreren er ofte et plasmid med kapasitet til å inkorporere cDNA for senere replikasjon i en vert, og i noen tilfeller i realiteten for å kontrollere
 20 ekspresjon av cDNA og derved direkte syntese av det kodete produkt i verten.

I noen tid har det vært kjent at immunresponsen hos pattedyr er basert på en serie av komplekse cellulære interaksjoner betegnet "immunnettverket". Nylig forskning har gitt
 25 ny innsikt i dette nettverkets indre arbeidsmåte. Selv om det fremdeles er klart at mye av responsene i realiteten kretser rundt de nettverkslignende interaksjoner mellom lymfocytter, makrofager, granulocytter og andre celler, er immunologer nå vanligvis av den oppfatning at oppløselige proteiner, kjent
 30 som lymfokiner, cytokiner eller monokiner, spiller en kritisk rolle ved kontrollering av disse cellulære interaksjoner. Det er således betydelig interesse for isolering, karakterisering og virkningsmekanismer av celledulerende faktorer, og en forståelse av disse vil føre til betydelige fremskritt for
 35 diagnose og terapi av et stort antall medisinske abnormiteter, f.eks. immunsystemforstyrrelser. Noen av disse faktorer er hematopoetiske vekstfaktorer, f.eks. granulocyttkolonistimulerende faktor (G-CSF). Se f.eks. Thomson (1994; red.), The Cytokine Handbook (2. utg.), Academic Press, San Diego;

Metcalfe og Nicola (1995), *The Hematopoietic Colony Stimulating Factors*, Cambridge University Press; og Aggarwal og Gutterman (1991), *Human Cytokines* Blackwell Pub.

Lymfokiner formidler åpenbart cellulære aktiviteter på mange forskjellige måter. De er blitt vist å understøtte proliferasjon, vekst og differensiering av pluripotensielle hematopoetiske stamceller til enorme antall forløperceller som omfatter diverse cellelinjer som utgjør et komplekst immunsystem. Riktige og balanserte interaksjoner mellom de cellulære komponenter er nødvendig for en sunn immunrespons. De forskjellige cellelinjer reagerer ofte på forskjellig måte når lymfokiner administreres i forbindelse med andre midler.

Cellelinjer som er spesielt viktige for immunresponsen, inkluderer to klasser av lymfocytter: B-celler som kan produsere og utskille immunglobuliner (proteiner med evne til å gjenkjenne og bindes til fremmed materiale for å bevirke fjerning av materialet), og T-celler av forskjellige undergrupper som utskiller lymfokiner og induserer eller undertrykker B-cellene og forskjellige andre celler (inkludert andre T-celler) som utgjør immunnettverket. Disse lymfocytter reagerer med mange andre celletyper.

En annen viktig cellelinje er mastceller (som ikke er blitt positivt identifisert i alle pattedyrarter), som er granulinneholdende bindevevsceller lokalisert proksimalt for kapillarer gjennom hele kroppen. Disse celler er funnet i spesielt høye konsentrasjoner i lungene, huden og gastrointestinal- og genitallurinkanale. Mastceller spiller en sentral rolle ved allergirelaterte forstyrrelser, spesielt anafylakse, som følger: Når utvalgte antigener kryssbinder en klasse av immunglobuliner bundet til reseptorer på mastcelleoverflaten, degranuleres mastcellen og frigjør mediatorer, f.eks. histamin, serotonin, heparin og prostaglandiner, som forårsaker allergiske reaksjoner, f.eks. anafylakse.

Forskning for bedre å forstå og behandle forskjellige immunforstyrrelser er blitt hindret ved at det generelt ikke har vært mulig å opprettholde celler fra immunsystemet *in vitro*. Immunologer har oppdaget at dyrkning av disse celler kan oppnås ved anvendelse av T-celle- og andre cellesuper-

natanter som inneholder forskjellige vekstfaktorer, inkludert mange av lymfokinene.

Fra det ovenstående fremgår det at oppdagelsen og utviklingen av nye lymfokiner, f.eks. beslektet med G-CSF
 5 og/eller IL-6, kunne bidra til nye terapier for et bredt område av degenerative eller unormale tilstander som direkte eller indirekte involverer immunsystemet og/eller hematopoetiske celler. Nærmere bestemt ville oppdagelsen og utviklingen av lymfokiner som forhøyer eller potencierer de fordel-
 10 aktige aktiviteter av kjente lymfokiner, være ytterst fordelaktig. Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer nye interleukinpreparater og beslektede forbindelser og metoder for anvendelse av disse.

15 Oppsummering av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse omfatter isolert eller rekombinant polynukleotid, kjennetegnet ved at det koder for et modent polypeptid utvalgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 2, 4 og 5.

20 Også omfattet av oppfinnelsen er ekspresjonsvektor, kjennetegnet ved at den omfatter polynukleotidet ifølge oppfinnelsen.

Oppfinnelsen omfatter også vertscelle, kjennetegnet ved at den inneholder ekspresjonsvektoren ifølge oppfinnelsen.

25 Videre omfatter oppfinnelsen fremgangsmåte for fremstilling av et polypeptid, kjennetegnet ved at den omfatter ekspresjon av et rekombinant polynukleotid ifølge oppfinnelsen.

Oppfinnelsen omfatter også antistoff- eller antigen-
 30 bindende fragment derav, kjennetegnet ved at det spesifikt bindes til et polypeptid med en aminosyresekvens bestående av den modne aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO: 2, 4 eller 5.

Også omfattet av oppfinnelsen er fremgangsmåte for anvendelse av antistoffet eller det antigenbindende fragment
 35 derav ifølge oppfinnelsen, kjennetegnet ved at den omfatter at antistoffet eller det antigenbindende fragment derav bringes i kontakt med en biologisk prøve som omfatter et antigen, idet denne kontakt resulterer i dannelselse av et antistoff:antigenkompleks eller et antigenbindende fragment:antigenkompleks.

Videre omfatter oppfinnelsen sett, kjennetegnet ved at det omfatter antistoffet eller det antigenbindende fragment derav ifølge oppfinnelsen, og

- a) instruksjonsmateriale for anvendelse av antistoffet eller det antigenbindende fragment derav for nevnte påvisning; eller
- b) et rom som tilveiebringer atskillelse av antistoffet eller det antigenbindende fragment derav.

Til slutt omfatter oppfinnelsen isolert polypeptid, kjennetegnet ved at det omfatter et modent polypeptid ifølge SEQ ID NO: 2, 4 eller 5.

Oppfinnelsen angår interleukin-B30 (IL-B30) fra pattedyr, f.eks. gnagere, hunder, katter, primater, og dets biologiske aktiviteter. Den inkluderer nukleinsyrer som koder for selve polypeptidene og fremgangsmåter for fremstilling og anvendelse av disse. Nukleinsyrene ifølge oppfinnelsen er delvis karakterisert ved deres homologi med klonede komplementære DNA(cDNA)-sekvenser beskrevet heri, og/eller ved funksjonelle analyser for vekstfaktor- eller cytokinlignende aktiviteter, f.eks. G-CSF (se Nagata (1994) i Thomson, The Cytokine Handbook, 2. utg., Academic Press, San Diego), og/eller IL-6 (se Hirano (1994) i Thomson, The Cytokine Handbook, 2. utg., Academic Press, San Diego), anvendt på polypeptidene som typisk blir kodet for av disse nukleinsyrer. Metoder for modulering av eller intervensjon i kontrollen av en vekstfaktoravhengig fysiologi eller en immunrespons er beskrevet.

Oppfinnelsen er delvis basert på oppdagelsen av en ny cytokinsekvens som oppviser betydelig sekvens- og strukturell likhet med G-CSF og IL-6. Oppfinnelsen tilveiebringer spesielt et primatgen, f.eks. et humant gen, som koder for et protein hvis modne størrelse er ca. 168 aminosyrer, og grise- og musesekvenser. Funksjonelle ekvivalenter som oppviser signifikant sekvenshomologi, vil være tilgjengelige fra andre pattedyrarter, f.eks. ku, hest og rotte, og ikke-pattedyrarter.

I forskjellige proteinutførelsesformer beskrives: et vesentlig rent eller rekombinant IL-B30-protein eller peptid som oppviser minst ca. 85 % sekvensidentitet i en lengde på

ca. minst 12 aminosyrer med SEQ ID NO: 2; en naturlig sekvens IL-B30 av SEQ ID NO: 2; og et fusjonsprotein som omfatter IL-B30-sekvens. I visse utførelsesformer er homologien minst ca. 90 % identitet, og området er minst ca. 9 aminosyrer;

5 homologien er minst ca. 80 % identitet, og området er minst ca. 17 aminosyrer; eller homologien er minst ca. 70 % identitet, og området er minst ca. 25 aminosyrer. I andre utførelsesformer omfatter IL-B30 en moden sekvens ifølge tabell 1; eller oppviser et posttranslasjonelt modifikasjonsmønster forskjellig fra naturlig IL-B30; eller proteinet eller peptidet er fra et varmblodig dyr utvalgt fra et pattedyr, inkludert en primat; omfatter minst ett polypeptidsegment med SEQ ID NO: 2; oppviser mange forskjellige deler med identiteten; er en naturlig allel variant av IL-B30; har

10 en lengde på minst ca. 30 aminosyrer; oppviser minst to ikke-overlappende epitoper som er spesifikke for et pattedyr-IL-B30; oppviser en sekvensidentitet på minst 90 % i en lengde på minst ca. 20 aminosyrer med pattedyr-ILB30; er glykosylert; har en molekylvekt på minst 10 kD med naturlig glykosylering;

20 er et syntetisk polypeptid; er festet til et fast substrat; er konjugert til en annen kjemisk komponent; er substituert fem ganger eller mindre i forhold til en naturlig sekvens; eller er en delesjons- eller innføylesvariant av en naturlig sekvens. Foretrukne utførelsesformer inkluderer et preparat

25 som omfatter: et sterilt IL-B30-protein eller peptid; eller IL-B30-proteinet eller peptidet og en bærer, der bæreren er: en vandig forbindelse, inkludert vann, fysiologisk saltvann og/eller buffer; og/eller formulert for oral, rektal, nasal, topisk eller parenteral administrering. I fusjonsprotein-

30 utførelsesformer kan proteinet ha: en moden proteinsekvens ifølge tabell 1; en påvisnings- eller rensingsmarkør, inkludert en FLAG-, His6- eller Ig-sekvens; og/eller sekvensen til et annet cytokin eller kjemokin.

Utførelsesformer i form av sett inkluderer dem med

35 IL-B30-protein eller polypeptid og: en beholder som inneholder proteinet eller polypeptidet; og/eller instruksjoner for anvendelse eller fjerning av reagenser i settet.

I bindingsforbindelsesutførelsesformer kan forbindelsen ha et antigenbindingssete fra et antistoff som spesifikt

bindes til et naturlig IL-B30-protein, hvori: IL-B30 er et pattedyrprotein; bindingsforbindelsen er et Fv-, Fab- eller Fab2-fragment; bindingsforbindelsen er konjugert til en annen kjemisk komponent; eller antistoffet er dannet mot en peptidsekvens av et modent polypeptid ifølge tabell 1; er dannet mot et modent IL-B30; er dannet mot et rensset gnager-IL-B30; er immunutvalgt; er et polyklonalt antistoff; bindes til et denaturert IL-B30; oppviser en kD på minst 30 μ M; er festet til et fast substrat, inkludert en kule eller plastmembran; fore-

10 ligger i et sterilt preparat; eller er påvisbart merket, inkludert en radioaktiv eller fluorescerende markør. Sett inneholdende bindingsforbindelser inkluderer dem med: en beholder som inneholder bindingsforbindelsen; og/eller instruksjoner for anvendelse eller fjerning av reagenser i settet.

15 Settet er ofte i stand til å gjøre en kvalitativ eller kvantitativ analyse. Foretrukne preparater vil omfatte: en steril bindingsforbindelse; eller bindingsforbindelsen og en bærer, der bæreren er: en vandig forbindelse, inkludert vann, fysiologisk saltvann og/eller buffer; og/eller formulert for oral, rektal, nasal, topisk eller parenteral administrering.

Nukleinsyreutførelsesformer inkluderer en isolert eller rekombinant nukleinsyre som koder for et IL-B30-protein eller peptid eller fusjonsprotein, hvori: IL-B30 er fra et pattedyr; og/eller nukleinsyren: koder for en antigen peptidsekvens ifølge tabell 1; koder for mange forskjellige antigen-peptidsekvenser ifølge tabell 1; oppviser minst ca. 80 % identitet med et naturlig cDNA som koder for segmentet; er en ekspresjonsvektor; omfatter ytterligere et replikasjonsstartområde; er fra en naturlig kilde; omfatter en påvisbar markør;

25 omfatter en syntetisk nukleotidsekvens; er mindre enn 6 kb, fortrinnsvis mindre enn 3 kb; er fra et pattedyr, inkludert en primat; omfatter en naturlig, fullengdet kodingssekvens; er en hybridiseringsprobe for et gen som koder for IL-B30; eller er en PCR-primer, et PCR-produkt eller en mutageneseprimer. Opp-

30 finnelsen tilveiebringer også en celle, et vev eller et organ som omfatter en slik rekombinant nukleinsyre, og fortrinnsvis vil cellen være: en prokaryot celle; en eukaryot celle; en bakteriecelle; en gjærcelle; en insektcelle; en pattedyrcelle; en musecelle; en primatcelle; eller en menneskecelle.

Utførelsesformer i form av sett inkluderer dem med en slik nukleinsyre og: en beholder som inneholder nukleinsyren; en beholder som ytterligere inneholder IL-B30-proteinet eller polypeptidet; og/eller instruksjoner for anvendelse eller
 5 fjerning av reagenser i settet. Settet er typisk i stand til å gjøre en kvalitativ eller kvantitativ analyse.

I visse utførelsesformer vil nukleinsyren: hybridisere under vaskebetingelser på 30 °C og mindre enn 2 M salt, eller 45 °C og/eller 500 mM salt, eller 55 °C og/eller 150 nM
 10 salt, med SEQ ID NO: 1; eller oppviser minst ca. 85 % identitet, og/eller strekningen er minst ca. 30 nukleotider, eller oppviser minst 90 % identitet, og/eller strekningen er minst 55 nukleotider, eller oppviser minst 95 % identitet, og/eller strekningen er minst 75 nukleotider, med et primat-IL-B30.

15 Oppfinnelsen omfatter en metode for modulering av fysiologi eller utvikling av en celle eller vevskulturceller, omfattende at cellene bringes i kontakt med en agonist eller antagonist av et pattedyr-IL-B30. Metoden kan gå ut på at: kontaktreaksjonen utføres i kombinasjon med en agonist eller
 20 antagonist av G-CSF og/eller IL-6; eller kontaktreaksjonen utføres med en agonist, inkludert et bindingspreparat som omfatter et antistoffbindingssete som spesifikt binder et IL-B30.

25 Detaljert beskrivelse av de foretrukne utførelsesformer

I. Generelt

Det tilveiebringes aminosyresekvenser og DNA-sekvenser som koder for forskjellige pattedyrproteiner som er
 30 cytokiner, f.eks. som er utskilte molekyler som kan formidle et signal mellom immunceller og andre celler. Se f.eks. Paul (1994), Fundamental Immunology (3. utg.), Raven Press, N.Y. De fullengdede cytokiner og fragmenter eller antagonister vil være anvendelige ved fysiologisk modulering av celler som
 35 uttrykker en reseptor. Det er sannsynlig at IL-B30 enten har stimulatoriske eller inhibitoriske effekter på hematopoetiske celler, inkludert f.eks. lymfoidceller, slik som T-celler, B-celler, naturlige dreper(NK)celler, makrofager, dendrittceller, hematopoetiske forløperceller etc. Proteinene vil også

være anvendelige som antigener, f.eks. immunogener, for frembringelse av antistoffer mot forskjellige epitoper på proteinet, både lineære og konformasjonelle epitoper.

Et cDNA som koder for IL-B30, ble identifisert fra en human cellelinje. Molekylet ble betegnet huIL-B30. Et beslektet gen som tilsvarende en grisesekvens, ble også identifisert. En gnagersekvens, f.eks. fra mus, er også beskrevet.

Det humane gen koder for et lite, oppløselig, cytokinlignende protein på ca. 168 aminosyrer. Signalsekvensen er antakeligvis ca. 21 rester og vil løpe fra Met til ca. Ala. Se tabell 1 og SEQ ID NO: 1 og 2. IL-B30 oppviser strukturelle motiver som er karakteristiske for et medlem av de langkjedete cytokiner. Sammenlign f.eks. IL-B30, G-CSF og IL-6, sekvenser tilgjengelige fra GenBank. Se også tabell 2.

15

Tabell 1

Nukleinsyre (SEQ ID NO: 1) som koder for IL-B30 fra en primat, f.eks. et menneske. Translatert aminosyresekvens er SEQ ID NO: 2

ATG CTG GGG AGC AGA GCT GTA ATG CTG CTG TTG CTG CTG CCC TGG ACA
48

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

GCT CAG GGC AGA GCT GTG CCT GGG GGC AGC AGC CCT GCC TGG ACT CAG
96

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

TGC CAG CAG CTT TCA CAG AAG CTC TGC ACA CTG GCC TGG AGT GCA CAT
144

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

CCA CTA GTG GGA CAC ATG GAT CTA AGA GAA GAG GGA GAT GAA GAG ACT
192

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

ACA AAT GAT GTT CCC CAT ATC CAG TGT GGA GAT GGC TGT GAC CCC CAA
240

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

GGA CTC AGG GAC AAC AGT CAG TTC TGC TTG CAA AGG ATC CAC CAG GGT
288

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

CTG ATT TTT TAT GAG AAG CTG CTA GGA TCG GAT ATT TTC ACA GGG GAG
336

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

CCT TCT CTG CTC CCT GAT AGC CCT GTG GCG CAG CTT CAT GCC TCC CTA
384

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

CTG GGC CTC AGC CAA CTC CTG CAG CCT GAG GGT CAC CAC TGG GAG ACT
432

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

CAG CAG ATT CCA AGC CTC AGT CCC AGC CAG CCA TGG CAG CGT CTC CTT
480

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

CTC CGC TTC AAA ATC CTT CGC AGC CTC CAG GCC TTT GTG GCT GTA GCC
528

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

GCC CGG GTC TTT GCC CAT GGA GCA GCA ACC CTG AGT CCC TAA
570

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

coding sequence:

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

Rodent, e.g., mouse, IL-B30 (SEQ ID NO: 3 and 4):

CGCTTAGAAG TCGGACTACA GAGTTAGACT CAGAACCAAA GGAGGTGGAT AGGGGGTCCA	60
CAGGCCTGGT GCAGATCACA GAGCCAGCCA GATCTGAGAA GCAGGGAACA AG ATG	115
	Met
	-21
CTG GAT TGC AGA GCA GTA ATA ATG CTA TGG CTG TTG CCC TGG GTC ACT	163
Leu Asp Cys Arg Ala Val Ile Met Leu Trp Leu Leu Pro Trp Val Thr	
-20 -15 -10 -5	
CAG GGC CTG GCT GTG CCT AGG AGT AGC AGT CCT GAC TGG GCT CAG TGC	211
Gln Gly Leu Ala Val Pro Arg Ser Ser Ser Pro Asp Trp Ala Gln Cys	
1 5 10	
CAG CAG CTC TCT CGG AAT CTC TGG ATG CTA GCC TGG AAC GCA CAT GCA	259
Gln Gln Leu Ser Arg Asn Leu Cys Met Leu Ala Trp Asn Ala His Ala	
15 20 25	
CCA GCG GGA CAT ATG AAT CTA CTA AGA GAA GAA GAG GAT GAA GAG ACT	307
Pro Ala Gly His Met Asn Leu Leu Arg Glu Glu Glu Asp Glu Glu Thr	
30 35 40	
AAA AAT AAT GTG CCC CGT ATC CAG TGT GAA GAT GGT TGT GAC CCA CAA	355
Lys Asn Asn Val Pro Arg Ile Gln Cys Glu Asp Gly Cys Asp Pro Gln	
45 50 55 60	
GGA CTC AAG GAC AAC AGC CAG TTC TGC TTG CAA AGG ATC CGC CAA GGT	403
Gly Leu Lys Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile Arg Gln Gly	
65 70 75	
CTG GCT TTT TAT AAG CAC CTG CTT GAC TCT GAC ATC TTC AAA GGG GAG	451
Leu Ala Phe Tyr Lys His Leu Leu Asp Ser Asp Ile Phe Lys Gly Glu	
80 85 90	
CCT GCT CTA CTC CCT GAT AGC CCC ATG GAG CAA CTT CAC ACC TCC CTA	499
Pro Ala Leu Leu Pro Asp Ser Pro Met Glu Gln Leu His Thr Ser Leu	
95 100 105	
CTA GGA CTC AGC CAA CTC CTC CAG CCA GAG GAT CAC CCC CGG GAG ACC	547
Leu Gly Leu Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Asp His Pro Arg Glu Thr	
110 115 120	
CAA CAG ATG CCC AGC CTG AGT TCT AGT CAG CAG TGG CAG CGC CCC CTT	595
Gln Gln Met Pro Ser Leu Ser Ser Ser Gln Gln Trp Gln Arg Pro Leu	
125 130 135 140	
CTC CGT TCC AAG ATC CTT CGA AGC CTC CAG GCC TTT TTG GCC ATA GCT	643
Leu Arg Ser Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Leu Ala Ile Ala	
145 150 155	
GCC CGG GTC TTT GCC CAC GGA GCA GCA ACT CTG ACT GAG CCC TTA GTG	691
Ala Arg Val Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Thr Glu Pro Leu Val	
160 165 170	
CCA ACA GCT TAAGGATGCC CAGGTTCCCA TGGCTACCAT GATAAGACTA	740
Pro Thr Ala	
175	

```

ATCTATCAGC CCAGACATCT ACCAGTTAAT TAACCCATTA GGACTTGTGC TGTTCCTGTT      800
TCGTTTGT TT TGCCTGAAGG GCAAGGACAC CATTATTAAG GAGAAAAGAA ACAAACCCCA      860
GAGCAGGCAG CTGGCTAGAG AAAGGAGCTG GAGAAGAAGA ATAAAGTCTC GAGCCCTTGG      920
5 CCTTGAAGC GGGCAAGCAG CTGCGTGGCC TGAGGGGAAG GGGGCGGTGG CATCGAGAAA      980
CTGTGAGAAA ACCCAGAGCA TCAGAAAAAG TGAGCCCAGG CTTTGGCCAT TATCTGTAAG     1040
AAAAACAAGA AAAGGGGAAC ATTATACTTT CCTGGGTGGC TCAGGGAAAT GTGCAGATGC     1100
ACAGTACTCC AGACAGCAGC TCTGTACCTG CCTGCTCTGT CCCTCAGTTC TAACAGAATC     1160
10 TAGTCACTAA GAACTAACAG GACTACCAAT ACGAACTGAC AAA                       1203

```

Tabell 2

Sammenligning av forskjellige IL-6- og G-CSF-utførelsesformer sammenlignet med IL-B30. Humant IL-B30 er SEQ ID NO: 2; muse-IL-B30 er SEQ ID NO: 4; grise-IL-B30 er SEQ ID NO: 5; bovint G-CSF er SEQ ID NO: 6; katte-G-CSF er SEQ ID NO: 7; humant G-CSF er SEQ ID NO: 8; muse-G-CSF er SEQ ID NO: 9; oter-IL-6 er SEQ ID NO: 10; katte-IL-6 er SEQ ID NO: 11; humant IL-6 er SEQ ID NO: 12; saue-IL-6 er SEQ ID NO: 13; muse-IL-6 er SEQ ID NO: 14; kylling-MGF er SEQ ID NO: 15; og KSHV, Kaposi sarkom-herpesvirus, et virus-IL-6, er SEQ ID NO: 16

```

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

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

```

```

1130_human IFYEKLLGSD IFTGE . . . . .PSLLPDSPV AQLHASLLGL SQLLQPE..G
1130_mouse AFYKHLLDSD IFKGE . . . . .PALLPDSPM EQLHTSLLGL SQLLQPE..D
1130_pig VFYEKLLGSD IFTGE . . . . .PSLHPDGSV GQLHASLLGL RQLLQPE..G
gcsf_bovin FLYQGLLOAL AGIS . . . . .PELAPTLDT LQLDVTDFAT NIWLQMEDLG
gcsf_felca FLYQGLLOAL AGIS . . . . .PELAPTLDM LQLDITDFAI NIWQQMEDVG
gcsf_human FLYQGLLOAL EGIS . . . . .PELGPTLDT LQLDVADFAT TIWQQMEELG
5 gcsf_mouse CLYQGLLOAL SGIS . . . . .PALAPTLDL LQLDVANFAT TIWQQMENLG
116_otter QEFQIHLKYL ESNYEG . . . . .KCNASHSVYIS TKHLLQTLRP M..NQIEVTT
116_felca QEFQIHLKYL QDKYEG . . . . .KENAKSVYTS TNVLLQMLKR KGKNQDEVTI
116_human LEFEVYLEYL QNRFES . . . . .EEQARAVQMS TKVLIQFLQK KAKNLDAITT
116_sheep LEYQIYLDL QNEFEG . . . . .QETVMELQSS IRTLIQILKE KIAGL....I
116_mouse LEYHSYLEYL KNNLKDNL . . . . .KDKARVLQRD TETLIHIFNQ EVKDLHKIVL
mgf_chick HAYHDSLGAV LRLLP . . . . .NHTTLVET LQLDAANLSS NIQQQMEDLG
116_khsv FEFEVLFKFL TTEFGKSVIN VDMELLTKT LGWDIQEELN KLTKTHY..S

10 1130_human HHWETQQIP . . . . .SLSPSQ..P WQRLLLRFKI LRSLQAFVAV AARVFAHGAA
1130_mouse HPRETQQMP . . . . .SLSSSQ..Q WQRPLLRSKI LRSLQAFVAV AARVFAHGAA
1130_pig HHWETEQTP . . . . .SPSPSQ..P WQRLLLRLKI LRSLQAFVAV AARVFAHGAA
gcsf_bovin AAPAVQPTQ . . . . .GAMPTFTSA FQRRAGGVLV ASQLHRFLEL AYRGLRYLAE
gcsf_felca MAPAVPPTQ . . . . .GTMPFTSA FQRRAGGTLV ASNLSQFLEV AYRALRHFTK
gcsf_human MAPALQPTQ . . . . .GAMPAFASA FQRRAGGVLV ASHLQSFLEV SYRVLRHLAG
gcsf_mouse VAPTVOPTQ . . . . .SAMPFTSA FQRRAGGVLV ISYLGQFLET ARLALHHLA
116_otter PDPTTDASL . . . . .QALFKSQDK WLKHTTIHLI LRRLEDFLQF SLRAIRIM..
15 116_felca PVPTVEVGL . . . . .QLSCSHR.R VAEAHNNHLT LRRLEDFLQF RLRAVRIM..
116_human PDPTTNASL . . . . .LTKLQAQNG WLQDMTTHLI LRSFKEFLQS SLRALRQM..
116_sheep TTPATHTDM . . . . .LEKMQSSNE WVKNAKVIII LRSLENFLQF SLRAIRMK..
116_mouse PTPISNALL . . . . .TDKLESQKE WLRTKTIQFI LKSLEEFLKV TLRSTRQT..
mgf_chick LDTVTLPAEQ RSPPTFTSGP FQQQVGFFI LANFORFLET AYRALRHLAR
116_khsv P.PKFDGR.. LLGRLQGLKY WVRHFASFVY LSAMEKFAGQ AVRVLDSIPD

1130_human TLSP....
20 1130_mouse TLTEPLVPTA
1130_pig TLSQ....
gcsf_bovin P.....
gcsf_felca P.....
gcsf_human P.....
gcsf_mouse .....
116_otter .....
116_felca .....
25 116_human .....
116_sheep .....
116_mouse .....
mgf_chick L.....
116_khsv VTPDVHDK

```

Den strukturelle homologi av IL-B30 med beslektede
 30 cytokinproteiner antyder beslektet funksjon for dette molekyl.
 IL-B30 er et langkjedet cytokin som oppviser sekvenslikhet med
 IL-6 og G-CSF.

IL-B30-agonister eller -antagonister kan også virke
 som funksjonelle eller reseptorantagonister, f.eks. som
 35 blokkerer IL-6- eller G-CSF-binding til deres respektive
 reseptorer, eller formidler de motsatte virkninger. IL-B30
 eller dets antagonister kan således være anvendelig ved be-
 handling av unormale medisinske tilstander, inkludert immun-
 forstyrrelser, f.eks. T-celleimmunmangler, kronisk inflamma-

sjon eller vevsavstøtning, eller ved kardiovaskulære eller neurofysiologiske tilstander.

De naturlige antigener er i stand til å formidle forskjellige biokjemiske responser som fører til biologiske eller fysiologiske responser i målceller. Den foretrukne utførelsesform karakterisert heri er fra mennesker, men andre primater eller andre artsmotstykker eksisterer i naturen. Ytterligere sekvenser for proteiner i andre pattedyrarter, f.eks. primater, hunder, katter og gnagere, bør også være tilgjengelige, se nedenfor. Beskrivelsene nedenfor er rettet på, som eksempler, et humant IL-B30, men er like anvendelig i beslektede utførelsesformer fra andre arter.

II. Renset IL-B30

Human IL-B30-aminosyresekvens er vist som en utførelsesform innen SEQ ID NO: 2. Andre naturlig forekommende nukleinsyrer som koder for proteinet, kan isoleres ved hjelp av standardprosedyrer ved anvendelse av den tilveiebrakte sekvens, f.eks. PCR-teknikker, eller ved hybridisering. Disse aminosyresekvenser oppstilt fra amino- til karboksyterminalen, er viktige for å gi sekvensinformasjon for cytokinet og tillater å skjelne proteinantigenet fra andre proteiner og eksemplifisere mange varianter. Peptidsekvensene tillater dessuten fremstilling av peptider for å danne antistoffer for å gjenkjenne slike segmenter, og nukleotidsekvenser tillater fremstilling av oligonukleotidprober, som begge er strategier for påvisning eller isolering, f.eks. kloning, av gener som koder for slike sekvenser.

Som anvendt heri, skal betegnelsen "humant oppløselig IL-B30" omfatte, når den anvendes i en proteinsammenheng, et protein med en aminosyresekvens som tilsvarer et oppløselig polypeptid vist i SEQ ID NO: 2, eller signifikante fragmenter derav. Foretrukne utførelsesformer omfatter et stort antall distinkte, f.eks. ikke-overlappende, segmenter med den spesifikke lengde. Typisk vil antallet være minst 2, vanligvis minst 3, og fortrinnsvis 5, 7 eller enda høyere. Selv om de minimale lengder er gitt, kan lengre lengder med forskjellige størrelser være egnet, f.eks. én med lengde 7 og to med lengde 12.

Bindingskomponenter, f.eks. antistoffer, bindes typisk til et IL-B30 med høy affinitet, f.eks. minst ca. 100 nM, vanligvis bedre enn ca. 30 nM, fortrinnsvis bedre enn ca. 10 nM, og mer foretrukket bedre enn ca. 3 nM. Protein-

5 motstykker vil finnes i pattedyrarter foruten menneske, f.eks. andre primater, hovdyr eller gnagere. Ikke-pattedyrarter bør også besitte strukturelt eller funksjonelt beslektede gener og proteiner, f.eks. fugler eller amfibier.

Betegnelsen "polypeptid" som anvendt heri, inkluderer

10 et signifikant fragment eller segment og omfatter en strekning av aminosyrerester på minst ca. 8 aminosyrer, generelt minst ca. 12 aminosyrer, typisk minst ca. 16 aminosyrer, fortrinnsvis minst ca. 20 aminosyrer, og i spesielt foretrukne utførelsesformer minst ca. 30 eller flere aminosyrer, f.eks. 35, 40,

15 45, 50 etc. Slike fragmenter kan ha ender som starter og/eller slutter i praktisk talt alle posisjoner, f.eks. starter ved rest 1, 2, 3 etc. og slutter ved f.eks. 150, 149, 148 etc., i alle praktiske kombinasjoner. Spesielt interessante peptider har ender som tilsvarende strukturelle domenegrenser, f.eks.

20 helikser A, B, C og/eller D. Se tabell 1.

Betegnelsen "bindingssammensetning" refererer til molekyler som bindes med spesifisitet til IL-B30, f.eks. i en antistoff-antigeninteraksjon. Spesifisiteten kan være mer eller mindre inklusive, f.eks. spesifikk for en spesiell

25 utførelsesform, eller for grupper av beslektede utførelsesformer, f.eks. primat, gnager etc. Den inkluderer også forbindelser, f.eks. proteiner, som spesifikt assosierer med IL-B30, inkludert i en naturlig, fysiologisk relevant protein-proteininteraksjon, enten kovalent eller ikke-kovalent. Mole-

30 kylet kan være en polymer eller et kjemisk reagens. En funksjonell analog kan være et protein med strukturelle modifikasjoner, eller den kan være et molekyl som har en molekylform som reagerer med de passende bindingsdeterminanter. Forbindelsene kan tjene som agonister eller antagonist av en reseptorbindingsinteraksjon, se f.eks. Goodman et al. (red.),

35 Goodman & Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics (current ed.), Pergamon Press.

Vesentlig rent, f.eks. i en proteinsammenheng, betyr typisk at proteinet er fritt for andre kontaminerende

proteiner, nukleinsyrer eller andre biologiske materialer som stammer fra den opprinnelige kildeorganisme. Renhet kan analyseres ved hjelp av standardmetoder, typisk som vektprosent, og vil vanligvis være minst ca. 40 % ren, generelt
 5 minst ca. 50 % ren, ofte minst ca. 60 % ren, typisk minst ca. 80 % ren, fortrinnsvis minst ca. 90 % ren, og i de mest foretrukne utførelsesformer minst ca. 95 % ren. Bærere eller eksipiensers vil ofte være tilsatt.

Oppløselighet av et polypeptid eller fragment av-
 10 henger av miljøet og polypeptidet. Mange parametere påvirker polypeptiders oppløselighet, inkludert temperatur, elektrolyttmiljø, størrelse og molekylære karakteristika for polypeptidet og løsningsmidlets beskaffenhet. Temperaturen ved hvilken polypeptidet anvendes, varierer typisk fra ca. 4 °C til
 15 ca. 65 °C. Vanligvis er temperaturen høyere enn ca. 18 °C. For diagnostiske formål vil temperaturen vanligvis være ca. romtemperatur eller høyere, men lavere enn denatureringstemperaturen for komponentene i analysen. For terapeutiske formål vil temperaturen vanligvis være kroppstemperatur, typisk ca.
 20 37 °C for mennesker og mus, selv om temperaturen kan heves eller senkes *in situ* eller *in vitro* i bestemte situasjoner.

Størrelsen og strukturen av polypeptidet bør vanligvis være i en vesentlig stabil tilstand, og vanligvis ikke i en denaturert tilstand. Polypeptidet kan være assosiert med
 25 andre polypeptider i en kvaternær struktur, f.eks. for å gi oppløselighet, eller assosiert med lipider eller detergenter.

Løsningsmidlet og elektrolyttene vil vanligvis være en biologisk kompatibel buffer av en type anvendt for konservering av biologiske aktiviteter, og vil vanligvis tilsvare et
 30 fysiologisk, vandig løsningsmiddel. Vanligvis vil løsningsmidlet ha en nøytral pH, typisk mellom ca. 5 og 10, og fortrinnsvis ca. 7,5. I noen tilfeller vil én eller flere detergenter være tilsatt, typisk en mild, ikke-denaturerende detergent, f.eks. CHS (kolesterylhemisuksinat) eller CHAPS (3-
 35 ([3-kolamidopropyl]dimetylammmonium)-1-propansulfonat), eller foreligge i en tilstrekkelig lav konsentrasjon til å unngå signifikant nedbrytning av proteinets strukturelle eller fysiologiske egenskaper. I andre tilfeller kan det anvendes en sterk detergent for å bevirke betydelig denaturering.

III. Fysiske varianter

Foreliggende oppfinnelse omfatter også proteiner eller peptider med betydelig aminosyresekvensidentitet med aminosyresekvensen av IL-B30-antigenet. Variantene inkluderer
 5 artsvarianter, polymorfe eller allele varianter.

Aminosyresekvenshomologi, eller sekvensidentitet, bestemmes ved optimalisering av sammenfallende rester, hvis nødvendig ved å innføre nødvendige mellomrom. Se også Needleham et al. (1970), J. Mol. Biol., 48:443-453; Sankoff et
 10 al. (1983), kapittel 1 i Time Warps, String Edits, and Macromolecules: The Theory and Practice of Sequence Comparison, Addison-Wesley, Reading, MA; og software-pakker fra Intelli-Genetics, Mountain View, CA; og the University of Wisconsin Genetics Computer Group, Madison, WI. Sekvensidentitet endres
 15 når konservative substitusjoner vurderes som motstykker. Konservative substitusjoner inkluderer typisk substitusjoner innen de følgende grupper: glysin, alanin; valin, isoleucin, leucin; asparaginsyre, glutaminsyre; asparagin, glutamin; serin, treonin; lysin, arginin; og fenylalanin, tyrosin.
 20 Konserveringen kan gjelde for biologiske trekk, funksjonelle trekk eller strukturelle trekk. Homologe aminosyresekvenser er typisk ment å inkludere naturlige polymorfe eller allele og interartsvariasjoner av en proteinsekvens. Homologe proteiner eller peptider vil typisk ha fra 15 til 100 % identitet (der-
 25 som mellomrom kan innføres) til 50-100 % identitet (hvis konservative substitusjoner er inkludert) med aminosyresekvensen av IL-B30. Identitetstmålinger vil være minst ca. 35 %, generelt minst ca. 40 %, ofte minst ca. 50 %, typisk minst ca. 60 %, vanligvis minst ca. 70 %, fortrinnsvis minst
 30 ca. 80 %, og mer foretrukket minst ca. 90 %.

Det isolerte IL-B30-DNA kan lett modifiseres ved hjelp av nukleotidsubstitusjoner, nukleotiddelesjoner, nukleotidinnføyelser og inversjoner av korte nukleotidstrekkninger. Disse modifikasjoner resulterer i nye DNA-sekvenser som koder
 35 for disse antigenene, deres derivater eller proteiner med lignende fysiologiske, immunogene, antigenene eller andre funksjonelle aktiviteter. Disse modifiserte sekvenser kan anvendes for å produsere mutanter antigenene eller for å forhøye ekspresjon. Forhøyet ekspresjon kan involvere genamplifikasjon, økt

transkripsjon, økt translasjon og andre mekanismer. "Mutant IL-B30" omfatter et polypeptid som ellers faller innenfor sekvensidentitetsdefinisjonen av IL-B30 som angitt ovenfor, men som har en aminosyresekvens som skiller seg fra sekvensen

5 av IL-B30 som normalt funnet i naturen, enten ved delesjon, substitusjon eller innføyelse. Dette inkluderer generelt proteiner med betydelig identitet med et protein med en sekvens ifølge SEQ ID NO: 2, og som deler forskjellige biologiske aktiviteter, f.eks. antigene eller immunogene, med

10 disse sekvenser, og i foretrukne utførelsesformer inneholder de fleste av de beskrevne naturlige, fullengdede sekvenser. Fullengdede sekvenser vil typisk være foretrukket, selv om avkuttete versjoner også vil være anvendelige, og likeledes er gener eller proteiner fra naturlige kilder typisk mest ønsket.

15 Lignende konsepter gjelder for forskjellige IL-B30-proteiner, spesielt de som finnes i forskjellige varmblodige dyr, f.eks. pattedyr og fugler. Disse beskrivelsene er generelt ment å omfatte alle IL-B30-proteiner, og ikke begrenset til de spesielt diskuterte primatutførelsesformer.

20 IL-B30-mutagenese kan også utføres ved å danne aminosyreinnføyelser eller -delesjoner. Substitusjoner, delesjoner, innføyelser og enhver kombinasjon av disse kan dannes for å oppnå en endelig konstruksjon. Innføyelser inkluderer amino- eller karboksyterminale fusjoner. Vilkårslig mutagenese kan

25 utføres på et målkodon, og de uttrykte mutanter kan deretter screenes for den ønskede aktivitet. Metoder for å danne substitusjonsmutasjoner på forutbestemte steder i DNA med en kjent sekvens er vel kjent i teknikken, f.eks. ved hjelp av M13-primermutagenese eller polymerasekjedereaksjons(PCR)-

30 teknikker. Se f.eks. Sambrook et al. (1989); Ausubel et al. (1987 og supplementer); og Kunkel et al. (1987), *Methods in Enzymol.*, 154:367-382. Foretrukne utførelsesformer inkluderer f.eks. 1 gang, 2 ganger, 3 ganger, 5 ganger, 7 ganger etc., fortrinnsvis konservative substitusjoner på nukleotid- eller

35 aminosyrenivåer. Fortrinnsvis vil substitusjonene være i avstand fra de konserverte cysteiner, og vil ofte være i områder utenfor de spiralformede strukturdøner. Slike varianter kan være nyttige for å produsere spesifikke antistoffer, og vil ofte dele mange eller alle biologiske egenskaper.

Det beskrives også rekombinante proteiner, f.eks. heterologe fusjonsproteiner, ved anvendelse av segmenter fra disse proteiner. Et heterologt fusjonsprotein er en fusjon av proteiner eller segmenter som naturlig ikke normalt er
 5 fusjonert på samme måte. Et lignende konsept gjelder heterologe nukleinsyresekvenser.

Nye konstruksjoner kan dessuten dannes ved å kombinere lignende funksjonelle domener fra andre proteiner. Målbindingssegmenter eller andre segmenter kan f.eks. "utveksles"
 10 mellom forskjellige nye fusjonspolypeptider eller fragmenter. Se f.eks. Cunningham, et al. (1989), *Science*, 243:1330-1336; og O'Dowd et al. (1988), *J. Biol. Chem.*, 263:15985-15992.

Fosforamidittmetoden beskrevet av Beaucage og Carruthers (1983), *Tetra. Letts.*, 22(20):1859-1862, vil produsere egnede syntetiske DNA-fragmenter. Et dobbelttrådet
 15 fragment vil ofte oppnås, enten ved syntetisering av den komplementære tråd og annealing av tråden sammen under passende betingelser eller ved addisjon av den komplementære tråd ved anvendelse av DNA-polymerase med en passende primersekvens, f.eks. ved hjelp av PCR-teknikker.
 20

Strukturell analyse kan utføres på dette gen for sammenligning med IL-6-familien av cytokiner. Familien inkluderer f.eks. IL-6, IL-11, IL-12, G-CSF, LIF, OSM, CNTF og Ob. Linjeoppstilling av de humane, grise- og muse-IL-B30-sekvenser
 25 med andre medlemmer av IL-6-familien burde tillate definisjon av strukturelle trekk. Nærmere bestemt kan β -plate- og α -heliksrester bestemmes ved anvendelse av f.eks. RASMOL-program, se Bazan et al. (1996), *Nature*, 379:591; Lodi et al. (1994), *Science*, 263:1762-1766; Sayle og Milner-White (1995),
 30 *TIBS*, 20:374-376; og Gronenberg et al. (1991), *Protein Engineering*, 4:263-269. Foretrukne rester for substitusjoner inkluderer de overflateeksponerte rester som ville forutsies å reagere med reseptor. Andre rester som burde konservere funksjon, vil være konservative substitusjoner, spesielt i en
 35 posisjon langt fra de overflateeksponerte rester.

IV. Funksjonelle varianter

Blokkering av fysiologiske responser på IL-B30 kan resultere fra den kompetitive inhibering av binding av liganden til dens reseptor.

5 *In vitro*-analyser ifølge foreliggende oppfinnelse vil ofte anvende isolert protein, oppløselige fragmenter som omfatter reseptorbindingssegmenter av disse proteiner eller fragmenter festet til fastfasesubstrater. Disse analyser vil også tillate diagnostisk bestemmelse av effektene av enten
10 bindingssegmentmutasjoner og modifikasjoner eller cytokinmutasjoner og modifikasjoner, f.eks. IL-B30-analoger.

Det beskrives også anvendelse av kompetitive legemiddelscreeningsanalyser, f.eks. hvor nøytraliserende antistoffer mot cytokinet eller reseptorbindingsfragmenter
15 konkurrerer med en testforbindelse.

"Derivater" av IL-B30-antigener inkluderer aminosyresekvensmutanter fra naturlig forekommende former, glykosyleringsvarianter og kovalente eller aggregatkonjugater med andre kjemiske komponenter. Kovalente derivater kan prepareres ved
20 binding av funksjonaliteter til grupper som finnes i IL-B30-aminosyresidekjeder eller ved N- eller C-terminalene, f.eks. ved hjelp av standardmetoder. Se f.eks. Lundblad og Noyes (1988), Chemical Reagents for Protein Modification, vol. 1-2, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL; Hugli (red., 1989), Techni-
25 ques in Protein Chemistry, Academic Press, San Diego, CA; og Wong (1991), Chemistry of Protein Conjugation and Cross Linking, CRC Press, Boca Raton, FL.

Spesielt er glykosyleringsendringer inkludert, f.eks. dannet ved modifikasjon av glykosyleringsmønstrene av et poly-
30 peptid under dets syntese og bearbeidelse, eller i ytterligere bearbeidelsestrinn. Se f.eks. Elbein (1987), Ann. Rev. Biochem., 56:497-534. Også omfattet er versjoner av peptidene med den samme primære aminosyressekvens som har andre mindre modifikasjoner, inkludert fosforylerte aminosyrerester, f.eks.
35 fosfotyrosin, fosfoserin eller fosfotreonin.

Fusjonspolypeptider mellom IL-B30 og andre homologe eller heterologe proteiner tilveiebringes også. Mange cytokinreseptorer eller andre overflateproteiner er multimere, f.eks. homodimere entiteter, og en gjentakelseskonstruksjon kan ha

forskjellige fordeler, inkludert redusert mottakelighet for proteolytisk spalting. Typiske eksempler er fusjoner av et rapportørpolypeptid, f.eks. luciferase, med et segment eller domene av et protein, f.eks. et reseptorbindingssegment, slik
 5 at tilstedeværelsen eller beliggenheten av den fusjonerte ligand lett kan bestemmes. Se f.eks. Dull et al., US-patent nr. 4 859 609. Andre genfusjonspartnere inkluderer bakteriell β -galaktosidase, trpE, protein A, β -laktamase, alfa-amylase, alkoholdehydrogenase, gjær-alfa-paringsfaktor og deteksjons-
 10 eller rensingsmarkører, slik som en FLAG-sekvens av His6-sekvens. Se f.eks. Godowski et al. (1988), Science, 241:812-816.

Fusjonspeptider vil typisk fremstilles ved hjelp av enten rekombinante nukleinsyremetoder eller syntetiske polypeptidmetoder. Teknikker for nukleinsyremanipulering og
 15 ekspresjon er generelt beskrevet av f.eks. Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2. utg.), vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory; og Ausubel et al. (red., 1993), Current Protocols in Molecular Biology, Greene and
 20 Wiley, NY. Teknikker for syntese av polypeptider er f.eks. beskrevet av Merrifield (1986), Science, 232:341-347; Atherton et al. (1989), Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford; og Grant (1992), Synthetic Peptides: A User's Guide, W.H. Freeman, NY. Refoldingsmetoder
 25 kan anvendes på syntetiske proteiner.

Det beskrives også anvendelse av andre derivater av IL-B30-proteiner enn variasjoner i aminosyresekvens eller glykosylering. Slike derivater kan involvere kovalent eller aggregerende assosiasjon med kjemiske komponenter eller
 30 proteinbærere. Kovalente eller aggregerende derivater vil være anvendelige som immunogener, som reagenser i immunanalyser eller i rensingsmetoder, slik som for affinitetsrensing av bindingspartnere, f.eks. andre antigener. Et IL-B30 kan immobiliseres ved kovalent binding til et fast støtte-
 35 materiale, slik som cyanogenbromidaktivert Sepharose, ved hjelp av metoder som er vel kjent i teknikken, eller adsorberes på polyolefinoverflater, med eller uten glutaraldehydkryssbinding, for anvendelse ved analyse eller rensing av anti-IL-B30-antistoffer eller en alternativ bindings-

sammensetning. IL-B30-proteinene kan også merkes med en påvisbar gruppe, f.eks. for anvendelse i diagnostiske analyser. Rensing av IL-B30 kan utføres ved hjelp av et immobilisert antistoff eller en komplementær bindingspartner, f.eks. en bindingsdel av en reseptor.

Et oppløst IL-B30 eller et fragment kan anvendes som et immunogen for produksjon av antiserer eller antistoffer spesifiske for binding. Renset antigen kan anvendes for å screene monoklonale antistoffer eller antigenbindingsfragmenter, omfattende antigenbindingsfragmenter av naturlige antistoffer, f.eks. Fab, Fab', F(ab)₂ etc. Rensede IL-B30-antigener kan også anvendes som et reagens for å påvise antistoffer dannet som respons mot tilstedeværelsen av forhøyede nivåer av cytokinet, som kan være diagnostiske for en unormal eller spesifikk fysiologisk eller sykdomstilstand. Det beskrives antistoffer dannet mot aminosyresekvenser kodet for av nukleotidsekvensen vist i SEQ ID NO: 1 eller fragmenter av protein inneholdende denne. Nærmere bestemt omfatter oppfinnelsen antistoffer med bindingsaffinitet for, eller dannet mot, spesifikke domener, f.eks. helikser A, B, C eller D.

Det beskrives isolering av ytterligere nært beslektede artsvarianter. Southern- og Northern-blot-analyse vil vise at lignende genetiske entiteter eksisterer i andre pattedyr. Det er sannsynlig at IL-B30 er alminnelig utbredt i artsvarianter, f.eks. gnagere, lagomorfer, carnivorer, artiodactyla, perissodactyla og primater.

Det beskrives også midler for å isolere en gruppe av beslektede antigener som både utviser forskjeller og likheter i struktur, ekspresjon og funksjon. Belysning av mange av de fysiologiske effekter av molekylerne vil bli sterkt akselerert ved isolering og karakterisering av ytterligere distinkte arter eller polymorfe varianter av disse. Det beskrives spesielt anvendelige prober for identifisering av ytterligere homologe genetiske entiteter i forskjellige arter.

De isolerte gener vil tillate transformasjon av celler som mangler ekspresjon av et IL-B30, f.eks. enten artstyper eller celler som mangler tilsvarende proteiner og oppviser negativ bakgrunnsaktivitet. Dette burde tillate

analyse av funksjonen av IL-B30 som sammenligning med utransformerte kontrollceller.

Disseksjon av kritiske strukturelle elementer som bevirker de forskjellige fysiologiske funksjoner formidlet gjennom disse antigenene, er mulig ved anvendelse av standardteknikker i moderne molekylærbiologi, spesielt for sammenligning av medlemmer av den beslektede klasse. Se f.eks. homolog-skanningsmutageneseteknikken beskrevet av Cunningham, et al. (1989), *Science*, 243:1330-1336; og metoder anvendt av O'Dowd et al. (1988), *J. Biol. Chem.*, 263:15985-15992; og Lechleiter et al. (1990), *EMBO J.*, 9:4381-4390.

Intracellulære funksjoner vil antakeligvis involvere reseptorsignalisering. Proteininternalisering kan imidlertid forekomme under visse omstendigheter, og interaksjon mellom intracellulære komponenter og cytokin kan forekomme. Spesifikke segmenter for interaksjon av IL-B30 med reagerende komponenter kan identifiseres ved mutagenese eller direkte biokjemiske metoder, f.eks. kryssbindings- eller affinitetsmetoder. Strukturanalyse ved hjelp av krystallografiske eller andre fysiske metoder vil også være anvendelig. Ytterligere undersøkelse av mekanismen for signaltransduksjon vil inkludere undersøkelse av assosierte komponenter som kan isoleres ved affinitetsmetoder eller ved hjelp av genetiske metoder, f.eks. komplementeringsanalyse av mutanter.

Ytterligere undersøkelser av ekspresjon og kontroll av IL-B30 vil fortsettes. Kontrolleringselementene assosiert med antigenene bør oppvise forskjellige fysiologiske, utviklingsmessige, vevsspesifikke eller andre ekspresjonsmønstre. Oppstrøms eller nedstrøms genetiske områder, f.eks. kontroll-elementer, er av interesse.

Strukturundersøkelser av IL-B30-antigenene vil føre til utforming av nye antigenene, spesielt analoger som oppviser agonist- eller antagonistegenskaper på molekylet. Dette kan kombineres med tidligere beskrevne screeningsmetoder for å isolere antigenene som oppviser ønskede aktivitetsspektra.

V. Antistoffer

Antistoffer kan dannes mot forskjellige epitoper av IL-B30-proteinene, inkludert arter, polymorfe eller allele varianter og fragmenter av disse, både i deres naturlig forekommende former og i deres rekombinante former. Antistoffer kan dessuten dannes mot IL-B30, enten i deres aktive former eller i deres inaktive former, inkludert native eller denaturerte versjoner. Antiidiotypiske antistoffer er også inkludert.

Antistoffer, inkludert bindingsfragmenter og enkeltkjedeversjoner, mot forhåndsbestemte fragmenter av antigenene, kan dannes ved immunisering av dyr med konjugater av fragmentene med immunogene proteiner. Monoklonale antistoffer fremstilles fra celler som utskiller det ønskede antistoff. Disse antistoffer kan screenes for binding til normale eller defekte IL-B30, eller screenes for agonistisk eller antagonistisk aktivitet, f.eks. formidlet gjennom en reseptor. Antistoffer kan være agonistiske eller antagonistiske, f.eks. ved sterisk blokkeringsbinding til en reseptor. Disse monoklonale antistoffer vil vanligvis bindes med en K_D på minst 1 mM, mer vanlig minst ca. 300 μ M, typisk minst ca. 100 μ M, mer typisk minst ca. 30 μ M, fortrinnsvis minst ca. 10 μ M, og mer foretrukket minst ca. 3 μ M eller bedre.

Antistoffene som beskrevet heri kan også være anvendelige i diagnostikken. Som innfangelses- eller ikke-nøytraliserende antistoffer kan de screenes for evnen til å bindes til antigenene uten å inhibere binding til en reseptor. Som nøytraliserende antistoffer kan de være nyttige ved kompetitive bindingsanalyser. De vil også være nyttige for påvisning eller kvantifisering av IL-B30-protein eller dets reseptor. Se f.eks. Chan (red., 1987), Immunology: A Practical Guide, Academic Press, Orlando, FL; Price og Newman (red., 1991), Principles and Practice of Immunoassay, Stockton Press, N.Y.; og Ngo (red., 1988), Nonisotopic Immunoassay, Plenum Press, NY. Kryssabsorpsjonstester eller andre tester vil identifisere antistoffer som oppviser forskjellige spektre av spesifisiteter, f.eks. unike eller delte artsspesifisiteter.

Antistoffene, inkludert antigenbindingsfragmenter, ifølge oppfinnelsen kan dessuten være potente antagonistiske som

bindes til antigenet og inhiberer funksjonell binding, f.eks. til en reseptor som kan utløse en biologisk respons. De kan også være anvendelige som ikke-nøytraliserende antistoffer og kan koples til toksiner eller radionuklider, slik at når anti-
 5 stoffet bindes til antigen, blir en celle som uttrykker dette, f.eks. på overflaten, drept. Disse antistoffer kan dessuten konjugeres til legemidler eller andre terapeutiske midler, enten direkte eller indirekte, ved hjelp av en linker, og kan bevirke målretting av legemidler.

10 Antigenfragmenter kan bindes til andre materialer, spesielt polypeptider, i form av fusjonerte eller kovalent bundne polypeptider for anvendelse som immunogener. Et antigen og dets fragmenter kan være fusjonert eller kovalent bundet til forskjellige immunogener, slik som keyhole limpet-hemo-
 15 cyanin, bovint serumalbumin, tetanustoksoid etc. Se Microbiology, Hoeber Medical Division, Harper and Row, 1969; Landsteiner (1962), Specificity of Serological Reactions, Dover Publications, New York; Williams et al. (1967), Methods in Immunology and Immunochemistry, vol. 1, Academic Press, New
 20 York; og Harlow og Lane (1988), Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press, NY, for beskrivelser av metoder for fremstilling av polyklonale antisera.

I noen tilfeller er det ønskelig å fremstille monoklonale antistoffer fra forskjellige pattedyrverter, slik som
 25 mus, gnagere, primater, mennesker etc. Beskrivelse av teknikker for fremstilling av slike monoklonale antistoffer kan f.eks. finnes i Stites et al. (red.), Basic and Clinical Immunology (4. utg.), Lange Medical Publications, Los Altos, CA, og referanser anført deri; Harlow og Lane (1988), Anti-
 30 bodies: A Laboratory Manual, CSH Press; Goding (1986), Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2. utg.), Academic Press, New York, NY; og spesielt i Kohler og Milstein (1975), Nature, 256:497, som diskuterer én metode for dannelsen av monoklonale antistoffer.

35 Andre egnede teknikker involverer *in vitro*-eksponering av lymfocytter for de antigene polypeptider, eller alternativt for seleksjon av biblioteker av antistoffer i fagvektorer eller lignende vektorer. Se Huse et al. (1989), "Generation of a Large Combinatorial Library of the Immuno-

globulin Repertoire in Phage Lambda", Science, 246:1275-1281; and Ward et al. (1989), Nature, 341:544-546. Polypeptidene og antistoffene ifølge oppfinnelsen kan anvendes med eller uten modifikasjon, inkludert kimære eller humaniserte antistoffer.

5 Ofte vil polypeptidene og antistoffene være merket ved binding, enten kovalent eller ikke-kovalent, av et stoff som tilveiebringer et påvisbart signal. Mange forskjellige markører og konjugasjonsteknikker er kjent og er omfattende rapportert i både den vitenskapelige litteratur og patent-
10 litteraturen. Egnede markører inkluderer radionuklider, enzymer, substrater, kofaktorer, inhibitorer, fluorescerende komponenter, kjemiluminescerende komponenter, magnetiske partikler og lignende. Patenter som beskriver anvendelse av slike markører, inkluderer US-Patenter nr. 3 817 837,
15 3 850 752, 3 939 350, 3 996 345, 4 277 437, 4 275 149 og 4 366 241. Rekombinante immunglobuliner kan også produseres. Se Cabilly, US-patent nr. 4 816 567; Moore et al., US-patent nr. 4 642 334; og Queen et al. (1989), Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 86:10029-1003.

20 Antistoffene ifølge oppfinnelse kan også anvendes for affinitetskromatografi ved isolering av proteinet. Kolonner kan prepareres hvor antistoffene er bundet til et fast støtte-materiale. Se f.eks. Wilchek et al. (1984), Meth. Enzymol., 104:3-55.

25 Antistoffer dannet mot hvert IL-B30 vil også være anvendelige for å danne antiidiotypiske antistoffer. Disse vil være nyttige ved påvisning eller diagnostisering av forskjellige immunologiske tilstander relatert til ekspresjon av de respektive antigener.

30

VI. Nukleinsyrer

De beskrevne peptidsekvenser og de relaterte reagen-
ser er anvendelige for påvisning, isolering eller identifi-
sering av en DNA-klon som koder for IL-B30, f.eks. fra en
35 naturlig kilde. Den vil typisk være anvendelig for isolering av et gen fra pattedyr, og lignende prosedyrer vil anvendes for å isolere gener fra andre arter, f.eks. varmblodige dyr som fugler og pattedyr. Krysshybridisering vil tillate isolering av IL-B30 fra de samme, f.eks. polymorfe varianter eller

andre arter. Et antall forskjellige metoder vil være tilgjengelige for vellykket å isolere en egnet nukleinsyreklon.

Det rensede protein eller definerte peptider er anvendelige for å danne antistoffer ved hjelp av standard-
 5 metoder, som beskrevet ovenfor. Syntetiske peptider eller rensed protein kan presenteres for et immunsystem for å danne monoklonale eller polyklonale antistoffer. Se f.eks. Coligan (1991), Current Protocols in Immunology, Wiley/Greene, NY; og Harlow og Lane (1989), Antibodies: A Laboratory Manual, Cold
 10 Spring Harbor Press.

Det spesifikke bindingspreparat kan f.eks. anvendes for screening av et ekspresjonsbibliotek dannet fra en cellelinje som uttrykker et IL-B30. Screening av intracellulær ekspresjon kan utføres ved hjelp av forskjellige fargings-
 15 prosedyrer eller immunfluorescensprosedyrer. Bindingspreparater kan anvendes for å affinitetsrense eller utsortere celler som uttrykker et overflatefusjonsprotein.

Peptidsegmentene kan også anvendes for å forutsi egnede oligonukleotider for å screene et bibliotek. Den
 20 genetiske kode kan anvendes for å utvelge passende oligonukleotider anvendelige som prober for screening. Se f.eks. SEQ ID NO: 1. I kombinasjon med polymerasekjedereaksjons- (PCR)teknikker vil syntetiske oligonukleotider være anvendelige for utvelgelse av korrekte kloner fra et bibliotek.
 25 Komplementære sekvenser vil også anvendes som prober, primere eller antisensetråder. Forskjellige fragmenter kan være spesielt anvendelige, f.eks. koplet med forankret vektor- eller poly-A-komplementære PCR-teknikker eller med komplementært DNA for andre peptider.

30 Det beskrives anvendelse av isolert DNA eller fragmenter for å kode for et biologisk aktivt, tilsvarende IL-B30-polypeptid, spesielt et som mangler delen som koder for den utranslaterte 5'-del av den beskrevne sekvens. Oppfinnelsen dekker dessuten isolert eller rekombinant DNA som koder
 35 for et biologisk aktivt protein eller polypeptid, og som er i stand til å hybridisere under passende betingelser med DNA-sekvensene beskrevet heri. Det biologisk aktive protein eller polypeptid kan være et intakt antigen eller et fragment, og har en aminosyresekvens beskrevet i f.eks. SEQ ID NO: 2,

spesielt et modent, utskilt polypeptid. Oppfinnelsen dekker dessuten anvendelse av isolert eller rekombinant DNA, eller fragmenter av dette, som koder for proteiner som oppviser høy identitet med et utskilt IL-B30. Det isolerte DNA kan ha de
 5 respektive regulatoriske sekvenser i 5'- og 3'-flankene, f.eks. promotorer, enhancere, poly-A-addisjonssignaler og andre. Alternativt kan ekspresjon bevirkes ved operabel binding av et kodingssegment til en heterolog promotor, f.eks. ved innføyelse av en promotor oppstrøms fra et endogent gen.

10 En "isolert" nukleinsyre er en nukleinsyre, f.eks. RNA, DNA eller en blandet polymer, som er hovedsakelig separert fra andre komponenter som naturlig medfølger en nativ sekvens, f.eks. ribosomer, polymeraser og/eller flankerende genomiske sekvenser fra den opprinnelige art. Betegnelsen
 15 omfatter en nukleinsyresekvens som er blitt fjernet fra sitt naturlig forekommende miljø, og inkluderer rekombinante eller klonede DNA-isolater og kjemisk syntetiserte analoger eller analoger syntetisert biologisk av heterologe systemer. Et vesentlig rent molekyl inkluderer isolerte former av mole-
 20 kylet. Vanligvis vil nukleinsyren befinne seg i en vektor eller et fragment mindre enn ca. 50 kb, vanligvis mindre enn ca. 30 kb, typisk mindre enn ca. 10 kb, og fortrinnsvis mindre enn ca. 6 kb.

En isolert nukleinsyre vil generelt være en homogen
 25 sammensetning av molekyler, men vil i noen utførelsesformer inneholde en mindre andel heterogene deler. Denne heterogenitet finnes typisk ved polymerendene eller deler som ikke er kritiske for en ønsket biologisk funksjon eller aktivitet.

En "rekombinant" nukleinsyre er enten definert ved
 30 dens produksjonsmetode eller dens struktur. Som referanse til dens produksjonsmetode, f.eks. et produkt fremstilt ved en prosess, er prosessen anvendelse av rekombinante nukleinsyreteknikker og involverer f.eks. human intervensjon i nukleotidsekvensen, typisk seleksjon eller produksjon. Alternativt kan
 35 den være en nukleinsyre fremstilt ved dannelselse av en sekvens som omfatter fusjon av to fragmenter som ikke naturlig er tilgrensende hverandre, men er ment å ekskludere naturlige produkter, f.eks. naturlig forekommende mutanter. Produkter dannet ved transformasjon av celler med enhver ikke-naturlig

forekommende vektor, er således f.eks. inkludert, og også nukleinsyrer som omfatter sekvenser avledet ved anvendelse av enhver syntetisk oligonukleotidprosess. En slik utføres ofte for å erstatte et kodon med et overflødig kodon som koder for
 5 den samme eller en konservativ aminosyre, mens det typisk introduseres eller fjernes et sekvensgjenkjennelsessete.

Alternativt utføres prosessen for å binde sammen nukleinsyresegmenter med ønskede funksjoner for å danne en enkelt genetisk entitet som omfatter en ønsket kombinasjon av
 10 funksjoner som ikke finnes i de vanlig tilgjengelige, naturlige former. Restriksjonsenzymgjenkjennelsesseter er ofte målet for slike syntetiske manipulasjoner, men andre setespesifikke mål, f.eks. promotorer, DNA-replikasjonsseter, regulasjonssekvenser, kontrollsekvenser eller andre anvendelige trekk, kan inkorporeres ved utformingen. Et lignende konsept er ment for et rekombinant, f.eks. fusjons-, polypeptid. Spesielt inkludert er syntetiske nukleinsyrer som ved hjelp av overflødigheten av den genetiske kode koder for polypeptider som er lignende fragmenter av disse antigener, og
 20 fusjoner av sekvenser fra diverse forskjellige arter eller polymorfe varianter.

Et signifikant "fragment" i en nukleinsyresammenheng er et sammenhengende segment på minst ca. 17 nukleotider, generelt minst ca. 22 nukleotider, vanligvis minst ca.
 25 29 nukleotider, mer ofte minst ca. 35 nukleotider, typisk minst ca. 41 nukleotider, som regel minst ca. 55 nukleotider, og i spesielt foretrukne utførelsesformer minst ca. 60 eller flere nukleotider, f.eks. 67, 73, 81, 89, 95 etc.

Et DNA som koder for et IL-B30-protein, vil være
 30 spesielt anvendelig for å identifisere gener, mRNA og cDNA som koder for beslektede eller lignende proteiner, så vel som DNA som koder for homologe proteiner fra forskjellige arter. Det vil være homologer i andre arter, inkludert primater, gnagere, hundedyr, kattedyr og fugler. Forskjellige IL-B30-proteiner
 35 bør være homologe og er omfattet av foreliggende oppfinnelse. Selv proteiner som har et mer fjernt evolusjonsmessig slektskap med antigenet, kan imidlertid lett isoleres under passende betingelser ved anvendelse av disse sekvenser dersom

de er tilstrekkelig homologe. Primat-IL-B30-proteiner er av spesiell interesse.

Rekombinante kloner avledet fra de genomiske sekvenser, f.eks. inneholdende introner, vil være anvendelige for transgene undersøkelser, inkludert f.eks. transgene celler og organismer, og for genterapi. Se f.eks. Goodnow (1992), "Transgenic Animals", i Roitt (red.), *Encyclopedia of Immunology*, Academic Press, San Diego, s. 1502-1504; Travis (1992), *Science*, 256:1392-1394; Kuhn et al. (1991), *Science*, 254:707-710; Capecchi (1989), *Science*, 244:1288; Robertson (1987) (red.), *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford; og Rosenberg (1992), *J. Clinical Oncology*, 10:180-199.

Vesentlig homologi, f.eks. identitet, i forbindelse med nukleinsyresekvenssammenligning betyr enten at segmentene eller deres komplementære tråder, når de sammenlignes, er identiske når de linjeoppstilles optimalt med passende nukleotidinnføyerelser eller -delesjoner i minst ca. 50 % av nukleotidene, generelt minst ca. 58 %, vanligvis minst ca. 65 %, ofte minst ca. 71 %, typisk minst ca. 77 %, oftest minst ca. 85 %, fortrinnsvis minst ca. 95-98 % eller mer, og i spesielle utførelsesformer så høyt som ca. 99 % eller mer av nukleotidene. Alternativt eksisterer vesentlig homologi når segmentene vil hybridisere under selektive hybridiseringsbetingelser til en tråd eller dens komplement, typisk ved anvendelse av en sekvens av IL-B30, f.eks. i SEQ ID NO: 1. Selektiv hybridisering vil typisk forekomme når det er minst ca. 55 % identitet over en strekning på minst ca. 30 nukleotider, fortrinnsvis minst ca. 75 % over en strekning på ca. 25 nukleotider, og mest foretrukket minst ca. 90 % over ca. 20 nukleotider. Se Kanehisa (1984), *Nuc. Acids Res.*, 12:203-213. Lengden for identitetssammenligning, som beskrevet, kan være over lengre strekninger og vil i visse utførelsesformer være over en strekning på minst ca. 17 nukleotider, vanligvis minst ca. 28 nukleotider, typisk minst ca. 40 nukleotider, og fortrinnsvis minst ca. 75-100 nukleotider eller flere.

Stringente betingelser, med referanse til homologi i en hybridiseringssammenheng, vil være stringent kombinerte betingelser for salt, temperatur, organiske løsningsmidler og

andre parametere, typisk de som kontrolleres i hybridiseringsreaksjoner. Stringente temperaturbetingelser vil vanligvis inkludere temperaturer over ca. 30 °C, vanligvis over ca. 37 °C, typisk over ca. 55 °C, fortrinnsvis over ca. 70 °C.

- 5 Stringente saltbetingelser vil vanligvis være mindre enn ca. 1000 mM, ofte mindre enn ca. 400 mM, typisk mindre enn ca. 250 mM, fortrinnsvis mindre enn ca. 150 mM, inkludert ca. 100, 50 eller 20 mM. Kombinasjonen av parametere er imidlertid mye viktig enn målingen av enhver enkel parameter. Se f.eks.
- 10 Wetmur og Davidson (1968), J. Mol. Biol., 31:349-370. Hybridisering under stringente betingelser bør gi en bakgrunn på minst 2 ganger over bakgrunnen, fortrinnsvis minst 3-5 ganger eller mer.

- For sekvenssammenligning virker typisk én sekvens som
- 15 en referansesekvens som testsekvenser sammenlignes med. Ved anvendelse av en sekvenssammenligningsalgoritme er test- og referansesekvenser inn-data i en computer, subsekvenskoordinater utformes hvis nødvendig, og sekvensalgoritmeprogramparametere utformes. Sekvenssammenligningsalgoritmen beregner
 - 20 deretter prosent sekvensidentitet for testsekvensen(e) i forhold til referansesekvensen, basert på de utformede programparametere.

- Optisk linjeoppstilling av sekvenser for sammenligning kan f.eks. utføres ved hjelp av den lokale homologi-
- 25 algoritmen ifølge Smith og Waterman (1981), Adv. Appl. Math., 2:482, ved hjelp av homologilinjeoppstillingsalgoritmen ifølge Needleman og Wunsch (1970), J. Mol. Biol., 48:443, ved hjelp av søk for likhetsmetoden ifølge Pearson og Lipman (1988), Proc. Nat'l Acad. Sci. USA., 85:2444, ved hjelp av datoriserte
 - 30 gjennomføringer av disse algoritmer (GAP, BESTFIT, FASTA og TFASTA i the Wisconsin Genetics Software-sett, Genetics Computer Group, 575, Science Dr., Madison, WI) eller ved visuell inspeksjon (se generelt Ausubel et al., supra).

- Ett eksempel på en anvendelig algoritme er PILEUP.
- 35 PILEUP danner en multippel sekvenslinjeoppstilling fra en gruppe av beslektede sekvenser ved anvendelse av progressive, parvise linjeoppstillinger for å vise slektskap og prosent sekvensidentitet. Den plotter også et tre eller et dendrogram som viser grupperingsforholdene anvendt for å danne linje-

oppstillingen. PILEUP benytter en forenkling av den progressive linjeoppstillingsmetoden ifølge Feng og Doolittle (1987), J. Mol. Evol., 35:351-360. Den anvendte metode er lignende metoden beskrevet av Higgins og Sharp (1989), CABIOS, 5:151-153. Programmet kan linjeoppstille opptil 300 sekvenser, hver med en maksimal lengde på 5000 nukleotider eller aminosyrer. Den multiple linjeoppstillingsprosedyre begynner med den parvise linjeoppstilling av de to mest lignende sekvenser, som gir en gruppe på to linjeoppstilte sekvenser. Denne gruppe linjeoppstilles deretter med den nest mest beslektede sekvens eller gruppe av linjeoppstilte sekvenser. To grupper av sekvenser linjeoppstilles ved en enkel forlengelse av den parvise linjeoppstilling av to individuelle sekvenser. Den endelige linjeoppstilling oppnås ved en serie progressive, parvise linjeoppstillinger. Programmet kjøres ved å utpeke spesifikke sekvenser og deres aminosyre- eller nukleotidkoordinater for områder for sekvenssammenligning, og ved angivelse av programparameterne. En referansesekvens kan f.eks. sammenlignes med andre testsekvenser for å bestemme prosent sekvensidentitetsforhold ved anvendelse de følgende parametere: "default gap weight" (3,00) "default gap length weight" (0,10) og "weighted end gaps".

Et annet eksempel på en algoritme som er egnet for bestemmelse av prosent sekvensidentitet og sekvenslikhet, er BLAST-algoritmen, som er beskrevet av Altschul et al. (1990), J. Mol. Biol., 215:403-410. Programvare for utførelse av BLAST-analyser er offentlig tilgjengelig gjennom the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Denne algoritmen involverer først identifisering av høytskårende sekvenspar (HSP) ved identifisering av korte ord med lengde W i den søkte sekvens, som enten tilsvare eller tilfredsstiller en positivt vurdert terskelverdi T når den linjeoppstilles med et ord med den samme lengde i en databasesekvens. T er referert til som naboord-poengttallterskelen (neighborhood word score threshold) (Altschul et al., supra). Disse innledende naboord-"treff" virker som spirer for å initiere søk for å finne lengre HSP inneholdende disse. Ordtreffene utvides deretter i begge retninger langs hver sekvens så langt som det kumulative

linjeoppstillingstall kan økes. Utvidelse av ordtreffene i hver retning stopper når: det kumulative linjeoppstillingspoengttall minker med mengden X fra dets maksimalt oppnådde verdi; det kumulative poengttall når null eller lavere, på grunn av akkumuleringen av én eller flere negativt skårende restlinjeoppstillinger; eller enden av hver sekvens nås. BLAST-algoritmeparameterne W , T og X bestemmer sensitiviteten og hastigheten av linjeoppstillingen. BLAST-programmet anvender som normalverdier en ordlengde (W) på 11, BLOSUM62-skåringsmatrikslinjeoppstillinger (B) (se Henikoff og Henikoff (1989), Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 89:10915) på 50, forventning (E) på 10, $M = 5$, $N = 4$, og en sammenligning av begge tråder.

I tillegg til å beregne prosent sekvensidentitet utfører BLAST-algoritmen også en statistisk analyse av likheten mellom to sekvenser (se f.eks. Karlin og Altschul (1993), Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 90:5873-5787). Én måling for likhet tilveiebrakt ved BLAST-algoritmen er den minste sum-sannsynlighet ($P(N)$), som gir en indikasjon på sannsynligheten for at to nukleotidsekvenser eller aminosyresekvenser er like ville forekomme tilfeldig. En nukleinsyre betraktes f.eks. som lik en referansesekvens dersom den minste sum-sannsynlighet ved en sammenligning av testnukleinsyren med referansenukleinsyren er mindre enn ca. 0,1, mer foretrukket mindre enn ca. 0,01, og mest foretrukket mindre enn ca. 0,001.

En ytterligere indikasjon på at to nukleinsyresekvenser av polypeptider er vesentlig identiske, er at polypeptidet kodet for av den første nukleinsyre er immunologisk kryss-reaktiv med polypeptidet kodet for av den andre nukleinsyre, som beskrevet nedenfor. Et polypeptid er således typisk vesentlig identisk med et andre polypeptid f.eks. når de to peptider kun atskiller seg ved konservative substitusjoner. En annen indikasjon på at to nukleinsyresekvenser er vesentlig identiske, er at de to molekyler hybridiserer med hverandre under stringente betingelser, som beskrevet nedenfor.

IL-B30 fra andre pattedyrarter kan kloneres og isoleres ved hjelp av kryssartshybridisering av nært beslektede arter. Homologi kan være relativt lav mellom fjernt beslektede arter, og hybridisering av relativt nært beslektede arter er således

tilrådelig. Alternativt kan fremstilling av et antistoff-preparat som oppviser mindre artsspesifisitet være anvendelig ved ekspresjonskloningsmetoder.

5 VII. Fremstilling av IL-B30; etterligninger

DNA som koder for IL-B30 eller fragmenter av dette, kan oppnås ved hjelp av kjemisk syntese, screening av cDNA-biblioteker eller screening av genomiske biblioteker preparert fra mange forskjellige cellelinjer eller vevsprøver. Se f.eks. 10 Okayama og Berg (1982), Mol. Cell. Biol., 2:161-170; Gubler og Hoffman (1983), Gene, 25:263-269; og Glover (red., 1984), DNA Cloning: A Practical Approach, IRL Press, Oxford. Alternativt gir sekvensene beskrevet heri anvendelige PCR-primere eller tillater syntetisk eller annen fremstilling av egnede gener 15 som koder for et IL-B30, inkludert naturlig forekommende utførelsesformer.

Dette DNA kan uttrykkes i mange forskjellige vertsceller for syntese av et fullengdet IL-B30 eller fragmenter, som i sin tur f.eks. kan anvendes for å danne polyklonale 20 eller monoklonale antistoffer; for bindingsundersøkelser; for konstruksjon og ekspresjon av modifiserte molekyler; og for struktur-/funksjonsstudier.

Vektorer, som anvendt heri, omfatter plasmider, virus, bakteriofager, integrerbare DNA-fragmenter og andre 25 vehikler som muliggjør integrering av DNA-fragmenter i vertens genom. Se f.eks. Pouwels et al. (1985 og supplementer), Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y.; og Rodriguez et al. (1988) (red.), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworth, Boston, MA.

30 For oppfinnelsens formål er DNA-sekvenser operabelt bundet når de er funksjonelt beslektet med hverandre. DNA for en presekvens eller sekretorisk leder er f.eks. operabelt bundet til et polypeptid hvis det blir uttrykt som et pre-protein eller deltar i dirigering av polypeptidet til celle- 35 membranen, eller i sekresjon av polypeptidet. En promotor er operabelt bundet til en kodingssekvens hvis den kontrollerer transkripsjon av polypeptidet; et ribosombindingssete er operabelt bundet til en kodingssekvens hvis det er posisjonert til å tillate translasjon. Vanligvis betyr operabelt bundet

sammenhengende og i leseramme, men visse genetiske elementer, slik som repressorgener, er imidlertid ikke bundet sammen sammenhengende, men bindes allikevel til operatorsekvenser som i sin tur kontrollerer ekspresjon. Se f.eks. Rodrigues et al.,
 5 kapittel 10, s. 205-236; Balbas og Bolivar (1990), *Methods in Enzymology*, 185:14-37; og Ausubel et al. (1993), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene and Wiley, NY.

Representative eksempler på egnede ekspresjonsvektorer inkluderer pCDNA1; pCD, se Okayama et al. (1985),
 10 *Mol. Cell Biol.*, 5:1136-1142; pMC1neo-poly-A, se Thomas et al. (1987), *Cell*, 51:503-512, og en baculovirusvektor, slik som pAC373 eller pAC610. Se f.eks. Miller (1988), *Ann. Rev. Microbiol.*, 42:177-199.

Det vil ofte være ønsket å uttrykke IL-B30-polypeptid
 15 i et system som tilveiebringer et spesifikt eller definert glykosyleringsmønster. Se f.eks. Luckow og Summers (1988), *Bio/Technology*, 6:47-55; og Kaufman (1990), *Meth. Enzymol.*, 185:487-511.

IL-B30, eller et fragment av dette, kan konstrueres
 20 til en fosfatidylinositol (PI) bundet til en cellemembran, men kan fjernes fra membranene ved behandling med et fosfatidyl-inositolspaltingsenzym, f.eks. fosfatidylinositolfosfolipase-C. Dette frigjør antigenet i en biologisk aktiv form og tillater rensing ved hjelp av standardprosedyrer for protein-
 25 kjemi. Se f.eks. Low (1989), *Biochem. Biophys. Acta*, 988:427-454; Tse et al. (1985), *Science*, 230:1003-1008; Brunner et al. (1991), *J. Cell Biol.*, 114:1275-1283.

Nå som IL-B30 er blitt karakterisert, kan fragmenter eller derivater av dette fremstilles ved hjelp av konvensjo-
 30 nelle prosesser for syntetisering av peptider. Disse inkluderer slike prosesser som er beskrevet av Stewart og Young (1984), *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Co., Rockford, IL; Bodanszky og Bodanszky (1984), *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, New York; Bodanszky
 35 (1984), *The Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, New York; og Villafranca (red., 1991), *Techniques in Protein Chemistry II*, Academic Press, San Diego, CA.

VIII. Anvendelser

Det tilveiebringes reagenser som vil finne anvendelse i diagnostikken, som beskrevet annet sted heri, f.eks. ved IL-B30-formidlede tilstander, eller nedenfor under beskrivelsen
 5 av sett for diagnose. Genet kan være anvendelig i rettsvitenskapen, f.eks. for å skjelne gnagere fra mennesker, eller som en markør for å skjelne mellom forskjellige celler som oppviser forskjellige ekspresjons- eller modifikasjonsmønstre.

Det tilveiebringes også reagenser med betydelig
 10 kommersiell og/eller terapeutisk potensial. IL-B30 (naturlig forekommende eller rekombinant), fragmenter av dette og antistoffer mot dette, sammen med forbindelser identifisert som å ha bindingsaffinitet for IL-B30, bør være anvendelige som reagenser for undervisning i teknikker for molekylær-
 15 biologi, immunologi eller fysiologi. Passende sett kan prepareres med reagensene, f.eks. i praktiske laboratorieøvelser, i produksjon eller ved anvendelse av proteiner, antistoffer, kloningsmetoder, histologi etc.

Reagensene vil også være anvendelige ved behandling
 20 av tilstander forbundet med unormal fysiologi eller utvikling, inkludert inflammatoriske tilstander. De kan være anvendelige ved *in vitro*-tester for tilstedeværelse eller fravær av interaktive komponenter som kan samsvare med vellykkethet av spesielle behandlingsstrategier. Spesielt vil modulering av
 25 fysiologi av forskjellige celler, f.eks. hematopoetiske eller lymfoide celler, oppnås ved hjelp av egnede metoder for behandling ved anvendelse av preparatene tilveiebrakt heri. Se f.eks. Thomson (1994; red.), *The Cytokine Handbook* (2. utg.), Academic Press, San Diego; Metcalf og Nicola (1995), *The*
 30 *Hematopoietic Colony Stimulating Factors*, Cambridge University Press; og Aggarwal og Gutterman (1991), *Human Cytokines*, Blackwell Pub.

En sykdom eller en forstyrrelse assosiert med unormal ekspresjon eller unormal signalisering fra et IL-B30 burde
 35 f.eks. være et sannsynlig mål for en agonist eller antagonist. Det nye cytokin burde spille en rolle ved regulering eller utvikling av hematopoetiske celler, f.eks. lymfoidceller, som påvirker immunologiske responser, f.eks. inflammasjon og/eller

autoimmunforstyrrelser. Alternativt kan det påvirke vaskulær fysiologi eller utvikling eller neuronale effekter.

Cytokinet burde spesielt formidle, i forskjellige sammenhenger, cytokinsyntese av cellene, proliferasjon etc.

- 5 Antagonister av IL-B30, slik som muteinvarianter av en naturlig forekommende form av IL-B30, eller blokkerende anti-stoffer, kan tilveiebringe en selektiv og kraftig måte for å blokkere immunresponser, f.eks. ved situasjoner som inflammatoriske eller autoimmunresponser. Se også Samter et al.
- 10 (red.), Immunological Diseases, vol. 1 og 2, Little, Brown and Co.

- Visse kombinasjonspreparater ville dessuten også være anvendelige, f.eks. med andre modulatorer av inflammasjon. Slike andre molekyler kan inkludere steroider, andre versjoner
- 15 av IL-6 og/eller G-CSF, inkludert artsvarianter eller virus-homologer og deres respektive antagonister.

- Forskjellige unormale tilstander er kjent i hver av celletypene vist å produsere IL-B30-mRNA ved hjelp av Northern blot-analyse. Se Berkow (red.), The Merck Manual of Diagnosis
- 20 and Therapy, Merck & Co., Rahway, NJ; Thorn et al., Harrison's Principles of Internal Medicine, McGraw-Hill, N.Y.; og Weatherall et al. (red.), Oxford Textbook of Medicine, Oxford University Press, Oxford. Mange andre medisinske tilstander og sykdommer involverer aktivering av makrofager eller mono-
- 25 cytter, og mange av disse vil reagere på behandling med en agonist eller antagonist tilveiebrakt heri. Se f.eks. Stites og Terr (red., 1991), Basic and Clinical Immunology, Appleton og Lange, Norwalk, Connecticut; og Samter et al. (red.), Immunological Diseases, Little, Brown and Co. Disse problemer
- 30 burde være mottakelige for forebyggelse eller behandling ved anvendelse av preparater tilveiebrakt heri. Lokaliseringen i pankreatiske langerhanske celleøyer antyder en mulig relevans til diabetes.

- IL-B30, antagonister, antistoffer etc. kan renses og
- 35 deretter administreres til en pasient, enten det er et dyr eller et menneske. Disse reagenser kan kombineres for terapeutisk anvendelse med ytterligere aktive eller inerte ingredienser, f.eks. i konvensjonelle, farmasøytisk akseptable bærere eller fortynningsmidler, f.eks. immunogene adjuvanter,

sammen med fysiologisk uskadelige stabilisatorer, eksipienser eller konserveringsmidler. Disse kombinasjoner kan sterilfiltreres og plasseres i doseringsformer, som ved lyofilisering, i doseringsampuller, eller lages i stabiliserte vandige preparater. Foreliggende oppfinnelse omfatter også anvendelse av antistoffer eller bindingsfragmenter av disse, inkludert former som ikke er komplementbinding.

Legemiddelscreening ved anvendelse av IL-B30 eller fragmenter derav kan utføres for å identifisere forbindelser med bindingsaffinitet til IL-B30, eller andre relevante biologiske effekter på IL-B30-funksjoner, inkludert isolering av assosierte komponenter. Etterfølgende biologiske analyser kan deretter benyttes til å bestemme hvorvidt forbindelsen har indre stimulerende aktivitet og derfor er en blokkerer eller antagonist ved at den blokkerer aktiviteten av cytokinet. Likeledes kan en forbindelse med indre stimulerende aktivitet aktivere signalreaksjonsveien og er således en agonist ved at den simulerer aktiviteten av IL-B30. Foreliggende oppfinnelse omfatter dessuten den terapeutiske anvendelse av blokkeringsantistoffer mot IL-B30 som antagonister, og av stimulerende antistoffer som agonister. Denne metoden burde være spesielt anvendelig med andre IL-B30-artsvarianter.

Mengden av reagenser nødvendig for effektiv terapi vil avhenge av mange forskjellige faktorer, inkludert administreringsmåter, målsete, pasientens fysiologiske tilstand og andre administrerte medikamenter. Behandlingsdoseringer bør således titreres for å optimalisere sikkerhet og effektivitet. Typisk kan doseringer anvendt *in vitro* tilveiebringe anvendelig rettleiding om mengdene anvendelig for administrering *in situ* av disse reagenser. Dyretesting av effektive doser for behandling av spesielle sykdommer vil gi ytterligere forhåndsindikasjon på dosering til mennesker. Forskjellige vurderinger er f.eks. beskrevet av Gilman et al. (red., 1990), Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8. utg., Pergamon Press; og Remington's Pharmaceutical Sciences, 17. utg. (1990), Mack Publishing Co., Easton, PA. Metoder for administrering er diskutert i disse og nedenfor, f.eks. for oral, intravenøs, intraperitoneal eller intramuskulær administrering, transdermal diffusjon og andre. Farmasøytisk aksep-

table bærere vil inkludere vann, fysiologisk saltvann, buffere og andre forbindelser beskrevet f.eks. i Merck Index, Merck & Co., Rahway, New Jersey. Doseringsområder vil vanligvis forventes å være i konsentrasjonsmengder lavere enn 1 mM, typisk
 5 lavere enn ca. 10 μ M, ofte lavere enn ca. 100 nM, fortrinnsvis lavere enn ca. 10 pM (pikomolar), og mest foretrukket lavere enn ca. 1 fM (femtomolar), med en passende bærer. Formuleringer med langsom frigivelse, eller en apparatur med langsom frigivelse, vil ofte benyttes for kontinuerlig eller langtids-
 10 administrering. Se f.eks. Langer (1990), *Science*, 249:1527-1533.

IL-B30, fragmenter av dette og antistoffer mot dette eller dets fragmenter, antagonist og agonister kan administreres direkte til verten som skal behandles, eller, avhengig
 15 av størrelsen av forbindelsene, det kan være ønskelig å konjugere dem til bærerproteiner, slik som ovalbumin eller serumalbumin, før administrering. Terapeutiske formuleringer kan administreres i mange konvensjonelle doseformuleringer. Selv om det er mulig at den aktive ingrediens kan administreres
 20 alene, er det foretrukket å presentere den som en farmasøytisk formulering. Formuleringer omfatter typisk minst én aktiv ingrediens, som definert ovenfor, sammen med én eller flere akseptable bærere. Hver bærer bør være både farmasøytisk og fysiologisk akseptabel i den betydning at den er kompatibel
 25 med de andre ingredienser og ikke skadelig for pasienten. Formuleringer inkluderer dem som er egnet for oral, rektal, nasal, topisk eller parenteral (inkludert subkutan, intramuskulær, intravenøs og intradermal) administrering. Formuleringene kan passende presenteres i enhetsdoseform og kan
 30 prepareres ved hjelp av enhver metode vel kjent i farmasiteknikken. Se f.eks. Gilman et al. (red.) (1990), *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics* (8. utg.), Pergamon Press; og Remington's *Pharmaceutical Sciences* (17. utg.) (1990), Mack Publishing Co., Easton, Penn.; Avis et
 35 al. (red., 1993), *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Dekker, New York; Lieberman et al. (red., 1990), *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, Dekker, New York; og Lieberman et al. (red., 1990), *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, Dekker, New York. Terapien ifølge fore-

liggende oppfinnelse kan kombineres med eller anvendes i forbindelse med andre midler, f.eks. andre cytokiner, inkludert IL-6 eller G-CSF, eller deres respektive antagonister.

Både naturlig forekommende og rekombinante former av IL-B30 ifølge oppfinnelsen er spesielt anvendelige i sett og analysemetoder som er i stand til å screene forbindelser for bindingsaktivitet til proteinene. Flere metoder for automatisering av analyser er blitt utviklet i de senere år for å tillate screening av titusener forbindelser på kort tid. Se f.eks. Fodor, et al. (1991), *Science*, 251:767-773, som beskriver metoder for testing av bindingsaffinitet ved hjelp av mangfoldige definerte polymerer syntetisert på et fast substrat. Utviklingen av egnede analyser kan lettes betydelig ved tilgjengeligheten av store mengder rensset, oppløselig IL-B30, tilveiebrakt ved hjelp av foreliggende oppfinnelse.

Andre metoder kan anvendes for å bestemme de kritiske rester i IL-B30-IL-B30-reseptorinteraksjoner. Mutasjonsanalyse kan utføres, se f.eks. Somoza et al. (1993), *J. Exptl. Med.*, 178:549-558, for å bestemme spesifikke rester som er kritiske ved interaksjonen og/eller signaliseringen. PHD (Rost og Sander (1994), *Proteins*, 19:55-72) og DSC (King og Sternberg (1996), *Protein Sci.*, 5:2298-2310) kan tilveiebringe forutsigelser om sekundær struktur av α -heliks (H), β -tråd (E) eller kveil (L). Helikser A og D er mest viktige ved reseptorinteraksjon, og D-heliksen er det mest viktige området. Heliks A vil strekke seg i mennesket fra ca. pro(7) til his(27), mens heliks D vil strekke seg fra ca. trp(135) til gly(162). Overflateeksponerte rester vil påvirke reseptorbinding, mens innleirede rester vil påvirke den generelle struktur. Forutsagte rester med spesiell betydning vil sannsynligvis tilsvare arg(146), ser(147), gln(149), ala(150), ala(153), val(154), ala(156), arg(157), ala(160) og his(161).

Antagonister kan f.eks. vanligvis finnes når først antigenet er blitt strukturert definert, f.eks. ved hjelp av data for tertiærstruktur. Testing av potensielle reagerende analoger er nå mulig ved utviklingen av høyautomatiserte analysemetoder ved anvendelse av et rensset IL-B30. Nye agonister og antagonister vil spesielt bli oppdaget ved anvendelse av screeningsteknikker beskrevet heri. Av spesiell betydning

er forbindelser funnet å ha en kombinert bindingsaffinitet for et spektrum av IL-B30-molekyler, f.eks. forbindelser som kan tjene som antagonister for spesifikke varianter av IL-B30.

En metode for legemiddelscreening benytter eukaryote eller prokaryote vertsceller som er stabilt transformert med rekombinante DNA-molekyler som uttrykker et IL-B30. Celler kan isoleres som uttrykker et IL-B30 isolert fra andre molekyler. Slike celler, enten levende eller i fiksert form, kan anvendes for standard bindingspartner-bindingsanalyser. Se også Parce et al. (1989), *Science*, 246:243-247; og Owicki et al. (1990), *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 87:4007-4011, som beskriver sensitive metoder for å påvise cellulære responser.

En annen teknikk for legemiddelscreening involverer en metode som tilveiebringer høy gjennomløpsscreening for forbindelser med egnet bindingsaffinitet til et IL-B30, og er beskrevet i detalj av Geysen, europeisk patentsøknad 84/03564, publisert 13. september 1984. Først syntetiseres et stort antall forskjellige små peptidtestforbindelser på et fast substrat, f.eks. plastikkpinner eller en annen passende overflate, se Fodor et al. (1991). Alle pinnene reageres deretter med oppløst, urenset eller oppløst, rensset IL-B30 og vaskes. Det neste trinn involverer påvisning av bundet IL-B30.

Rasjonell legemiddelutforming kan også være basert på strukturelle undersøkelser av molekyllformene av IL-B30 og andre effektorer eller analoger. Effektorer kan være andre proteiner som formidler andre funksjoner som respons på binding, eller andre proteiner som vanligvis reagerer med IL-B30, f.eks. en reseptor. Ett middel for å bestemme hvilke seter som reagerer med spesifikke andre proteiner, er en fysisk strukturbestemmelse, f.eks. røntgenkrystallografi eller todimensjonale NMR-teknikker. Disse vil gi veiledning om hvilke aminosyrerester som danner molekylære kontaktområder, som modellert f.eks. mot andre cytokinreseptormodeller. For en detaljert beskrivelse av proteinstrukturbestemmelse, se f.eks. Blundell og Johnson (1976), *Protein Crystallography*, Academic Press, New York.

IX. Sett

Foreliggende oppfinnelse omfatter også anvendelse av IL-B30-proteiner, fragmenter derav, peptider og deres fusjonsprodukter i forskjellige diagnostiske sett, og metoder for

5 påvisning av tilstedeværelse av et annet IL-B30 eller en bindingspartner. Typisk vil settet inneholde et rom som enten inneholder et definert IL-B30-peptid eller et gensegment eller et reagens som gjenkjenner det ene eller det andre, f.eks. IL-B30-fragmenter eller antistoffer.

10 Et sett for bestemmelse av bindingsaffiniteten av en testforbindelse til et IL-B30 vil typisk omfatte en testforbindelse; en merket forbindelse, f.eks. en bindingspartner eller et antistoff med kjent bindingsaffinitet for IL-B30; en kilde for IL-B30 (naturlig forekommende eller rekombinant); og

15 et middel for separasjon av bundet fra fri, merket forbindelse, slik som en fast fase for immobilisering av molekylet. Når forbindelsene er screenet, kan de forbindelser som har egnet bindingsaffinitet til antigenet evalueres i passende biologiske analyser vel kjent i teknikken, for å bestemme hvorvidt

20 de virker som agonister eller antagonister mot IL-B30-signaleringsreaksjonsveien. Tilgjengeligheten av rekombinante IL-B30-polypeptider tilveiebringer også veldefinerte standarder for kalibrering av slike analyser.

Et foretrukket sett for bestemmelse av konsentrasjonen av f.eks. et IL-B30 i en prøve vil typisk omfatte en

25 merket forbindelse, f.eks. bindingspartner eller antistoff, med kjent bindingsaffinitet for antigenet, en kilde for cytokin (naturlig forekommende eller rekombinant) og et middel for separasjon av den bundne fra den frie, merkede forbindelse,

30 f.eks. en fast fase for immobilisering av IL-B30. Rom inneholdende reagenser og instruksjoner vil vanligvis tilveiebringes.

Antistoffer, inkludert antigenbindingsfragmenter, spesifikke for IL-B30 eller fragmenter er anvendelige i

35 diagnostikken for å påvise tilstedeværelse av forhøyede nivåer av IL-B30 og/eller dets fragmenter. Slike diagnostiske analyser kan benytte lysater, levende celler, fikserte celler, immunfluorescens, cellekulturer, kroppsfluider, og kan videre involvere påvisning av antigener relatert til antigenet i

serum, eller lignende. Diagnostiske analyser kan være homogene (uten et separasjonstrinn mellom fritt reagens og antigen-bindingspartnerkompleks) eller heterogene (med et separasjonstrinn). Forskjellige kommersielle analyser eksisterer, slik
 5 som radioimmunanalyse (RIA), enzymbundet immunsorbentanalyse (ELISA), enzymimmunanalyse (EIA), enzym-multiplisert immun-analyseteknikk (EMIT), substratmerket fluorescensimmunanalyse (SLFIA) og lignende. Se f.eks. Van Vunakis et al. (1980), Meth. Enzymol., 70:1-525; Harlow og Lane (1980), Antibodies: A
 10 Laboratory Manual, CSH Press, NY; og Coligan et al. (red., 1993), Current Protocols in Immunology, Greene and Wiley, NY.

Antiidiotypiske antistoffer kan finne lignende anvendelse for å diagnostisere tilstedeværelse av antistoffer mot et IL-B30, fordi en slik tilstedeværelse kan være diagnostisk
 15 for forskjellige unormale tilstander. Overproduksjon av IL-B30 kan f.eks. resultere i produksjon av forskjellige immunologiske reaksjoner som kan være diagnostiske for unormale fysiologiske tilstander, spesielt ved proliferative celledilstander, slik som cancer, eller unormal aktivering eller
 20 differensiering. Det tilgjengelige fordelingsmønster tilveiebringer dessuten informasjon om at cytokinet blir uttrykt i pankreasøyceller, hvilket antyder muligheten for at cytokinet kan være involvert i funksjonen av dette organ, f.eks. i en diabetesrelevant medisinsk tilstand.

Ofte leveres reagensene for diagnostiske analyser i sett for å optimalisere sensitiviteten av analysen. For foreliggende oppfinnelse, avhengig av analysens beskaffenhet, protokollen og markøren, tilveiebringes enten merket eller umerket antistoff eller bindingspartner, eller merket IL-B30.
 30 Dette er vanligvis i forbindelse med andre additiver, slik som buffere, stabilisatorer, materialer nødvendig for signalproduksjon, slik som substrater for enzymer og lignende. Settet vil også fortrinnsvis inneholde instruksjoner for riktig bruk og fjerning av innholdet etter bruk. Typisk inneholder settet rom for hvert anvendelig reagens. Reagensene tilveiebringes ønskelig som et tørt, lyofilisert pulver, der reagensene kan rekonstitueres i et vandig medium som gir passende konsentrasjoner av reagenser for utførelse av analysen.

Mange av de ovennevnte bestanddeler av legemiddel-screeningen og de diagnostiske analyser kan benyttes uten modifikasjon eller de kan modifiseres på mange forskjellige måter. Merking kan f.eks. oppnås ved kovalent eller ikke-
5 kovalent binding av en komponent som direkte eller indirekte gir et påvisbart signal. I enhver av disse analyser kan bindingspartneren, testforbindelsen, IL-B30 eller antistoffer mot dette merkes enten direkte eller indirekte. Muligheter for direkte merking inkluderer markørgrupper: radiomarkører, slik
10 som ^{125}I , enzymer (US-patent nr. 3 645 090), slik som peroksidase og alkalisk fosfatase, og fluorescerende markører (US-patent nr. 3 940 475), som kan overvåke endringen i fluorescensintensitet, bølgelengdeskift eller fluorescenspolarisering. Muligheter for indirekte merking inkluderer biotin-
15 ylering av én bestanddel, etterfulgt av binding til avidin koplet til en av de ovennevnte markørgrupper.

Det finnes også et stort antall metoder for separering av bundet fra fritt IL-B30, eller alternativt bundet fra fri testforbindelse. IL-B30 kan immobiliseres på forskjellige matrikser, etterfulgt av vasking. Egnede matrikser
20 inkluderer plast, slik som en ELISA-plate, filtre og kuler. Se f.eks. Coligan et al. (red., 1993), Current Protocols in Immunology, vol. 1, kapittel 2, Greene and Wiley, NY. Andre egnede separasjonsteknikker inkluderer, uten begrensning,
25 fluorescein-antistoff-magnetiserbar partikkel-metoden, beskrevet av Rattle et al. (1984), Clin. Chem., 30:1457-1461, og den doble antistoff-magnetisk partikkelseparasjon, som beskrevet i US-patent nr. 4 659 678.

Metoder for binding av proteiner eller deres fragmen-
30 ter til de forskjellige markører er blitt omfattende rapportert i litteraturen og fordrer ingen detaljert diskusjon her. Mange av teknikkene involverer anvendelse av aktiverte karboksylgrupper, enten ved anvendelse av karbodiimid eller aktive estere for å danne peptidbindinger, dannelse av tio-
35 etere ved reaksjon av en merkaptogruppe med et aktivert halogen, slik som kloracetyl, eller et aktivert olefin, slik som maleimid, for binding eller lignende. Fusjonsproteiner vil også finne anvendelse i disse metoder.

Et annet diagnostisk aspekt involverer anvendelse av oligonukleotid- eller polynukleotidsekvenser tatt fra sekvensen til et IL-B30. Disse sekvenser kan anvendes som prober for påvisning av nivåer av IL-B30-budskapet i prøver fra pasienter mistenkt for å ha en unormal tilstand, f.eks. inflammatorisk eller autoimmun. Fordi cytokinet kan være en markør eller formidler for aktivering, kan det være anvendelig for å bestemme antallet aktiverte celler som skal bestemmes, f.eks. når ytterligere terapi kan være nødvendig, f.eks. på en forebyggende måte før effektene blir og utvikler seg til betydningsfulle. Fremstillingen av både RNA- og DNA-nukleotidsekvenser, merkingen av sekvensene og den foretrukne størrelse av sekvensene er blitt omfattende beskrevet og diskutert i litteraturen. Se f.eks. Langer-Safer et al. (1982), Proc. Nat'l. Acad. Sci., 79:4381-4385; Caskey (1987), Science, 236:962-967; og Wilchek et al. (1988), Anal. Biochem., 171:1-32.

Diagnostiske sett som også tester for den kvalitative eller kvantitative ekspresjon av andre molekyler er også inkludert. Diagnose eller prognose kan avhenge av kombinasjonen av mange indikasjoner anvendt som markører. Sett kan således teste for kombinasjoner av markører. Se f.eks. Viallet et al. (1989), Progress in Growth Factor Res., 1:89-97. Andre sett kan anvendes for å evaluere andre celleundersett.

25

X. Isolering av en IL-B30-reseptor

Når en ligand for en spesifikk ligand-reseptor-interaksjon er blitt isolert, eksisterer metoder for å isolere reseptoren. Se Gearing et al. (1989), EMBO J., 8:3667-3676. Metoder for å merke IL-B30-cytokinet uten å forstyrre bindingen til dets reseptor, kan f.eks. bestemmes. En affinitetsmarkør kan f.eks. fusjoneres til enten amino- eller karboksylterminalen av liganden. En slik markør kan være en FLAG-epitopmarkør eller f.eks. et Ig- eller Fc-domene. Et ekspresjonsbibliotek kan screenes for spesifikk binding av cytokinet, f.eks. ved celledatering, eller annen screening for å påvise subpopulasjoner som uttrykker en slik bindingskomponent. Se f.eks. Ho et al. (1993), Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 90:11267-11271; og Liu et al. (1994), J. Immunol.,

35

152:1821-29. Alternativt kan en panoreringsmetode benyttes. Se f.eks. Seed og Aruffo (1987), Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 84:3365-3369.

Proteinkryssbindingsteknikker med markør kan anvendes
 5 for å isolere bindingspartnere for IL-B30-cytokinet. Dette vil tillate identifisering av proteiner som spesifikt reagerer med cytokinet, f.eks. på en ligand-reseptorlignende måte.

Tidlige eksperimenter vil utføres for å bestemme hvorvidt de kjente IL-6- eller G-CSF-reseptorkomponenter er
 10 involvert i respons(er) på IL-B30. Det er også meget mulig at disse funksjonelle reseptorkomplekser kan dele mange, eller alle, komponenter med et IL-B30-reseptorkompleks, enten en spesifikk reseptorsubenhhet eller en delaktig reseptorsubenhhet.

15 Eksempler

I. Generelle metoder

Mange av standardmetodene nedenfor er beskrevet eller referert til i f.eks. Maniatis et al. (1982), Molecular
 20 Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY; Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2. utg.), vol. 1-3, CSH Press, NY; Ausubel et al., Biology Greene Publishing Associates, Brooklyn, NY; eller Ausubel et al. (1987, og supple-
 25 menter), Current Protocols in Molecular Biology, Wiley/Greene, NY; Innis et al. (red., 1990), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, NY. Metoder for proteinrensing inkluderer slike metoder som ammoniumsulfat-utfelling, kolonnekromatografi, elektroforese, sentrifugering,
 30 krystallisering og andre. Se f.eks. Ausubel et al. (1987, og periodiske supplementer); Deutscher (1990), "Guide to Protein Purification", Methods in Enzymology, vol. 182, og andre volumer i denne serien; Coligan et al. (1995 og supplementer), Current Protocols in Protein Science, John Wiley and Sons, New
 35 York, NY; P. Matsudaira (red., 1993), A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing, Academic Press, San Diego, CA; og produsentens litteratur for anvendelse av proteinrensningsprodukter, f.eks. Pharmacia, Piscataway, NJ, eller Bio-Rad, Richmond, CA. Kombinasjon med rekombinante

teknikker tillater fusjon til passende segmenter (epitop-markører), f.eks. til en FLAG-sekvens eller en ekvivalent som f.eks. kan fusjoneres via en proteasefjernbar sekvens. Se f.eks. Hochuli (1989), *Chemische Industrie*, 12:69-70; Hochuli
 5 (1990), "Purification of Recombinant Proteins with Metal Chelate Absorbent", i Setlow (red.), *Genetic Engineering, Principle and Methods*, 12:87-98, Plenum Press, NY; og Crowe et al. (1992), *QIAexpress: The High Level Expression & Protein Purification System*, QUIAGEN, Inc., Chatsworth, CA.

10 Standard immunologiske teknikker er f.eks. beskrevet av Hertzberg et al. (red., 1996), *Weir's Handbook of Experimental Immunology*, vol. 1-4, Blackwell Science; Coligan (1991), *Current Protocols in Immunology*, Wiley/Greene, NY; og *Methods in Enzymology*, vol. 70, 73, 74, 84, 92, 93, 108, 116,
 15 121, 132, 150, 162 og 163. Cytokinanalyser er f.eks. beskrevet av Thomson (red., 1994), *The Cytokine Handbook* (2. utg.), Academic Press, San Diego; Metcalf og Nicola (1995), *The Hematopoietic Colony Stimulating Factors*, Cambridge University Press; og Aggarwal og Gutterman (1991), *Human Cytokines*,
 20 Blackwell Pub.

Analysen for vaskulære biologiske aktiviteter er vel kjent i teknikken. De vil dekke angiogene og angiostatisk aktivitet i tumor eller andre vev, f.eks. proliferasjon av arteriell glattmuskel (se f.eks. Koyoma et al. (1996), *Cell*,
 25 87:1069-1078), monocytadhesjon til vaskulært epitel (se McEvoy et al. (1997), *J. Exp. Med.*, 185:2069-2077), etc. Se også Ross (1993), *Nature*, 362:801-809; Reikter og Gordon (1995), *Am. J. Pathol.*, 147:668-677; Thyberg et al. (1990), *Atherosclerosis*, 10:966-990; og Gumbiner (1996), *Cell*, 84:345-
 30 357.

Analysen for biologiske aktiviteter av nerveceller er f.eks. beskrevet av Wouterlood (red., 1995), *Neuroscience Protocols modules*, 10, Elsevier; *Methods in Neurosciences*, Academic Press; og *Neuromethods*, Humana Press, Totowa, NJ.
 35 Metodikk for utviklingssystemer er f.eks. beskrevet av Meisami (red.), *Handbook of Human-Growth and Developmental Biology*, CRC Press; og Chrispeels (red.), *Molecular Techniques and Approaches in Developmental Biology Interscience*.

FACS-analyser er beskrevet av Melamed et al. (1990), Flow Cytometry and Sorting, Wiley-Liss, Inc., New York. NY; Shapiro (1988), Practical Flow Cytometry, Liss, New York, NY; og Robinson et al. (1993), Handbook of Flow Cytometry Methods, 5 Wiley-Liss, New York, NY.

II. Kloning av humant IL-B30

Sekvensen av genet er vist i tabell 1. Sekvensen er avledet fra et cDNA-bibliotek dannet fra melanocytter, foster- 10 hjerte og gravid livmor. Den er også funnet i en cDNA-biblioteksekvens avledet fra pankreasøyceller. Disse sekvenser tillater fremstilling av PCR-primere eller prober for å bestemme cellulær fordeling av genet. Sekvensene tillater isolering av genomisk DNA som koder for budskapet.

15 Ved anvendelse av proben eller PCR-primene blir forskjellige vev eller celletyper undersøkt for å bestemme cellulær fordeling. PCR-produkter klones ved anvendelse av f.eks. et TA-kloningssett (Invitrogen). De resulterende cDNA-plasmider sekvenseres fra begge terminaler på et automatisert 20 sekvenseringsapparat (Applied Biosystems).

III. Cellulær ekspresjon av IL-B30

En passende probe eller primere spesifikke for cDNA som koder for primat-IL-B30, fremstilles. Proben blir typisk 25 merket ved f.eks. vilkårlig priming. Ekspresjonen er antakeligvis i de beskrevne celletyper og kanskje også i pankreasøyceller. Southern-analyse: DNA (5 µg) fra primært amplifisert cDNA-bibliotek ble spaltet med passende restriksjonsenzymmer for å frigjøre innføyelsene, ble kjørt på en 1 % agarosegel og 30 overført til en nylonmembran (Schleicher og Schuell, Keene, NH).

Prøver for isolering av humant mRNA inkluderer: perifere mononukleære blodceller (monocytter, T-celler, NK-celler, granulocytter, B-celler), hvilende (T100); perifere mononukle- 35 ære blodceller aktivert med anti-CD3 i 2, 6, 12 timer, sammenslått (T101); T-celle, TH0-klon Mot 72, hvilende (T102); T-celle, TH0-klon Mot 72, aktivert med anti-CD28 og anti-CD3 i 3, 6, 12 timer, sammenslått (T103); T-celle, TH0-klon Mot 72, anergisk behandlet med spesifikt peptid i 2, 7, 12 timer,

sammenslått (T104); T-celle, TH1-klon HY06, hvilende (T107); T-celle, TH1-klon HY06, aktivert med anti-CD28 og anti-CD3 i 3, 6, 12 timer, sammenslått (T108); T-celle, TH1-klon HY06, anergisk behandlet med spesifikt peptid i 2, 6, 12 timer, sammenslått (T109); T-celle, TH2-klon HY935, hvilende (T110); T-celle, TH2-klon HY935, aktivert med anti-CD28 og anti-CD3 i 2, 7, 12 timer, sammenslått (T111); T-celletumorlinjer Jurkat og Hut78, hvilende (T117); T-cellekloner, sammenslått AD130.2, Tc783.12, Tc783.13, Tc783.58, Tc782.69, hvilende (T118); T-celler, vilkårlige $\gamma\delta$ -T-cellekloner, hvilende (T119); CD28-T-celleklon; splenocytter, hvilende (B100); splenocytter, aktivert med anti-CD40 og IL-4 (B101); B-celle-EBV-linjer, sammenslått WT49, RSB, JY, CVIR, 721.221, RM3, HSY, hvilende (B102); B-cellelinje JY, aktivert med PMA og ionomycin i 1, 6 timer, sammenslått (B103); NK 20-kloner, sammenslått, hvilende (K100); NK 20-kloner, sammenslått, aktivert med PMA og ionomycin i 6 timer (K101); NKL-klon, avledet fra perifert blod fra LGL-leukemipasient, IL-2-behandlet (K106); hematopoetisk forløperlinje TF1, aktivert med PMA og ionomycin i 1, 6 timer, sammenslått (C100); U937-premonocyttisk linje, hvilende (M100); U937-premonocyttisk linje, aktivert med PMA og ionomycin i 1, 6 timer, sammenslått (M101); oppslemmede monocytter, aktivert med LPS, IFN γ , anti-IL-10 i 1, 2, 6, 12, 24 timer, sammenslått (M102); oppslemmede monocytter, aktivert med LPS, IFN γ , IL-10 i 1, 2, 6, 12, 24 timer, sammenslått (M103); oppslemmede monocytter, aktivert med LPS, IFN γ , anti-IL-10 i 4, 16 timer, sammenslått (M106); oppslemmede monocytter, aktivert med LPS, IFN γ , IL-10 i 4, 16 timer, sammenslått (M107); oppslemmede monocytter, aktivert med LPS i 1 time (M108); oppslemmede monocytter, aktivert med LPS i 6 timer (M109); DC 70 % CD1a⁺ fra CD34⁺-GM-CSF, TNF α , 12 dager, hvilende (D101); DC 70 % CD1a⁺ fra CD34⁺-GM-CSF, TNF α , 12 dager, aktivert med PMA og ionomycin i 1 time (D102); DC 70 % CD1a⁺ fra CD34⁺-GM-CSF, TNF α , 12 dager, aktivert med PMA og ionomycin i 6 timer (D103); DC 95 % CD1a⁺ fra CD34⁺-GM-CSF, TNF α , 12 dager, FACS-sortert, aktivert med PMA og ionomycin i 1, 6 timer, sammenslått (D104); DC 95 % CD14⁺, ex CD34⁺-GM-CSF, TNF α , 12 dager, FACS-sortert, aktivert med PMA og ionomycin, 1, 6 timer, sammenslått (D105); DC CD1a⁺- CD86⁺, fra

CD34⁺-GM-CSF, TNF α , 12 dager, FACS-sortert, aktivert med PMA og ionomycin i 1, 6 timer, sammenslått (D106); DC fra monocyttter, GM-CSF, IL-4, 5 dager, hvilende (D107); DC fra monocyttter, GM-CSF, IL-4, 5 dager, hvilende (D108); DC fra monocyttter, GM-CSF, IL-4, 5 dager, aktivert med LPS 4, 16 timer, sammenslått (D109); DC fra monocyttter, GM-CSF, IL-4, 5 dager, aktivert med TNF α , monocyttssupernatant, i 4, 16 timer, sammenslått (D110); epitelceller, ustimulerte; epitelceller, IL-1 β -aktiverte; lungefibroblastsarkomlinje MRC5, aktivert med PMA og ionomycin i 1, 6 timer, sammenslått (C101); nyreepitelkarsinomcellelinje CHA, aktivert med PMA og ionomycin i 1, 6 timer, sammenslått (C102). Ekspresjon av IL-B30-transkripsjon var meget høy i oppslemmede monocyttter aktivert med LPS, IFN γ , anti-IL-10, i 4, 16 timer, sammenslått (M106); oppslemmede monocyttter, aktivert med LPS, IFN γ , anti-IL-10, i 1, 2, 6, 12, 24 timer, sammenslått (M102); oppslemmede monocyttter, aktivert med LPS i 6 timer (M109); og oppslemmede monocyttter, aktivert LPS i 1 time (M108). Ekspresjon var høy i DC 95 % CD1a⁺ fra CD34⁺-GM-CSF, TNF α , 12 dager, FACS-sortert, aktivert med PMA og ionomycin i 1, 6 timer, sammenslått (D104); og NK 20-kloner, sammenslått, aktivert med PMA og ionomycin i 6 timer (K101). Lavere ekspresjon ble påvist i DC 70 % CD1a⁺ fra CD34⁺-GM-CSF, TNF α , 12 dager, aktivert med PMA og ionomycin i 6 timer (D103); DC 70 % CD1a⁺ fra CD34⁺-GM-CSF, TNF α , 12 dager, aktivert med PMA og ionomycin i 1 time (D102); T-celle, TH1-klon HY06, anergisk behandlet med spesifikt peptid i 2, 6, 12 timer, sammenslått (T109); perifere mononukleære blodceller, aktivert med anti-CD3 i 2, 6, 12 timer, sammenslått (T101); T-celle, TH0-klon Mot 72, aktivert med anti-CD28 og anti-CD3 i 3, 6, 12 timer, sammenslått (T103); splenocyttter, aktivert med anti-CD40 og IL-4 (B101); T-celle, TH0-klon Mot 72, anergisk behandlet med spesifikt peptid i 2, 7, 12 timer, sammenslått (T104); splenocyttter, hvilende (B100); T-celle, TH1-klon HY06, aktivert med anti-CD28 og anti-CD3 i 3, 6, 12 timer, sammenslått (T108); epitelceller, IL-1 β -aktiverte; oppslemmede monocyttter, aktivert med LPS, IFN γ , IL-10 i 4, 16 timer, sammenslått (M107); og B-cellelinje JY, aktivert med PMA og ionomycin i 1, 6 timer, sammenslått (B103). Påvisbar ekspresjon ble observert i DC fra monocyttter GM-CSF, IL-4, 5

dager, aktivert med LPS i 4, 16 timer, sammenslått (D109); T-celle, TH0-klon Mot 72, hvilende (T102); perifere mononukleære blodceller (monocyttter, T-celler, NK-celler, granulocytter, B-celler), hvilende (T100); T-celler, CD4⁺-CD45RO⁻-T-celler

5 polarisert i 27 dager i anti-CD28, IL-4 og anti-IFN- γ , TH2-polariserte, aktivert med anti-CD3 og anti-CD28 i 4 timer (T116); T-cellekloner, sammenslått AD130.2, Tc783.12, Tc783.13, Tc783.58, Tc782.69, hvilende (T118); U937-premonocytisk linje, hvilende (M100); hemato-

10 poetisk forløperlinje TF1, aktivert med PMA og ionomycin i 1, 6 timer, sammenslått (C100); T-celle, TH2-klon HY935, aktivert med anti-CD28 og anti-CD3 i 2, 7, 12 timer, sammenslått (T111); DC-CD1a⁺-CD86⁺ fra CD34⁺-GM-CSF, TNF α , 12 dager, FACS-sortert, aktivert med PMA og ionomycin i 1, 6 timer, sammen-

15 slått (D106); oppslemmede monocytter, aktivert med LPS, IFN γ , IL-10, i 1, 2, 6, 12, 24 timer, sammenslått (M103); DC fra monocytter, GM-CSF, IL-4, 5 dager, aktivert med TNF α , monocyttsupernatant, i 4, 16 timer, sammenslått (D110); DC fra monocytter, GM-CSF, IL-4, 5 dager, hvilende (D108); U937-

20 premonocytisk linje, aktivert med PMA og ionomycin i 1, 6 timer, sammenslått (M101); T-celler, vilkårlige $\gamma\delta$ -T-cellekloner, hvilende (T119); og T-celler, TH1-klon HY06, aktivert med anti-CD28 og anti-CD3 i 3, 6, 12 timer, sammenslått (T108). Intet signal ble påvist i de andre prøvene.

25 Som oppsummering viser fordelingen at IL-B30-nivåene er forhøyet i aktiverte makrofager, hvilket antyder en rolle ved inflammasjon; aktiverte Th1-celler som antyder en regulatorisk eller effektorrolle i T-hjelperundersett, spesielt Th1-immunresponser; og aktiverte dendrittceller som antyder en

30 rolle i antigenpresentasjon eller kimsenter-T- eller -B-celleinteraksjoner med DC.

Prøver for muse-mRNA-isolering inkluderer: hvilende musefibroblast-L-cellelinje (C200); Braf:ER (Braf-fusjon til østrogenreseptor) transfekterte celler, kontroll (C201);

35 Mell14⁺-naturlige T-celler fra milt, hvilende (T209); Mell14⁺-naturlige T-celler fra milt, stimulert med IFN γ , IL-12, og anti-IL-4, for å polarisere til TH1-celler, eksponert for IFN γ og IL-4 i 6, 12, 24 timer, sammenslått (T210); Mell14⁺-naturlige T-celler fra milt, stimulert med IL-4 og anti-IFN γ for å

polarisere til Th2-celler, eksponert for IL-4 og anti-IFN γ i 6, 13, 24 timer, sammenslått (T211); T-celler, TH1-polariserte (Mel14 bright, CD4⁺-celler fra milt, polarisert i 7 dager med IFN- γ og anti-IL-4 (T200); T-celler, T2 polarisert (Mel14
5 bright, CD4⁺-celler fra milt, polarisert i 7 dager med IL-4 og anti-IFN- γ (T201); T-celler, TH1-høypolarisert 3 x fra transgene Balb/C (se Openshaw et al. (1995), J. Exp. Med., 182: 1357-1367; aktivert med anti-CD3 i 2, 6, 24 timer, sammen-
slått; T202); T-celler, TH2-høypolarisert 3 x fra transgene
10 Balb/C (aktivert med anti-CD3 i 2, 6, 24 timer, sammenslått (T203); T-celler, TH1-høypolarisert 3 x fra transgene C57 bl/6 (aktivert med anti-CD3 i 2, 6, 24 timer, sammenslått; T212);
T-celler, TH2-høypolarisert 3 x fra transgene C57 bl/6 (akti-
15 vert med anti-CD3 i 2, 6, 24 timer, sammenslått; T213); T-
celler, TH1-høypolarisert (naturlige CD4⁺-T-celler fra trans-
gene Balb/C, polarisert 3 x med IFN γ , IL-12 og anti-IL-4;
stimulert med IGIF, IL-12, og anti IL-4 i 6, 12, 24 timer,
sammenslått); CD44⁻CD25⁺-pre-T-celler sortert fra thymus
20 (T204); TH1-T-celleklon D1.1, hvilende i 3 uker etter siste
stimulering med antigen (T205); TH1-T-celleklon D1.1, 10 μ g/ml
ConA-stimulert i 15 timer (T206); TH2- T-celleklon CDC35,
hvilende i 3 uker etter siste stimulering med antigen (T207);
TH2-T-celleklon CDC35, 10 μ g/ml ConA- stimulert i 15 timer
(T208); ustimulert B-cellelinje CH12 (B201); ustimulert moden
25 B-celleleukemicellelinje A20 (B200); ustimulerte store B-
celler fra milt (B202); B-celler fra total milt, LPS-aktiverte
(B203); metrizamidanrikede dendrittceller fra milt, hvilende
(D200); dendrittceller fra benmarg, hvilende (D201); ustиму-
lerte benmargsavledete dendrittceller uttynnet med anti-B220,
30 anti-CD3 og anti-klasse II, dyrket i GM-CSF og IL-4, (D202);
benmargsavledete dendrittceller uttynnet med anti-B220, anti-
CD3 og anti-klasse II, dyrket i GM-CSF og IL-4, stimulert med
anti-CD40 i 1, 5 dager, sammenslått (D203); monocyttecellelinje
RAW 264.7 aktivert med LPS i 4 timer (M200); benmargsmakro-
35 fager avledet med GM og M-CSF (M201); benmargsmakrofager
avledet med GM-CSF, stimulert med LPS, IFN γ og IL-10 i 24 timer
(M205); benmargsmakrofager avledet med GM-CSF, stimulert med
LPS, IFN γ og anti-IL-10 i 24 timer (M206); peritoneale makro-
fager (M207); makrofagcellelinje J774, hvilende (M202); makro-

fagcellelinje J774 + LPS + anti-IL-10 ved 0,5, 1, 3, 6, 12 timer, sammenslått (M203); makrofagcellelinje J774 + LPS + IL-10 ved 0,5, 1, 3, 5, 12 timer, sammenslått (M204); ustimulerte mastcellelinjer MC-9 og MCP-12 (M208); immortalisert endotelcellelinje avledet fra mikrovaskulære hjerneendotelceller, ustimulerte (E200); immortalisert endotelcellelinje avledet fra mikrovaskulære hjerneendotelceller, stimulert over natten med TNF α (E201); immortalisert endotelcellelinje avledet fra mikrovaskulære hjerneendotelceller, stimulert over natten med TNF α (E202); immortalisert endotelcellelinje avledet fra mikrovaskulære hjerneendotelceller, stimulert over natten med TNF α og IL-10 (E203); total aorta fra wt C57 bl/6-mus; total aorta fra 5 måneder gamle ApoE KO-mus (X207); total aorta fra 12 måneder gamle ApoE KO-mus (X207); wt-thymus (O214); total thymus, rag-1 (O208); total nyre, rag-1 (O209); total nyre, NZ-B/W-mus; og totalt hjerte, rag-1 (O202). Høyt signal ble påvist i monocytcellerlinjen RAW 264.7 aktivert med LPS i 4 timer (M200); T-celler, TH1-høypolarisert 3 x fra transgene C57 bl/6 (aktivert med anti-CD3 i 2, 6, 24 timer, sammenslått; T212); og T-celler, TH1-høypolarisert (naturlige CD4⁺-T-celler fra transgene Balb/C, polarisert 3 x med IFN γ , IL-12, og anti-IL-4; stimulert med IGIF, IL-12, og anti IL-4 i 6, 12, 24 timer, sammenslått). Påvisbare signaler ble påvist i T-celler, TH1-høypolarisert 3 x fra transgene Balb/C (se Openshaw et al. (1995) J. Exp. Med., 182:1357-1367; aktivert med anti-CD3 i 2, 6, 24 timer, sammenslått; T202); T-celler, TH2-polariserte (Mell14 bright, CD4⁺-celler fra milt, polarisert i 7 dager med IL-4 og anti-IFN- γ ; T201); T-celler, TH1-polariserte (Mell14 bright, CD4⁺-celler fra milt, polarisert i 7 dager med IFN- γ og anti IL4; T200); makrofagcellelinje J774 + LPS + anti-IL-10 ved 0,5, 1, 3, 6, 12 timer, sammenslått (M203); makrofagcellelinje J774, hvilende (M202); makrofagcellelinje J774 + LPS + IL-10 ved 0,5, 1, 3, 5, 12 timer, sammenslått (M204); immortalisert endotelcellelinje avledet fra mikrovaskulære hjerneendotelceller, stimulert over natten med TNF α (E201); og benmargsmakrofager avledet med GM-CSF, stimulert med LPS, IFN γ og anti IL-10 i 24 timer (M206). Andre prøver viste intet signal. Ekspresjonen i RAW 264.7-musemonocytcellerlinjen antyder en naturlig kilde for protein.

IV. Kromosomkartlegging av IL-B30

Et isolert cDNA som koder for IL-B30 anvendes.

Kromosomkartlegging er en standardteknikk. Se f.eks. BIOS Laboratories (New Haven, CT) og metoder for anvendelse av et
 5 somatisk musecellhybridpanel med PCR. Indirekte bevis antyder at muse-IL-B30-genet er kartlagt til kromosom 10.

V. Rensing av IL-B30-protein

Multiple, transfekteerte cellelinjer screenes for en
 10 cellelinje som uttrykker cytokinet på høyt nivå sammenlignet med andre celler. Forskjellige cellelinjer screenes og utvelges for deres gunstige egenskaper med hensyn til håndtering. Naturlig IL-B30 kan isoleres fra naturlige kilder, eller ved ekspresjon fra en transformert celle ved anvendelse
 15 av en passende ekspresjonsvektor. Rensing av det uttrykte protein oppnås ved hjelp av standardprosedyrer, eller kan kombineres med konstruerte anordninger for effektiv rensing med høy effektivitet fra cellelysater eller supernatanter. FLAG- eller His₆-segmenter kan anvendes for slike rensings-
 20 trekk. Alternativt kan affinitetskromatografi benyttes med spesifikke antistoffer, se nedenfor.

Protein produseres i *E. coli*, insektceller eller pattedyrskspresjonssystemer etter ønske.

25 VI. Isolering av homologe IL-B30-gener

IL-B30-cDNA eller en annen artsmotstykkesevens kan anvendes som en hybridiseringsprobe for å screene et bibliotek fra en ønsket kilde, f.eks. et primatcelle-cDNA-bibliotek. Mange forskjellige arter kan screenes, både for nødvendig
 30 stringens for lett hybridisering og for tilstedeværelse ved anvendelse av en probe. Egnede hybridiseringsbetingelser vil anvendes for å utvelge for kloner som oppviser spesifisitet for krysshybridisering.

Screening ved hybridisering ved anvendelse av degene-
 35 rerte prober basert på peptidsekvensene vil også tillate isolering av passende kloner. Alternativt vil anvendelse av passende primere for PCR-screening gi anrikning av egnede nukleinsyrekloner.

Lignende metoder kan anvendes for å isolere enten arter, polymorfe eller allele varianter. Artsvarianter isoleres ved anvendelse av artskrysningshybridiserings-teknikker basert på isolering av fullengdet isolat eller
5 fragment fra én art som en probe.

Alternativt vil antistoffer dannet mot humant IL-B30 anvendes for å screene for celler som uttrykker kryssreaktive proteiner fra et egnet bibliotek, f.eks. cDNA-bibliotek. Det rensede protein eller definerte peptider er anvendelige for
10 dannelsen av antistoffer ved hjelp av standardmetoder, som beskrevet ovenfor. Syntetiske peptider eller rensset protein presenteres for et immunsystem for å danne monoklonale eller polyklonale antistoffer. Se f.eks. Coligan (1991), Current Protocols in Immunology, Wiley/Greene; og Harlow og Lane
15 (1989), Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press. De resulterende antistoffer anvendes for screening, rensing eller diagnose, som beskrevet.

VII. Fremstilling av antistoffer spesifikke for IL-B30

20 Syntetiske peptider eller rensset protein presenteres for et immunsystem for å danne monoklonale eller polyklonale antistoffer. Se f.eks. Coligan (1991), Current Protocols in Immunology, Wiley/Greene; og Harlow og Lane (1989), Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press. Poly-
25 klonalt serum eller hybridomer kan fremstilles. I passende situasjoner er bindingsreagenset enten merket som beskrevet ovenfor, f.eks. med fluorescens eller på annen måte, eller immobilisert på et substrat for panoreringsmetoder. Immunseleksjon og beslektede teknikker er tilgjengelige for å
30 fremstille selektive reagenser etter ønske.

VIII. Evaluerings av bredde av biologiske funksjoner

Biologiske aktiviteter av IL-B30 ble testet, basert på sekvens- og strukturhomologi mellom IL-B30 og IL-6 og G-CSF. Innledningsvis undersøkes analyser som hadde vist bio-
35 logiske aktiviteter tilsvarende IL-6 eller G-CSF.

A. Effekter på proliferasjon av celler

Effekten på proliferasjon av forskjellige celletyper evalueres med forskjellige konsentrasjoner av cytokin. En dose-responsanalyse utføres i kombinasjoner med de beslektede
 5 IL-6, G-CSF etc.

B. Effekter på ekspresjon av celleoverflate-molekyler på humane monocytter

Monocytter renses ved negativ seleksjon fra mono-
 10 nukleære perifere blodceller fra normale, friske donorer. Kort beskrevet blir 3×10^8 ficoll-sammenknyttede mononukleære celler inkubert på is med en blanding av monoklonale anti-stoffer (Becton-Dickinson; Mountain View, CA) bestående av f.eks. 200 μ l α CD2 (Leu-5A), 200 μ l α CD3 (Leu-4), 100 μ l α CD8
 15 (Leu 2a), 100 μ l α CD19 (Leu-12), 100 μ l α CD20 (Leu-16), 100 μ l α CD56 (Leu-19), 100 μ l α CD67 (IOM 67; Immunotech, Westbrook, ME), og anti glykoforin-antistoff (10F7MN, ATCC, Rockville, MD). Antistoffbundne celler vaskes og inkuberes deretter med saue-antimuse-IgG-koplede magnetiske kuler
 20 (Dynal, Oslo, Norge) ved et forhold mellom kuler og celler på 20:1. Antistoffbundne celler separeres fra monocytter ved påføring av et magnetisk felt. Deretter dyrkes humane monocytter i Yssels medium (Gemini Bioproducts, Calabasas, CA) inneholdende 1 % humant AB-serum i fravær eller nærvær av IL-
 25 B30, IL-6, G-CSF eller kombinasjoner av disse.

Analysen av ekspresjonen av celleoverflatemolekyler kan utføres ved direkte immunfluorescens. 2×10^5 rensede humane monocytter inkuberes f.eks. i fosfatbufret saltvann (PBS) inneholdende 1 % humant serum på is i 20 minutter.
 30 Cellene pelleres ved 200 x g. Cellene resuspenderes i 20 ml PE- eller FITC-merket mAb. Etter ytterligere 20 minutters inkubasjon på is vaskes cellene i PBS inneholdende 1 % humant serum, etterfulgt av to vaskinger i PBS alene. Cellene fikseres i PBS inneholdende 1 % paraformaldehyd og analyseres
 35 på FACScan-strømningscytometer (Becton Dickinson; Mountain View, CA). Eksempelvis benyttes, f.eks. CD11b (anti-mac1), CD11c (gp150/195), CD14 (Leu-M3), CD54 (Leu 54), CD80

(anti-BB1/B7), HLA-DR (L243) fra Becton-Dickinson, og CD86 (FUN 1; Pharmingen), CD64 (32.2; Medarex), CD40 (mAb89; Schering-Plough, Frankrike).

5 C. Effekter av IL-B30 på cytokinproduksjon av humane monocyttter

Humane monocyttter isoleres som beskrevet og dyrkes i Yssels medium (Gemini Bioproducts, Calabasas, CA) inneholdende 1 % humant AB-serum, i fravær eller nærvær av IL-B30 (1/100-
10 fortynning, baculovirusuttrykt materiale). Monocyttter blir dessuten stimulert med LPS (*E. coli* 0127:B8 Difco) i fravær eller nærvær av IL-B30, og konsentrasjonen av cytokiner (IL-1 β , IL-6, TNF α , GM-CSF og IL-10) i cellekultursupernatanten bestemmes ved hjelp av ELISA.

15 For intracytoplasmatisk farging for cytokiner blir monocyttter dyrket (1 million/ml) i Yssels medium i fravær eller nærvær av IL-B30 og LPS (*E. coli* 0127:B8 Difco) og 10 mg/ml Brefeldin A (Epicentre technologies, Madison, WI) i 12 timer. Cellene vaskes i PBS og inkuberes i 2 % form-
20 aldehyd-/PBS-løsning i 20 minutter ved RT. Cellene blir deretter vasket, resuspendert i permeabiliseringsbuffer (0,5 % saponin (Sigma) i PBS/BSA (0,5 %)/azid (1 mM)) og inkuberes i 20 minutter ved RT. Celler (2×10^5) sentrifugeres og resuspendes i 20 ml direkte konjugerte anticytokin-mAb fortynnet
25 1:10 i permeabiliseringsbuffer i 20 minutter ved RT. De følgende antistoffer kan benyttes: IL-1 α -PE (364-3B3-14); IL-6-PE (MQ2-13A5); TNF α -PE (MAb11); GM-CSF-PE (BVD2-21C11); og IL-12-PE (C11.5.14; Pharmingen, San Diego, CA). Cellene vaskes deretter to ganger i permeabiliseringsbuffer og én gang i
30 PBS/BSA/azid og analyseres på FACScan-strømningscytometer (Becton Dickinson; Mountain View, CA).

D. Effekter av IL-B30 på proliferasjon av humane perifere mononukleære blodceller (PBMC)

35 Totale PBMC isoleres fra buffy coats fra normale, friske donorer ved sentrifugering gjennom ficoll-hypaque som beskrevet (Boyum et al.). PBMC dyrkes i 200 μ l Yssels medium (Gemini Bioproducts, Calabasas, CA) inneholdende 1 % humant AB-serum i 96-brønners plater (Falcon, Becton-Dickinson, NJ) i

fravær eller nærvær av IL-B30. Cellene dyrkes i medium alene eller i kombinasjon med 100 U/ml IL-2 (R&D Systems) i 120 timer. 3H-tymidin (0,1 mCi) tilsettes i de siste 6 timers dyrkning, og 3H-tymidininkorporering bestemmes ved hjelp av
 5 væskescintillasjonstelling.

De native, rekombinante og fusjonsproteiner vil testes for agonist- og antagonistaktivitet i mange andre biologiske analysesystemer, f.eks. på T-celler, B-celler, NK, makrofager, dendrittceller, hematopoetiske forløpere etc. På
 10 grunn av det strukturelle slektskap mellom IL-6 og G-CSF bør analyseresultater relatert til disse aktiviteter analyseres.

IL-B30 evalueres for agonist- eller antagonist-aktivitet på transfekterte celler som uttrykker IL-6- eller G-CSF-reseptor og kontroller. Se f.eks. Ho et al. (1993), Proc.
 15 Nat'l Acad. Sci. USA, 90, 11267-11271; Ho et al. (1995), Mol. Cell. Biol., 15:5043-5053; og Liu et al. (1994), J. Immunol., 152:1821-1829.

IL-B30 evalueres for effekt i makrofag/dendrittcelle-aktiverings- og antigenpresentasjonsanalyser, T-cellecytokin-
 20 produksjon og proliferasjon som respons på antigen eller allo-gen stimulering. Se f.eks. de Waal Malefyt et al. (1991), J. Exp. Med., 174:1209-1220; de Waal Malefyt et al. (1991), J. Exp. Med., 174:915-924; Fiorentino et al. (1991), J. Immunol., 147, 3815-3822; Fiorentino et al. (1991), J. Immunol., 146:
 25 3444-3451; og Groux et al. (1996) J. Exp. Med., 184:19-29.

IL-B30 vil også evalueres for effekter på NK-celle-stimulering. Analyser kan f.eks. være basert på Hsu et al., (1992), Internat. Immunol., 4:563-569; og Schwarz et al. (1994), J. Immunother., 16:95-104.

B-cellevekst- og differensieringseffekter vil f.eks. analyseres ved hjelp av metodikken beskrevet av f.eks. Defrance et al. (1992), J. Exp. Med., 175:671-682; Rousset et al. (1992), Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 89:1890-1893, inkludert IgG2- og IgA2-skiftningsfaktoranalyser. Det skal anføres
 35 at i motsetning til COS7-supernatanter gir NIH3T3- og COP-supernatanter tilsynelatende ingen forstyrrelse av humane B-celleanalyser.

IX. Frembringelse og analyse av genetisk endrede dyr

Transgene mus kan frembringes ved hjelp av standard-metoder. Slike dyr er nyttige for å bestemme effektene av delesjon av genet, i spesifikke vev eller fullstendig gjennom
5 hele organismen. Slike kan tilveiebringe interessant innsikt i utvikling av dyret eller spesielle vev i forskjellige stadier. Effekten på forskjellige responser på biologisk stress kan dessuten evalueres. Se f.eks. Hogan et al. (1995), Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual (2. utg.), Cold
10 Spring Harbor Laboratory Press.

En transgen mus er blitt frembrakt, og selv om dyret synes å overleve fødselen, trives det ikke og dør typisk innen noen få uker. Konstruksjonen er basert på en aktinpromotor med en CMV-enhancer som bør føre til bred og høy ekspresjon.
15 Musene, slik som IL-6-transgene mus, er misdannede. De oppviser dessuten oppsvulmet buk, inflammasjon i magesekk og tarmer, infiltrasjon av celler i leveren og dør typisk før dag 50. Disse mus formerer seg ikke. Et andre undersett av de transgene mus har en mindre alvorlig fenotype, og forsøk på å
20 formere dem finner nå sted.

Den genomiske struktur for musen IL-B30 er blitt bestemt. En strategi for produksjon av IL-B30-knock-out-mus er blitt utviklet, og konstruksjoner er blitt startet.

P a t e n t k r a v

1. Isolert eller rekombinant polynukleotid,
5 k a r a k t e r i s e r t v e d at det koder for et modent polypeptid utvalgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 2, 4 og 5.
2. Isolert eller rekombinant polynukleotid ifølge krav
10 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det koder for et polypeptid utvalgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 2, 4 og 5.
3. Polynukleotid ifølge krav 2,
15 k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter den kodende delen av SEQ ID NO: 1 eller 3.
4. Polynukleotid ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter den modne,
20 kodende delen av nukleotidsekvensen av SEQ ID NO: 1 eller 3.
5. Ekspresjonsvektor,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter polynukleotidet ifølge krav 1.
25
6. Vertscelle,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den inneholder ekspresjonsvektoren ifølge krav 5.
- 30 7. Vertscelle ifølge krav 6,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den er en eukaryot celle.
8. Fremgangsmåte for fremstilling av et polypeptid,
35 k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter ekspresjon av et rekombinant polynukleotid ifølge krav 1.
9. Antistoff- eller antigenbindende fragment derav,

k a r a k t e r i s e r t v e d at det spesifikt bindes til et polypeptid med en aminosyresekvens bestående av den modne aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO: 2, 4 eller 5.

5 10. Antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge krav 9,

k a r a k t e r i s e r t v e d at antistoffet eller det antigenbindende fragment derav er et monoklonalt antistoff, Fab eller F(ab)2.

10

11. Antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge krav 9,

k a r a k t e r i s e r t v e d at antistoffet eller det antigenbindende fragment derav er merket slik at det kan

15 påvises.

12. Fremgangsmåte for anvendelse av antistoffet eller det antigenbindende fragment derav ifølge krav 9,

20 k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter at antistoffet eller det antigenbindende fragment derav bringes i kontakt med en biologisk prøve som omfatter et antigen, idet denne kontakt resulterer i dannelse av et antistoff:antigen-kompleks eller et antigenbindende fragment: antigenkompleks.

25 13. Fremgangsmåte ifølge krav 12,

k a r a k t e r i s e r t v e d at den biologiske prøven er fra et menneske.

14. Sett,

30 k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter antistoffet eller det antigenbindende fragment derav ifølge krav 9, og

- 35
- a) instruksjonsmateriale for anvendelse av antistoffet eller det antigenbindende fragment derav for nevnte påvisning; eller
 - b) et rom som tilveiebringer atskillelse av antistoffet eller det antigenbindende fragment derav.

15. Isolert polypeptid,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter et modent
polypeptid ifølge SEQ ID NO: 2, 4 eller 5.

5 16. Polypeptid ifølge krav 15,
k a r a k t e r i s e r t v e d at polypeptidet er
påvisbart merket.

17. Isolert polypeptid ifølge krav 15,
10 k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter aminosyre-
sekvensen ifølge SEQ ID NO: 2, 4 eller 5.

18. Antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge
krav 9,
15 k a r a k t e r i s e r t v e d at det spesifikt bindes
til et polypeptid med en aminosyresekvens bestående av
sekvensen ifølge SEQ ID NO: 2, 4 eller 5.

SEQUENCE LISTING

5 SEQ ID NO: 1 is a primate IL-B30 natural nucleic acid sequence.
SEQ ID NO: 2 is a primate IL-B30 natural amino acid sequence.
SEQ ID NO: 3 is a rodent IL-B30 natural nucleic acid sequence.
SEQ ID NO: 4 is a rodent IL-B30 natural amino acid sequence.
SEQ ID NO: 5 is a pig IL-B30.
10 SEQ ID NO: 6 is bovine G-CSF.
SEQ ID NO: 7 is feline G-CSF.
SEQ ID NO: 8 is human G-CSF.
SEQ ID NO: 9 is mouse G-CSF.
SEQ ID NO: 10 is otter IL-6.
15 SEQ ID NO: 11 is feline IL-6.
SEQ ID NO: 12 is human IL-6.
SEQ ID NO: 13 is sheep IL-6.
SEQ ID NO: 14 is mouse IL-6.
SEQ ID NO: 15 is chicken MGF.
20 SEQ ID NO: 16 is KSHV, kaposi's sarcoma herpes virus, a viral IL-6.

(1) GENERAL INFORMATION:

25 (i) APPLICANT: Schering Corporation
(ii) TITLE OF INVENTION: MAMMALIAN CYTOKINE; RELATED REAGENTS
(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 16
30 (iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:
(A) ADDRESSEE: Schering Corporation
(B) STREET: 2000 Galloping Hill Road
(C) CITY: Kenilworth
(D) STATE: New Jersey
35 (E) COUNTRY: USA
(F) ZIP: 07033-0530
(v) COMPUTER READABLE FORM:
40 (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
(B) COMPUTER: Power Macintosh 7600/120
(C) OPERATING SYSTEM: Windows
(D) SOFTWARE: MS Word
(vi) CURRENT APPLICATION DATA:
45 (A) APPLICATION NUMBER:
(B) FILING DATE: July 24, 1998
(C) CLASSIFICATION:
(vii) PRIOR APPLICATION DATA:
50 (A) APPLICATION NUMBER: US 08/900,905
(B) FILING DATE: 25-JUL-1997
(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:
55 (A) NAME: Thampoe, Immac J.
(B) REGISTRATION NUMBER: 36,322
(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: DX0758K1
(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:
60 (A) TELEPHONE: (908) 298-5061
(B) TELEFAX: (908) 298-5388

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 5 (A) LENGTH: 570 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:
 15 (A) NAME/KEY: CDS
 (B) LOCATION: 1..567

(ix) FEATURE:
 20 (A) NAME/KEY: mat_peptide
 (B) LOCATION: 64..567

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

25	ATG CTG GGG AGC AGA CCT GTA ATG CTG CTG TTG CTG CTG CCC TGG ACA	48
	Met Leu Gly Ser Arg Ala Val Met Leu Leu Leu Leu Leu Pro Trp Thr	
	-21 -20 -15 -10	
30	GCT CAG GGC AGA GCT GTG CCT GGG GGC AGC AGC CCT GCC TGG ACT CAG	96
	Ala Gln Gly Arg Ala Val Pro Gly Gly Ser Ser Pro Ala Trp Thr Gln	
	-5 1 5 10	
35	TGC CAG CAG CTT TCA CAG AAG CTC TGC ACA CTG GCC TGG AGT GCA CAT	144
	Cys Gln Gln Leu Ser Gln Lys Leu Cys Thr Leu Ala Trp Ser Ala His	
	15 20 25	
40	CCA CTA GTG GGA CAC ATG GAT CTA AGA GAA GAG GGA GAT GAA GAG ACT	192
	Pro Leu Val Gly His Met Asp Leu Arg Glu Glu Gly Asp Glu Glu Thr	
	30 35 40	
45	ACA AAT GAT GTT CCC CAT ATC CAG TGT GGA GAT GGC TGT GAC CCC CAA	240
	Thr Asn Asp Val Pro His Ile Gln Cys Gly Asp Gly Cys Asp Pro Gln	
	45 50 55	
50	GGA CTC AGG GAC AAC AGT CAG TTC TGC TTC CAA AGG ATC CAC CAG GGT	288
	Gly Leu Arg Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile His Gln Gly	
	60 65 70 75	
55	CTG ATT TTT TAT GAG AAG CTG CTA GGA TCG GAT ATT TTC ACA GGG GAG	336
	Leu Ile Phe Tyr Glu Lys Leu Leu Gly Ser Asp Ile Phe Thr Gly Glu	
	80 85 90	
60	CCT TCT CTG CTC CCT GAT AGC CCT GTG GCG CAG CTT CAT GCC TCC CTA	384
	Pro Ser Leu Leu Pro Asp Ser Pro Val Ala Gln Leu His Ala Ser Leu	
	95 100 105	
65	CTG GGC CTC AGC CAA CTC CTG CAG CCT GAG GGT CAC CAC TGG GAG ACT	432
	Leu Gly Leu Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Gly His His Trp Glu Thr	
	110 115 120	
70	CAG CAG ATT CCA AGC CTC ACT CCC AGC CAG CCA TGG CAG CGT CTC CTT	480
	Gln Gln Ile Pro Ser Leu Ser Pro Ser Gln Pro Trp Gln Arg Leu Leu	
	125 130 135	

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

5

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

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

15

(A) LENGTH: 189 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

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

25

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

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

30

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

35

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

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

40

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

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

45

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

50

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

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

55

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

60

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 1203 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

5 (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: CDS
 (B) LOCATION: 113..700

10 (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: mat_peptide
 (B) LOCATION: 176..700

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

```

15 CGCTTAGAAG TCGGACTACA GAGTTAGACT CAGAACCAAA GGAGGTGGAT AGGGGGTCCA      60
    CAGGCCTGGT GCAGATCACA GAGCCAGCCA GATCTGAGAA GCAGGGAACA AG ATG      115
                                     Met
20                                     -21
    CTG GAT TGC AGA GCA GTA ATA ATG CTA TGG CTG TTG CCC TGG GTC ACT      163
    Leu Asp Cys Arg Ala Val Ile Met Leu Trp Leu Leu Pro Trp Val Thr
    -20                               -15                -10                -5
25 CAG GGC CTG GCT GTG CCT AGG AGT AGC AGT CCT GAC TGG GCT CAG TGC      211
    Gln Gly Leu Ala Val Pro Arg Ser Ser Ser Pro Asp Trp Ala Gln Cys
                                     1                5                10
30 CAG CAG CTC TCT CGG AAT CTC TGC ATG CTA GCC TGG AAC GCA CAT GCA      259
    Gln Gln Leu Ser Arg Asn Leu Cys Met Leu Ala Trp Asn Ala His Ala
                                     15                20                25
35 CCA GCG GGA CAT ATG AAT CTA CTA AGA GAA GAA GAG GAT GAA GAG ACT      307
    Pro Ala Gly His Met Asn Leu Leu Arg Glu Glu Glu Asp Glu Glu Thr
                                     30                35                40
40 AAA AAT AAT GTG CCC CGT ATC CAG TGT GAA GAT GGT TGT GAC CCA CAA      355
    Lys Asn Asn Val Pro Arg Ile Gln Cys Glu Asp Gly Cys Asp Pro Gln
    45                               50                55                60
    GGA CTC AAG GAC AAC AGC CAG TTC TGC TTG CAA AGG ATC CGC CAA GGT      403
    Gly Leu Lys Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile Arg Gln Gly
                                     65                70                75
45 CTG GCT TTT TAT AAG CAC CTG CTT GAC TCT GAC ATC TTC AAA GGG GAG      451
    Leu Ala Phe Tyr Lys His Leu Leu Asp Ser Asp Ile Phe Lys Gly Glu
                                     80                85                90
50 CCT GCT CTA CTC CCT GAT AGC CCC ATG GAG CAA CTT CAC ACC TCC CTA      499
    Pro Ala Leu Leu Pro Asp Ser Pro Met Glu Gln Leu His Thr Ser Leu
                                     95                100                105
55 CTA GGA CTC AGC CAA CTC CTC CAG CCA GAG GAT CAC CCC CGG GAG ACC      547
    Leu Gly Leu Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Asp His Pro Arg Glu Thr
    110                115                120
    CAA CAG ATG CCC AGC CTC AGT TCT AGT CAG CAG TGG CAG CGC CCC CTT      595
    Gln Gln Met Pro Ser Leu Ser Ser Ser Gln Gln Trp Gln Arg Pro Leu
    125                130                135                140
60 CTC CGT TCC AAG ATC CTT CGA AGC CTC CAG GCC TTT TTG GCC ATA GCT      643
    Leu Arg Ser Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Leu Ala Ile Ala
    145                150                155

```

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

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

10 ATCTATCAGC CCAGACATCT ACCAGTTAAT TAACCCATTA GGACTTGTGC TGTTCTTGTT 800
 TCGTTTGTTC TCGGTGAAGG GCAAGGACAC CATTATTAAA GAGAAAAGAA ACAAACCCCA 860
 GAGCAGGCAG CTGGCTAGAG AAAGGAGCTG GAGAAGAAGA ATAAAGTCTC GAGCCCTTGG 920

15 CCTTGGAAGC GGGCAAGCAG CTGCGTGGCC TGAGGGGAAG GGGGCGGTGG CATCGAGAAA 980
 CTGTGAGAAA ACCCAGAGCA TCAGAAAAAG TGAGCCCAGG CTTTGGCCAT TATCTGTAAG 1040
 20 AAAACAAGA AAAGGGGAAC ATTATACTTT CCTGGGTGGC TCAGGGAAAT GTGCAGATGC 1100
 ACAGTACTCC AGACAGCAGC TCTGTACCTG CCTGCTCTGT CCCTCAGTTC TAACAGAATC 1160
 TAGTCACTAA GAACTAACAG GACTACCAAT ACGAACTGAC AAA 1203

25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 196 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: protein
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Gln Gln Met Pro Ser Leu Ser Ser Ser Gln Gln Trp Gln Arg Pro
 125 130 135
 5 Leu Leu Arg Ser Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Leu Ala Ile
 140 145 150 155
 Ala Ala Arg Val Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Thr Glu Pro Leu
 160 165 170
 10 Val Pro Thr Ala
 175

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

15 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 102 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (C) STRANDEDNESS: not relevant
 (D) TOPOLOGY: linear

20 (ii) MOLECULE TYPE: peptide

25 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

Ser Cys Leu Gln Arg Ile His Gln Gly Leu Val Phe Tyr Glu Lys Leu
 1 5 10 15
 30 Leu Gly Ser Asp Ile Phe Thr Gly Glu Pro Ser Leu His Pro Asp Gly
 20 25 30
 Ser Val Gly Gln Leu His Ala Ser Leu Leu Gly Leu Arg Gln Leu Leu
 35 35 40 45
 Gln Pro Glu Gly His His Trp Glu Thr Glu Gln Thr Pro Ser Pro Ser
 50 55 60
 40 Pro Ser Gln Pro Trp Gln Arg Leu Leu Leu Arg Leu Lys Ile Leu Arg
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ala Phe Val Ala Val Ala Ala Arg Val Phe Ala His Gly
 85 90 95
 45 Ala Ala Thr Leu Ser Gln
 100

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

50 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 174 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (C) STRANDEDNESS: not relevant
 55 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

60

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

40 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 174 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (C) STRANDEDNESS: not relevant
 (D) TOPOLOGY: linear
 45 (ii) MOLECULE TYPE: peptide

50 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

55 Thr Pro Leu Gly Pro Thr Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys
 1 5 10 15
 Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Val Gln Ala Asp Gly Thr Ala Leu Gln
 20 25 30
 Glu Arg Leu Cys Ala Ala His Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val
 35 40 45
 60 Leu Leu Gly His Ala Leu Gly Ile Pro Gln Ala Pro Leu Ser Ser Cys
 50 55 60

Ser Ser Gln Ala Leu Gln Leu Thr Gly Cys Leu Arg Gln Leu His Ser
 65 70 75 80
 5 Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Ile Ser
 85 90 95
 Pro Glu Leu Ala Pro Thr Leu Asp Met Leu Gln Leu Asp Ile Thr Asp
 100 105 110
 10 Phe Ala Ile Asn Ile Trp Gln Gln Met Glu Asp Val Gly Met Ala Pro
 115 120 125
 Ala Val Pro Pro Thr Gln Gly Thr Met Pro Thr Phe Thr Ser Ala Phe
 130 135 140
 15 Gln Arg Arg Ala Gly Gly Thr Leu Val Ala Ser Asn Leu Gln Ser Phe
 145 150 155 160
 20 Leu Glu Val Ala Tyr Arg Ala Leu Arg His Phe Thr Lys Pro
 165 170

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

25 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 177 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (C) STRANDEDNESS: not relevant
 (D) TOPOLOGY: linear

30 (ii) MOLECULE TYPE: peptide

35 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:

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

Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp
 145 150 155 160
 Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly
 5 165 170 175
 Pro

10 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 178 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 15 (C) STRANDEDNESS: not relevant
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

25 Val Pro Leu Val Thr Val Ser Ala Leu Pro Pro Ser Leu Pro Leu Pro
 1 5 10 15
 Arg Ser Phe Leu Leu Lys Ser Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Ala
 20 25 30
 30 Ser Gly Ser Val Leu Leu Glu Gln Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys
 35 40 45
 35 His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Lys
 50 55 60
 Ala Ser Leu Ser Gly Cys Ser Ser Gln Ala Leu Gln Gln Thr Gln Cys
 65 70 75 80
 40 Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu Cys Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln
 85 90 95
 Ala Leu Ser Gly Ile Ser Pro Ala Leu Ala Pro Thr Leu Asp Leu Leu
 100 105 110
 45 Gln Leu Asp Val Ala Asn Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu
 115 120 125
 50 Asn Leu Gly Val Ala Pro Thr Val Gln Pro Thr Gln Ser Ala Met Pro
 130 135 140
 Ala Phe Thr Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Ala Ile
 145 150 155 160
 55 Ser Tyr Leu Gln Gly Phe Leu Glu Thr Ala Arg Leu Ala Leu His His
 165 170 175
 Leu Ala

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- 5 (A) LENGTH: 186 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (C) STRANDEDNESS: not relevant
 (D) TOPOLOGY: linear

10 (ii) MOLECULE TYPE: peptide

15 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11:

55 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 193 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (C) STRANDEDNESS: not relevant
 (D) TOPOLOGY: linear

60 (ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:11:

5	Ala Phe Pro Thr Pro Gly Pro Leu Gly Gly Asp Ala Thr Ser Asn Arg 1 5 10 15
	Leu Pro Leu Thr Pro Ala Asp Lys Met Glu Glu Leu Ile Lys Tyr Ile 20 25 30
10	Leu Gly Lys Ile Ser Ala Leu Lys Lys Glu Met Cys Asp Asn Tyr Asn 35 40 45
	Lys Cys Glu Asp Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu 50 55 60
15	Pro Lys Leu Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Gln 65 70 75 80
	Glu Thr Cys Leu Thr Arg Ile Thr Thr Gly Leu Gln Glu Phe Gln Ile 85 90 95
20	Tyr Leu Lys Phe Leu Gln Asp Lys Tyr Glu Gly Asp Lys Glu Asn Ala 100 105 110
	Lys Ser Val Tyr Thr Ser Thr Asn Val Leu Leu Gln Met Leu Lys Arg 115 120 125
25	Lys Gly Lys Asn Gln Asp Glu Val Thr Ile Pro Val Pro Thr Val Glu 130 135 140
	Val Gly Leu Gln Leu Ser Cys Ser His Arg Arg Val Ala Glu Ala His 145 150 155 160
30	Asn Asn His Leu Thr Leu Arg Arg Leu Glu Asp Phe Leu Gln Leu Arg 165 170 175
35	Leu Arg Ala Val Arg Ile Met 180

40 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:12:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 188 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION- SEQ ID NO:12:

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

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

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

Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn
 50 55 60
 5 Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser
 65 70 75 80
 Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu
 85 90 95
 10 Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser
 100 105 110
 15 Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln
 115 120 125
 Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp
 130 135 140
 20 Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln
 145 150 155 160
 Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu
 165 170 175
 25 Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala Leu Arg Gln Met
 180 185

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:13:

- 30 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 184 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (C) STRANDEDNESS: not relevant
 35 (D) TOPOLOGY: linear
 (ii) MOLECULE TYPE: peptide

40

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:13:

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

Gln Glu Thr Val Met Glu Leu Gln Ser Ser Ile Arg Thr Leu Ile Gln
 115 120 125
 5 Ile Leu Lys Glu Lys Ile Ala Gly Leu Ile Thr Thr Pro Ala Thr His
 130 135 140
 Thr Asp Met Leu Glu Lys Met Gln Ser Ser Asn Glu Trp Val Lys Asn
 145 150 155 160
 10 Ala Lys Val Ile Ile Ile Leu Arg Ser Leu Glu Asn Phe Leu Gln Phe
 165 170 175
 Ser Leu Arg Ala Ile Arg Met Lys
 180

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:14:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 188 amino acids
 20 (B) TYPE: amino acid
 (C) STRANDEDNESS: not relevant
 (D) TOPOLOGY: linear
 (ii) MOLECULE TYPE: peptide
 25
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:14:
 30 Ala Phe Pro Thr Ser Gln Val Arg Arg Gly Asp Phe Thr Glu Asp Thr
 1 5 10 15
 Thr Pro Asn Arg Pro Val Tyr Thr Thr Ser Gln Val Gly Gly Leu Ile
 20 25 30
 35 Thr His Val Leu Trp Glu Ile Val Glu Met Arg Lys Glu Leu Cys Asn
 35 40 45
 Gly Asn Ser Asp Cys Met Asn Asn Asp Asp Ala Leu Ala Glu Asn Asn
 50 55 60
 40 Leu Lys Leu Pro Glu Ile Gln Arg Asn Asp Gly Cys Tyr Gln Thr Gly
 65 70 75 80
 Tyr Asn Gln Glu Ile Cys Leu Leu Lys Ile Ser Ser Gly Leu Leu Glu
 45 85 90 95
 Tyr His Ser Tyr Leu Glu Tyr Met Lys Asn Asn Leu Lys Asp Asn Lys
 100 105 110
 50 Lys Asp Lys Ala Arg Val Leu Gln Arg Asp Thr Glu Thr Leu Ile His
 115 120 125
 Ile Phe Asn Gln Glu Val Lys Asp Leu His Lys Ile Val Leu Pro Thr
 130 135 140
 55 Pro Ile Ser Asn Ala Leu Leu Thr Asp Lys Leu Glu Ser Gln Lys Glu
 145 150 155 160
 Trp Leu Arg Thr Lys Thr Ile Gln Phe Ile Leu Lys Ser Leu Glu Glu
 60 165 170 175
 Phe Leu Lys Val Thr Leu Arg Ser Thr Arg Gln Thr
 180 185

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:15:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- 5 (A) LENGTH: 178 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (C) STRANDEDNESS: not relevant
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:15:

15

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

20

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

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

25

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

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

30

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

35

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

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

40

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

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

45

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

Arg Leu

50

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:16:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- 55 (A) LENGTH: 165 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (C) STRANDEDNESS: not relevant
 (D) TOPOLOGY: linear

60

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:16:

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