

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2013-34480

(P2013-34480A)

(43) 公開日 平成25年2月21日(2013.2.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1	4 B O 6 5
審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 44 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2012-203186 (P2012-203186)	(71) 出願人	596129215
(22) 出願日	平成24年9月14日 (2012.9.14)		メルク・シャープ・アンド・ドーム・コー ポレーション
(62) 分割の表示	特願2009-209861 (P2009-209861) の分割		Merck Sharp & Dohme Corp.
原出願日	平成10年7月24日 (1998.7.24)		アメリカ合衆国ニュージャージー州088 89, ホワイトハウス・ステーション, メ ルク・ドライブ1
(31) 優先権主張番号	08/900, 905		One Merck Drive, Whi tehouse Station, New Jersey 08889, U. S. A
(32) 優先日	平成9年7月25日 (1997.7.25)		.
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 哺乳動物サイトカイン：インターロイキン-B30および関連する試薬

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】哺乳動物の免疫系細胞のような哺乳動物細胞の生物学的および生理学的制御に機能するタンパク質に関連する組成物に関する。特に、精製された遺伝子、タンパク質、抗体および関連する（例えば、活性、発達、分化および多様な細胞型（造血細胞を含む）の機能を調節するための）有用な試薬を提供する。

【解決手段】サイトカイン（これは、例えば、免疫細胞または他の細胞の間でシグナルを媒介し得る、分泌される分子である）である種々の哺乳動物タンパク質をコードするアミノ酸配列およびDNA配列。新規のインターロイキン組成物および関連する化合物、ならびにそれらの使用のための方法。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

明細書に記載のポリヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、哺乳動物の免疫系細胞のような哺乳動物細胞の生物学的および生理学的制御に機能するタンパク質に関連する組成物に関する。特に、精製された遺伝子、タンパク質、抗体および関連する(例えば、活性、発達、分化および多様な細胞型(造血細胞を含む)の機能を調節するための)有用な試薬を提供する。

10

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

組換えDNA技術は、一般に、宿主への導入を経るような、ドナー供給源から引き続くプロセッシングのためのベクターへ遺伝情報を組み込む技術を言い、それによって転移した遺伝情報はコピーされ、そして/または新しい環境下で発現される。通常は、遺伝情報は、所望されるタンパク質産物をコードするメッセンジャーRNA(mRNA)に由来する相補的DNA(cDNA)の形態で存在する。キャリアは、頻繁には宿主中で後の複製のためにcDNAを組み込む能力を有し、そして幾つかの場合では、実際にはcDNAの発現を制御し、そしてその結果宿主中でコードされた生成物の合成を指向するプラスミドである。

20

【0003】

しばらくの間は、哺乳動物の免疫応答は、「免疫ネットワーク」と呼ばれる一連の複雑な細胞間相互作用に基づくものであることが知られている。最近の研究は、このネットワークの内部作用への新しい見識を提供してきた。多くの応答が存在することが明らかになってきた一方で、実際には、リンパ球、マクロファージ、顆粒球および他の細胞がネットワーク様相互作用の周辺を循環し、免疫学者たちは今日、リンホカイン、サイトカインまたはモノカインとして知られる可溶性タンパク質がこれらの細胞間相互作用の制御において重大な役割を果たすという見解を一般には保持している。従って、細胞修飾因子の単離、特徴付け、および作用機構には特筆すべき関心があり、それらを理解することは免疫系障害のような多くの医学的異常の診断および治療における有意な進歩を導く。これらの因子の幾つかは、例えば、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)のような造血増殖因子である。例えば、非特許文献1;非特許文献2;ならびに非特許文献3を参照のこと。

30

【0004】

リンホカインは、様々な方法で細胞活性を明らかに媒介する。これらは多機能性造血幹細胞の、複雑な免疫系を構成する多様な細胞系列を含む莫大な数の前駆体への増殖(proliferation)、発達(growth)、および分化を支持することが示されている。細胞性成分間の固有かつ均衡のとれた相互作用は、健全な免疫応答のために必要とされる。異なる細胞系列は、リンホカインが他の薬剤と組み合わせられて投与された場合では、しばしば異なる様式で応答する。

40

【0005】

免疫応答にとりわけ重要な細胞系列は、リンパ球の以下の2つのクラスを含む:B-細胞(これは、免疫グロブリン(外来の物質を認識および結合してその除去をもたらす能力を有するタンパク質)を産生および分泌し得る)、ならびにリンホカインを分泌し、そしてB-細胞および様々な他の細胞(他のT-細胞を含む)を誘発または抑圧し、免疫ネットワークを構成する様々なサブセットのT-細胞。これらのリンパ球は、多くの他の細胞型と相互作用する。

【0006】

別の重要な細胞系列は、マスト細胞(これは全ての哺乳動物種において確実に同定さ

50

れていない)であり、これは体内にはりめぐらされた毛細血管の近傍に位置する顆粒含有結合組織細胞である。これらの細胞は、肺、皮膚ならびに胃腸管および尿生殖器管でとりわけ高濃度で見られる。マスト細胞は、アレルギー関連障害、特に以下のようなアナフィラキシーにおいて中心的役割を果たす：選択された抗原が、マスト細胞表面上でレセプターに結合した1つのクラスの免疫グロブリンと架橋したときに、マスト細胞は、メディエーター(例えば、ヒスタミン、セロトニン、ヘパリンおよびプロスタグランジン(これらは、例えばアナフィラキシーのようなアレルギー性反応を生じる))を脱顆粒し、そして放出する。

【0007】

様々な免疫障害のより良い理解および処置の研究は、インビトロでの免疫系の細胞を維持するための一般的な無力により妨げられてきた。免疫学者たちは、これらの細胞の培養が、T-細胞および他の細胞上清物(これは様々な増殖因子(多くのリンホカインを含む))を含む)の使用によって実現されることを発見した。

10

前述から、新規のリンホカイン(例えば、G-CSFおよび/またはIL-6に関連するリンホカイン)の発見および開発は、免疫系および/または造血細胞に直接的にまたは間接的に関連する広範な範囲の変性な状態、または異常な状態のための新規の治療に貢献し得た。特に、公知のリンホカインの有意な活性を強化または増強するリンホカインの発見および開発は非常に都合が良い。本発明は、新規のインターロイキン組成物および関連する化合物、ならびにそれらの使用のための方法を提供する。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Thomson(1994;編)The Cytokine Handbook(第2版)Academic Press, San Diego

【非特許文献2】MetcalfeおよびNicola(1995)The Hematopoietic Colony Stimulating Factors Cambridge University Press

【非特許文献3】AggarwalおよびGuterman(1991)Human Cytokines Blackwell Pub

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

新規のインターロイキン組成物および関連する化合物、ならびにそれらの使用のための方法を提供すること。

【課題を解決するための手段】

【0010】

(発明の要旨)

本発明は、哺乳動物(例えば、げっ歯類、イヌ類、ネコ類、霊長類)、インターロイキン-B30(IL-B30)およびその生物学的活性に関する。本発明は、それら自身のポリペプチドをコードする核酸およびそれらの産生および使用のための方法を含む。本発明の核酸は、ある程度は、本明細書中に含まれるクローニングされた相補的DNA(cDNA)配列に対するそれらの相同性により、そして/またはG-CSFのような増殖因子様の活性またはサイトカイン様の活性(Diego Nagata(1994)Thomson The Cytokine Handbook 第2版., Academic Press, San Diegoを参照のこと)および/またはIL-6(Hirano(1994)Thomson The Cytokine Handbook 第2版., Academic Press, San Diegoを参照のこと)についての機能的アッセイにより特徴付けられ、これらのポリペプチド(これらは代表的にはこれらの核酸によりコードされる)に対して適用される。増殖因子依存性の生理学、つまり免疫応答の制御における調節または介入のための方法が提供される。

40

50

【 0 0 1 1 】

本発明は、一部において、G - C S FおよびI L - 6に対し有意な配列および構造的類似性を示す新規のサイトカイン配列の発見に基づく。特に、本発明は、例えばヒトのような霊長類の成熟したサイズが約168アミノ酸であるタンパク質をコードする遺伝子ならびにブタおよびネズミ（例えばマウス）配列をコードする遺伝子を提供する。有意な配列相同性を示す機能的等価物は、他の哺乳動物（例えば、ウシ、ウマおよびラット）および非哺乳動物種から入手可能である。

【 0 0 1 2 】

様々なタンパク質の実施態様において、本発明は以下の物を提供する：配列番号2に対して少なくとも約12アミノ酸の長さに渡って少なくとも約85%の配列同一性を示す実質的に純粋かまたは組換えのI L - B 3 0タンパク質またはペプチド；配列番号2のI L - B 3 0天然配列；およびI L - B 3 0配列を含む融合タンパク質。特定の実施態様において、相同性は、少なくとも約90%の同一性であり、かつこの部分は少なくとも約9アミノ酸であり；この相同性が、少なくとも約80%同一性であり、かつこの部分は少なくとも約17アミノ酸であり；または相同性が少なくとも約70%であり、かつこの部分は少なくとも約25アミノ酸である。他の実施態様において、I L - B 3 0は：表1の成熟配列を含み；または天然のI L - B 3 0と異なる翻訳後修飾パターンを示し；またはタンパク質もしくはペプチドであり；これは霊長類を含む哺乳動物から選択される温血動物由来であり；配列番号2の少なくとも1つのポリペプチドセグメントを含み；同一性を示す複数の部分を示し；I L - B 3 0の天然の対立遺伝子改変体であり；少なくとも約30アミノ酸長を有し；哺乳動物のI L - B 3 0に特異的である少なくとも2つの非重複エピトープを示し；哺乳動物I L - B 3 0に対して少なくとも20アミノ酸長に渡って少なくとも約90%の配列同一性を示し；グリコシル化され；天然のグリコシル化で少なくとも10kDの分子量を有し；合成ポリペプチドであり；固体基板に付着され；別の化学成分と結合体化し；天然配列由来の置換が5倍以下であり；または天然配列由来の欠失もしくは挿入改変体である。好ましい実施態様は、以下のものを含む組成物を含む：滅菌したI L - B 3 0タンパク質またはペプチド；またはI L - B 3 0タンパク質もしくはペプチドおよびキャリア（ここで、キャリアは以下のものである：水性化合物（水、生理食塩水および／もしくは緩衝液を含む）；ならびに／または経口、直腸、経鼻、局所的または非経口投与のために処方された水性化合物）。融合タンパク質の実施態様において、このタンパク質は以下のものを有し得る：表1の成熟タンパク質配列；検出用または精製用タグ（F L A G、H i s 6またはI g配列を含む）；および／または別のサイトカインまたはケモカインの配列。

【 0 0 1 3 】

キットの実施態様は、I L - B 3 0タンパク質またはポリペプチド、および：タンパク質またはポリペプチドを包含する区画；ならびに／あるいはキット中の試薬の使用または処分のための取り扱い説明書を有するキットを含む。

【 0 0 1 4 】

結合化合物の実施態様において、この化合物は、抗体由来の抗原結合部位を有し得、これは天然のI L - B 3 0タンパク質に特異的に結合し、ここで：I L - B 3 0は哺乳動物のタンパク質であり；結合化合物はF v、F a b、またはF a b 2フラグメントであり；結合化合物は別の化学成分と結合体化し；または抗体は：表1の成熟ポリペプチドのペプチド配列に対して惹起され；成熟I L - B 3 0に対して惹起され；精製されたげっ歯類のI L - B 3 0に対して惹起され；免疫選択され；ポリクローナル抗体であり；変性したI L - B 3 0と結合し；少なくとも30μMのK dを示し；固体基板（ビーズまたはプラスチック膜を含む）に付着され；滅菌組成物中にあり；または検出可能に標識される（放射活性標識または蛍光標識を含む）。結合化合物を含むキットは：結合化合物を包含する区画；および／またはキット内の試薬の使用または処分のための取り扱い説明書を有するキットを含む。このキットはしばしば定性分析または定量分析をなし得る。好ましい組成物は以下のものを含む：滅菌結合化合物；または結合化合物およびキャリア（ここで、キャ

リアは以下のものである：水性化合物（水、生理食塩水および／もしくはは緩衝液を含む）；ならびに／または経口、直腸、経鼻、局所的または非経口投与のために処方された水性化合物）。

【0015】

核酸の実施態様は、IL-B30タンパク質またはペプチドまたは融合タンパク質をコードする単離されたかもしくはは組換えの核酸を含み、ここで：IL-B30は哺乳動物由来であり；そして／または核酸は：表1の1つの抗原性ペプチド配列をコードし；表1の複数の抗原性ペプチド配列をコードし；このセグメントをコードする天然のcDNAに対して少なくとも約80%の同一性を示し；発現ベクターであり；複製開始点をさらに含み；天然の供給源由来であり；検出可能な標識を含み；合成ヌクレオチド配列を含み；6 kbより小さく、好ましくは3 kbより小さく；霊長類を含む哺乳動物由来であり；天然の完全長コード配列を含み；IL-B30をコードする遺伝子についてのハイブリダイゼーションプローブであり；またはPCRプライマー、PCR産物または変異誘発プライマーである。本発明はまた、このような組換え核酸を含む細胞、組織または器官を提供し、そして好ましくは、この細胞は：原核細胞；真核細胞；細菌細胞；酵母細胞；昆虫細胞；哺乳動物細胞；マウス細胞；霊長類細胞；またはヒト細胞である。

10

【0016】

キットの実施態様は、このような核酸、および：これらの核酸を包含する区画；IL-B30タンパク質またはポリペプチドをさらに含む区画；および／またはこのキット中の試薬の使用または処分についての取り扱い説明書を有するキットを含む。代表的には、このキットは、定性的分析または定量的分析をなし得る。

20

【0017】

特定の実施態様において、この核酸は：30 かつ2 Mより低い塩の洗浄条件下で、または45 および／もしくはは500 mM塩の洗浄条件で、または55 および／もしくはは150 mM塩の洗浄条件で配列番号1に対しハイブリダイズし；または霊長類のIL-B30に対し、少なくとも約85%の同一性を示し、および／もしくははこの伸長が少なくとも約30ヌクレオチドであり、または少なくとも90%の同一性を示し、および／もしくはは伸長が少なくとも55ヌクレオチドであり、または少なくとも95%の同一性を示し、および／もしくはは伸長が少なくとも75ヌクレオチドである。

30

【0018】

本発明は、細胞と哺乳動物のIL-B30のアゴニストまたはアンタゴニストとの接触する工程を含む細胞または組織培養細胞の生理学または発達を調節する方法を包含する。この方法は：この接触させる工程が、G-CSFおよび／またはIL-6のアゴニストまたはアンタゴニストと組み合わせる工程であるか；またはこの接触させる工程が、IL-B30を特異的に結合する抗体の結合部位を含む結合組成物を含む、アンタゴニストと組み合わせる工程であり得る。

【0019】

（項目1） a）配列番号2の成熟コード部分由来の少なくとも17個の連続するアミノ酸；

b）配列番号4の成熟コード部分由来の少なくとも17個の連続するアミノ酸；または

c）配列番号5の成熟コード部分由来の少なくとも17個の連続するアミノ酸；を含む抗原性ポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチド、または組換えポリヌクレオチド。

40

（項目2） a）配列番号2；またはb）配列番号4；

の成熟ポリペプチドをコードする、項目1に記載のポリヌクレオチド。

（項目3） a）配列番号1のコード部分、またはb）配列番号3のコード部分に対して；

55、500 mM未満の塩、および50%ホルムアミドでハイブリダイズする、項目1に記載のポリヌクレオチド。

（項目4） a）配列番号1のコード部分の少なくとも35個の連続するヌクレオチド；

50

または

b) 配列番号 3 のコード部分の少なくとも 35 個の連続するヌクレオチド；
を含む、項目 3 に記載のポリヌクレオチド。

(項目 5) 項目 1 に記載のポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

(項目 6) 項目 5 に記載の発現ベクターを含有する宿主細胞であって、真核生物細胞を含む、宿主細胞。

(項目 7) 項目 1 に記載の組換えポリヌクレオチドを発現する工程を包含する、抗原性ポリペプチドを作製する方法。

(項目 8) 項目 1 に記載のポリヌクレオチドの検出のための方法であって、該ポリヌクレオチドを、

a) 配列番号 1 のコード部分；または

b) 配列番号 3 のコード部分；

の少なくとも 25 個の連続するヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするプローブと接触させて、2 本鎖を形成する工程であって、ここで、該 2 本鎖の検出が、該ポリヌクレオチドの存在を示す、工程を包含する、方法。

(項目 9) 項目 1 に記載のポリヌクレオチドの検出のためのキットであって、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で項目 1 に記載のポリヌクレオチドの少なくとも 17 個の連続するヌクレオチドにハイブリダイズして 2 本鎖を形成するプローブ、を含む区画を含む、キット。

(項目 10) 前記プローブが検出可能に標識されている、項目 9 に記載のキット。

(項目 11) a) 配列番号 2 由来の少なくとも 17 個の連続するアミノ酸；

b) 配列番号 4 由来の少なくとも 17 個の連続するアミノ酸；または

c) 配列番号 5 由来の少なくとも 17 個の連続するアミノ酸；

に特異的に結合する抗体の結合部位を含む、結合化合物。

(項目 12) 項目 11 に記載の結合化合物であって、

a) 前記抗体の結合部位が、

1) 配列番号 2 のポリペプチドと特異的に免疫反応性であるか；

2) 配列番号 4 のポリペプチドと特異的に免疫反応性であるか；

3) 配列番号 5 のポリペプチドと特異的に免疫反応性であるか；

4) 精製されたヒト IL - B 30 タンパク質または組換え的に産生されたヒト IL - B 30 タンパク質に対して惹起されているか；

5) 精製されたマウス IL - B 30 または組換え的に産生されたマウス IL - B 30 に対して惹起されているか；

6) モノクローナル抗体、F a b または F (a b) 2 中にあるか；あるいは、b) 該結合化合物が、

1) 抗体分子であるか；

2) ポリクローナル抗血清であるか；

3) 検出可能に標識されているか；

4) 滅菌してあるか；または

5) 緩衝化組成物中にある、

結合化合物。

(項目 13) 項目 11 に記載の結合化合物を使用する方法であって、該結合化合物を、抗原を含む生物学的試料と接触させる工程であって、ここで、該接触により、結合化合物：抗原複合体が形成される、工程を包含する、方法。

(項目 14) 前記生物学的試料がヒト由来であり、そして前記結合化合物が抗体である、項目 13 に記載の方法。

(項目 15) 項目 12 に記載の結合化合物、および：

a) 該検出のための該結合化合物の使用についての説明資料；または

b) 該結合化合物を分離するための区画、

を含む、検出キット。

10

20

30

40

50

(項目 16) 実質的に純粋な、または単離された抗原性ポリペプチドであって、項目 1 に記載の結合組成物に結合し、そしてさらに

- a) 配列番号 2 由来の少なくとも 17 個の連続するアミノ酸；
- b) 配列番号 4 由来の少なくとも 17 個の連続するアミノ酸；または
- c) 配列番号 5 由来の少なくとも 17 個の連続するアミノ酸、

を含む、ポリペプチド。

(項目 17) 項目 16 に記載のポリペプチドであって、

a) 霊長類 IL - B 30 タンパク質由来の少なくとも 25 個の連続するアミノ酸残基の少なくとも 1 つのフラグメントを含むか；

b) げっ歯類 IL - B 30 タンパク質由来の少なくとも 25 個の連続するアミノ酸残基の少なくとも 1 つのフラグメントを含むか；

c) 可溶性ポリペプチドであるか；

d) 検出可能に標識されているか；

e) 滅菌組成物中にあるか；

f) 緩衝化組成物中にあるか；

g) 細胞表面レセプターに結合しているか；

h) 組換え産生されたか、または

i) 天然に存在するポリペプチド配列を有する、ポリペプチド。

(項目 18) 項目 17 に記載のポリペプチドであって、

a) 配列番号 2 の少なくとも 17 個の連続するアミノ酸を含むか；

b) 配列番号 4 の少なくとも 17 個の連続するアミノ酸を含むか；または

c) 配列番号 5 の少なくとも 17 個の連続するアミノ酸を含む、

ポリペプチド。

(項目 19) 細胞または組織培養細胞の生理または発生を調節する方法であって、該細胞を、哺乳動物 IL - B 30 のアゴニストまたはアンタゴニストと接触させる工程を包含する、方法。

(項目 20) 項目 19 に記載の方法であって、

a) 前記接触させる工程が、G - C S F および / もしくは IL - 6 のアゴニストもしくはアンタゴニストと組み合わせられるか；または

b) 前記接触させる工程が、IL - B 30 に特異的に結合する抗体の結合部位を含む結合組成物を含むアンタゴニストとの接触である、方法。

【発明の効果】

【0020】

新規のインターロイキン組成物および関連する化合物、ならびにそれらの使用のための方法を提供する。

【発明を実施するための形態】

【0021】

(好ましい実施態様の詳細な説明)

本明細書中に引用される全ての参考文献は、個々の刊行物または特許出願のそれぞれが、参考として援用されることが具体的かつ個々に示されるように、同程度に本明細書中に参考として援用される。

【0022】

(I. 一般)

本発明は、サイトカイン（これは、例えば、免疫細胞または他の細胞の間でシグナルを媒介し得る、分泌される分子である）である種々の哺乳動物タンパク質をコードするアミノ酸配列および DNA 配列を提供する。例えば、Paul (1994) Fundamental Immunology (第3版) Raven

Press, N. Y. 「The full length cytokines, a

nd fragments, or antagonists will be useful in physiological modulation of cells expressing a receptor」を参照のこと。IL - B 3 0 は、(例えば、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、マクロファージ、樹状細胞、造血前駆体細胞などのようなリンパ球細胞を含む)造血細胞に対して刺激効果または阻害効果のいずれかを有するようである。タンパク質はまた、タンパク質上の種々のエピトープ(直鎖状エピトープまたは立体的エピトープの両方)に対する抗体を惹起させるための抗原(例えば、免疫原)として有用である。

【0023】

IL - B 3 0 をコードする c D N A は、ヒト細胞株から同定された。この分子は、h u I L - B 3 0 と称された。ブタの配列に対応する関連遺伝子もまた、同定された。げっ歯類の遺伝子(例えば、マウス由来)もまた、記載される。

10

【0024】

ヒト遺伝子は、約168アミノ酸の可溶性低分子サイトカイン様タンパク質をコードする。シグナル配列は、おそらく、約21残基であり、そしてM e t からほぼA l a にわたっている。表1ならびに配列番号1および2を参照のこと。IL - B 3 0 は、長鎖サイトカインのメンバーの構造的モチーフ特性を示す。例えば、IL - B 3 0 、G - C S F、およびIL - 6 (G e n B a n k から入手可能な配列)を比較のこと。表2もまた参照のこと。

【0025】

20

【表 1】

霊長類（例えば、ヒト）に由来する IL-B30 をコードする核酸（配列番号 1）。翻訳された
アミノ酸配列は、配列番号 2 である。

ATG CTG GGC 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 GGC 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

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

20

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

30

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

表1 続

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

コード配列

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

げっ歯類 (例えば、マウス) の IL-B30 (配列番号3および4) :

CGCTTAGAAG TCGGACTACA GAGTTAGACT CAGAACCAAA GGAGGTGGAT AGGGGGTCCA

CAGGCCTGGT GCAGATCACA GAGCCAGCCA GATCTGAGAA GCAGGGAACA AG ATG
 Met
 -21

CTG GAT TGC AGA GCA GTA ATA ATG CTA TGG CTG TTG CCC TGG GTC ACT
 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
 Gln Gly Leu Ala Val Pro Arg Ser Ser Ser Pro Asp Trp Ala Gln Cys
 1 5 10

CAG CAG CTC TCT CGG AAT CTC TGC ATG CTA GCC TGG AAC GCA CAT GCA
 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
 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
 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
 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
 Leu Ala Phe Tyr Lys His Leu Leu Asp Ser Asp Ile Phe Lys Gly Glu
 80 85 90

10

20

30

40

表1 続

CCT GCT CTA CTC CCT GAT AGC CCC ATG GAG CAA CTT CAC ACC TCC CTA
 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
 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
 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
 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
 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
 Pro Thr Ala
 175

ATCTATCAGC CCAGACATCT ACCAGTTAAT TAACCCATTA GGACTTGTGC TGTTCTTGTT
 TCGTTTGTTT TGCCTGAAGG GCAAGGACAC CATTATTAAA GAGAAAAGAA ACAAACCCCA
 GAGCAGGCAG CTGGCTAGAG AAAGGAGCTG GAGAAGAAGA ATAAAGTCTC GAGCCCTTGG
 CCTTGAAGC GGGCAAGCAG CTGCGTGGCC TGAGGGGAAG GGGGCGGTGG CATCGAGAAA
 CTGTGAGAAA ACCCAGAGCA TCAGAAAAAG TGAGCCCAGG CTTTGGCCAT TATCTGTAAG
 AAAACAAGA AAAGGGAAC ATTATACTTT CCTGGGTGGC TCAGGGAAAT GTGCAGATGC
 ACAGTACTCC AGACAGCAGC TCTGTACCTG CCTGCTCTGT CCCTCAGTTC TAACAGAATC
 TAGTCACTAA GAACTAACAG GACTACCAAT ACGAACTGAC AAA

10

20

30

【 0 0 2 6 】

【表 2】

IL-B30 と比較した、種々の IL-6 および G-CSF 実施態様の比較。ヒト IL-B30 は、配列番号 2 ; マウス IL-B30 は、配列番号 4 ; ブタ IL-B30 は、配列番号 5 ; ウシ G-CSF は、配列番号 6 ; ネコ G-CSF は、配列番号 7 ; ヒト G-CSF は、配列番号 8 ; マウス G-CSF は、配列番号 9 ; カワウソ IL-6 は、配列番号 10 ; ネコ IL-6 は、配列番号 11 ; ヒト IL-6 は、配列番号 12 ; ヒツジ IL-6 は、配列番号 13 ; マウス IL-6 は、配列番号 14 ; ニワトリ MGF は、配列番号 15 であり ; そして KSHV (すなわち、カポジ肉腫ヘルペスウイルス) であるウイルス IL-6 は、配列番号 16 である。

```

il130_human .....VPGG SSPVWTQCQQ LSQKLCT.LA WSAHPLVG..
il130_mouse .....VPRS SSPDWAQCQQ LSRNLCM.LA WNAHAPAG..
il130_pig .....
gcsf_bovin .....TPLG P.....AR SL PQSFLLKC LEQVRKIQAD GAELQERL..
gcsf_felca .....TPLG P.....TS SL PQSFLLKC LEQVRKVQAD GTALQERL..
gcsf_human .....TPLG P.....AS SL PQSFLLKC LEQVRKIQGD GAALQEKLV..
gcsf_mouse VPLVTVSALP P.....SL PL PRSFLLKS 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 EDFKNDTPS RLLLTTPPEKT EALIKHIVDK ISAIRKEI..
il6_mouse .AFPTSQVRR GDFTEDTPN R.FVYTTSQV GGLITHVLWE IVEMRKEL..
mgf_chick .....APLAELSGD HDFQLFLHKN LEFTRKIRGD VAALQRAV..
il6_khsv .....TRG KLPDAPEFEK DLLLIQRLNWM LWVIDECFRD

```

```

il130_human .HMD.LREEG DEETTNDVPH I...QCGDGC DPQGLRDNSQ FCLQRIHQGL
il130_mouse .HMNLLREEE DEETKNNVPR I...QCEDGC DPQGLKDNSQ FCLQRIHQGL
il130_pig .....
gcsf_bovin .CAA.HKLCH PEELMLLRHS LGIP.QAPLS SCSSQSLQLR GCLNQLHGGL
gcsf_felca .CAA.HKLCH PEELVLLGHA LGIP.QAPLS SCSSQALQLT GCLRLHSGGL
gcsf_human ECAT.YKLCH PEELVLLGHS LGIP.WAPLS SCPSQALQLA GCLSQLHSGGL
gcsf_mouse .CAT.YKLCH PEELVLLGHS LGIP.KASLS GCSSQALQQT QCLSQLHSGGL
il6_otter .CDK.YNKCE DSKEVLAENN LNLPKLAEKD RCFQSRFNQE TCLTRITTTGL
il6_felca .CDN.YNKCE DSKEALAENN LNLPKLAEKD GCFQSGFNQE TCLTRITTTGL
il6_human .CNK.SNMCE SSKEALAENN LNLPKMAEKD GCFQSGFNQE TCLVKIITGL
il6_sheep .CEK.NDECE NSKETLAENK LKLPKMEEDK GCFQSGFNQA ICLIKTTAGL
il6_mouse .CNG.NSDCM NNDDALAENN LKLPETQRND GCYQTGYNQE ICLLKISSGL
mgf_chick .CDT.FQLCT EEELQLVQPD PHLV.QAPLD QCHKRGFQAE VCFTQIRAGL
il6_khsv LCYR.TGICK GILEPAAIFH LKLPAINDTD HCGLIGFNET SCLKKLADGF

```

```

il130_human IFYEKLIGSD IFTGE.....PSLLPDSPV AQLHASLLGL SOLLQPE..G
il130_mouse AFYKHLIGSD IFKGE.....PALLPDSPM EQLHTSLLGL SOLLQPE..D
il130_pig VFYEKLIGSD IFTGE.....PSLHPDGSV GQLHASLLGL ROLLQPE..G
gcsf_bovin FLYQGLLQAL AGIS.....PELAPTLDT LQLDVTDFAT NIWLQMEDLG
gcsf_felca FLYQGLLQAL AGIS.....PELAPTLDM LQLDITDFAI NIWQMEDVG
gcsf_human FLYQGLLQAL EGIS.....PELGPTLDT LQLDVADFAT TIWQMEELG
gcsf_mouse CLYQGLLQAL SGIS.....PALAPTLDL LQLDVANFAT TIWQMENLG
il6_otter QEFQIHLKYL ESNYEG...N KDNAHSVYIS TKHLLQTLRP M..NQIEVTT
il6_felca QEFQIYLKFL QDKYEG...D KENAKSVYTS TNVLLQMLKR KGXNQDEVTI
il6_human LEFEVYLEYL QNRFES...S BEQARAVQMS TKVLIQFLQK KAKNLDAITT
il6_sheep LEYQIYLDL QNEFEG...N QETVMELQSS IRTLIQILKE KIAGL....I
il6_mouse LEYHSYLEYM KNNLKDN..K KDKARVLQRD TETLIHIFNQ EVKDLHKIVL
mgf_chick HAYHDSLGAV LRLLP.....NHTTLVET LQLDAANLSS NIQQMEDLG
il6_khsv FEFEVLKFL TTEFGKSVIN VDVMEILLTKT LGWDIQEELN KLTKTHY..S

```

10

20

30

40

表 2 続

```

il130_human HHWETQQIP. .SLSPSQ..P WQRLLLRFKI LRSLOAFVAV AARVFAHGAA
il130_mouse HFRETQQMP. .SLSSSQ..Q WQRPLLRSKI LRSLOAFVAV AARVFAHGAA
il130_pig HHWETEQTP. .SPSPSQ..P WQRLLLRLKI LRSLOAFVAV AARVFAHGAA
gcsf_bovin AAPAVQPTQ. .GAMPTFTSA FQRRAGGVLV ASQLHRFLEL AYRGLRYLAE
gcsf_felca MAPAVPPTQ. .GTMPFTTSA FQRRAGGTLV ASNLQSFLEV AYRALRHFTK
gcsf_human MAPALQPTQ. .GAMPAFASA FQRRAGGVLV ASHLQSFLEV SYRVLRHLAQ
gcsf_mouse VAPTVQPTQ. .SAMPFTTSA FQRRAGGVLV ISYLQGFLET ARLALHHLA.
il16_otter PDPTTDASL. .QALFKSQDK WLKHTTIHLI LRRLEDFLQF SLRAIRIM..
il16_felca PVPTVEVGL. .QLSCSHR.R VAEAHNNHLT LRRLEDFLQF RLRAVRIM..
il16_human PDPTTNASL. .LTKLQANQ WLQDMTTHLI LRSFKEFLQS SLRALRQM..
il16_sheep TTPATHTDM. .LEKMQSSNE WVKNAKVIII LRSLENFLQF SLRAIRMK..
il16_mouse PTFISNALL. .TDKLESQKE WLRTKTIQFI LKSLEEFKLV TLRSTRQT..
mgf_chick LDTVTLPAEQ RSPPTFTSGP FQQQVGGFFI LANFQRFLET AYRALRHLLAR
il16_khsv P.PKFDRG.. LLGRLQGLKY WVRHFASFVY LSAMEKFAGQ AVRVLDSIPD

```

10

```

il130_human TLSP....
il130_mouse TLTEPLVPTA
il130_pig TLSQ....
gcsf_bovin P.....
gcsf_felca P.....
gcsf_human P.....
gcsf_mouse .....
il16_otter .....
il16_felca .....
il16_human .....
il16_sheep .....
il16_mouse .....
mgf_chick L.....
il16_khsv VTPTDVHDK

```

20

【 0 0 2 7 】

関連したサイトカインタンパク質に対する I L - B 3 0 の構造的ホモロジーは、この分子の関連した機能を示唆する。I L - B 3 0 は、I L - 6 および G - C S F に配列類似性を示す長鎖サイトカインである。

【 0 0 2 8 】

I L - B 3 0 のアゴニストまたはアンタゴニストはまた、機能的アンタゴニストまたはレセプターアンタゴニスト（例えば、これらは、それら各々のレセプターに結合する I L - 6 または G - C S F をブロックするか、または反対の作用を媒介する）として作用し得る。従って、I L - B 3 0 またはそのアンタゴニストは、免疫傷害（例えば、T細胞免疫不全、慢性炎症もしくは組織拒絶）を含む異常な医学的状態、または心臓血管もしくは神経生理学的な状態における処置において有用であり得る。

30

【 0 0 2 9 】

天然の抗原は、標的細胞における生物学的または生理学的応答を導く種々の生化学的応答を媒介し得る。本明細書中で特徴付けられる好ましい実施態様は、ヒトに由来するが、他の霊長類、または他の種の対応物実施態様も事実上存在する。他の哺乳動物種（例えば、霊長類、イヌ、ネコ、およびげっ歯類）におけるタンパク質のさらなる配列もまた、利用可能である。以下を参照のこと。以下の記載は、例示の目的でヒト I L - B 3 0 に関するが、同様に、他の種からの関連した実施態様に適用可能である。

40

【 0 0 3 0 】

(I I . 精製 I L - B 3 0)

ヒト I L - B 3 0 のアミノ酸配列は、配列番号 2 内に 1 つの実施態様として示される。このタンパク質をコードする他の天然に存在する核酸は、提供された配列を用いる標準的手順（例えば、P C R 技術）またはハイブリダイゼーションによって単離され得る。これらのアミノ酸配列（アミノからカルボキシまで提供される）は、他のタンパク質および例示する多くの改変体からタンパク質抗原を区別することを可能にする、サイトカインの配列情報を提供することにおいて重要である。さらに、このペプチド配列は、このようなセグメントを認識する抗体を産生するためのペプチドの調製を可能にし、そしてヌクレオチ

50

ド配列は、オリゴヌクレオチドプローブの調製を可能にする。そしてこれらの両方が、このような配列をコードする遺伝子の検出または単離（例えば、クローニング）のためのストラテジーである。

【 0 0 3 1 】

本明細書中に使用される用語「ヒト可溶性 I L - B 3 0」とは、タンパク質の文脈において使用される場合、配列番号 2 に示される可溶性ポリペプチドまたはその有意なフラグメントに対応するアミノ酸配列を有するタンパク質を含む。好ましい実施態様としては、特定された長さの複数の異なる（例えば、重複しない）セグメントが挙げられる。代表的には、複数の、少なくとも 2、より通常には少なくとも 3、そして好ましくは、5、7、またはそれ以上である。長さの複数の最小値が提供され、種々のサイズのより長い長さ（例えば、1つの長さは、7 および 2つの長さは、1 2）が適切であり得る。

10

【 0 0 3 2 】

結合成分（例えば、抗体）は、代表的には、例えば、少なくとも約 1 0 0 n M、通常は約 3 0 n M より良好、好ましくは約 1 0 n M より良好、そしてより好ましくは約 3 n M より良好な高い親和性で I L - B 3 0 と結合する。対応物のタンパク質は、ヒト以外の哺乳動物種（例えば、他の霊長類、有蹄類、またはげっ歯類）において見出される。非哺乳動物種（例えば、トリまたは両生類）もまた、構造的または機能的に関連した遺伝子およびタンパク質を有する。

【 0 0 3 3 】

本明細書中で使用される用語「ポリペプチド」とは、意味のあるフラグメントまたはセグメントを含み、そして少なくとも約 8 アミノ酸、一般的には、少なくとも約 1 2 アミノ酸、代表的には、少なくとも約 1 6 アミノ酸、好ましくは、少なくとも約 2 0 アミノ酸、そして特に好ましい実施態様においては、少なくとも約 3 0 以上のアミノ酸（例えば、3 5、4 0、4 5、5 0 など）のアミノ酸残基のストレッチを含む。このようなフラグメントは、全ての実際の組み合わせにおいて、実質的に全ての位置で始まり、および / または終わる（例えば、残基 1、2、3 など）で始まり、そして例えば、1 5 0、1 4 9、1 4 8 など）で終わる）末端を有し得る。特に、目的のペプチドは、構造ドメイン境界（例えば、ヘリックス A、B、C、および / または D）に対応する末端を有する。表 1 を参照のこと。

20

【 0 0 3 4 】

用語「結合組成物」とは、（例えば、抗体 - 抗原相互作用において）I L - B 3 0 と特異的に結合する分子をいう。特異性は、多少包括的（例えば、特定の実施態様、または例えば、霊長類、げっ歯類などの関連した実施態様の群に特異的）であり得る。これは、天然の生理学的に相当するタンパク質 - タンパク質相互作用（共有結合または非共有結合のいずれか）においてを含む、I L - B 3 0 と特異的に会合する化合物（例えば、タンパク質）もまた含む。この分子は、ポリマーまたは化学試薬であり得る。機能的アナログは、構造的改変を有するタンパク質であり得るか、または適切な結合決定基と相互作用する分子形状を有する分子であり得る。これらの化合物は、レセプター結合相互作用のアゴニストまたはアンタゴニストとして作用し得る（例えば、Goodmanら（編）GoodmanおよびGilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics（最新版）Pergamon Pressを参照のこと）。

30

40

【 0 0 3 5 】

例えば、タンパク質の文脈において、実質的に純粋とは、代表的には、タンパク質が、他の夾雑タンパク質、核酸、または元の供給源生物に由来する他の生物学的物質を含まないことを意味する。純度は、標準的な方法（代表的には重量）によってアッセイされ得、そして通常は、少なくとも約 4 0 % 純粋、一般的には、少なくとも約 5 0 % 純粋、しばしば少なくとも約 6 0 % 純粋、代表的には、少なくとも約 8 0 % 純粋、好ましくは、少なくとも約 9 0 % 純粋、そして最も好ましい実施態様においては、少なくとも約 9 5 % 純粋である。キャリアまたは賦形剤が、しばしば添加される。

50

【 0 0 3 6 】

ポリペプチドまたはフラグメントの可溶性は、環境およびポリペプチドに依存する。多くのパラメーター（温度、電解質環境、ポリペプチドのサイズおよび分子特性、ならびに溶媒の性質を含む）が、ポリペプチドの可溶性に影響を及ぼす。代表的には、ペプチドが使用される温度は、約 4 ~ 約 6 5 の範囲である。通常は、使用時の温度は、約 1 8 を超える。診断目的には、温度は、通常は、ほぼ室温または室温より暖いが、アッセイにおいて成分が変性する温度より低い。治療目的には、温度は、通常は体温であり、代表的にはヒトおよびマウスについては約 3 7 であるが、一定の状況下で、インサイチュまたはインビトロで温度は、上昇され得るか、または低下され得る。

【 0 0 3 7 】

ポリペプチドのサイズおよび構造は、一般的には、実質的に安定な状態にあり、そして通常は、変性された状態にない。ポリペプチドは、例えば、可溶性を付与するために、4 次元構造で他のポリペプチドと会合し得るか、または脂質または界面活性剤と会合し得る。

【 0 0 3 8 】

溶媒および電解質は、通常、生物学的活性を保存するために使用される型の生物学的に適合性の緩衝液であり、そして通常、生理学的水溶性溶媒に近い。通常、溶媒は、中性 pH、代表的には、約 5 ~ 1 0 の間、そして好ましくは、約 7 . 5 を有する。いくつかの場合において、1 つ以上の界面活性剤が添加され、代表的には、穏やかな非変性界面活性剤（例えば、CHS（コレステリルヘミスクシネート）もしくはCHAPS（3 - [3 - コラミドプロピル）ジメチルアンモニオ] - 1 - プロパンスルホネート））またはタンパク質の構造特性もしくは生理学的特性の有意な破壊を回避するように十分低濃度で添加される。他の場合において、強い界面活性剤が有意な変性をもたらすために使用され得る。

【 0 0 3 9 】

（ I I I . 物理的改変体 ）

本発明はまた、IL - B 3 0 抗原のアミノ酸配列と実質的なアミノ酸配列同一性を有するタンパク質またはペプチドを含む。改変体としては、種改変体、多型性改変体、または対立遺伝子改変体が挙げられる。

【 0 0 4 0 】

アミノ酸配列ホモロジー、または配列同一性は、必要ならば、残基マッチを最適化することによって、必要に応じてギャップを導入することによって決定される。Needlehamら（1970）J . Mol . Biol . 4 8 : 4 4 3 - 4 5 3 ; Sankoffら（1983）Time Warps , String Edits , and Macromolecules : The Theory and Practice of Sequence Comparison , Addison - Wesley , Reading , MA の第 1 章 ; ならびにIntelliGenetics , Mountain View , CA ; およびUniversity of Wisconsin Genetics Computer Group , Madison , WI からのソフトウェアパッケージもまた参照のこと。配列同一性は、保存的置換を考慮する場合、マッチするにつれて変化する。保存的置換としては、代表的には、以下の群における置換が挙げられる：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸；アスパラギン、グルタミン；セリン、スレオニン；リジン、アルギニン；およびフェニルアラニン、チロシン。この保存は、生物学的特徴、機能的特徴、または構造的特徴に対して適用され得る。相同的なアミノ酸配列は、代表的には、タンパク質配列の天然の多型性または対立遺伝子、および種間のバリエーションを含むことが意図される。代表的な相同的タンパク質またはペプチドは、IL - B 3 0 のアミノ酸配列と 2 5 ~ 1 0 0 % の同一性（ギャップが導入され得る場合）から、5 0 ~ 1 0 0 % の同一性（保存的置換が含まれる場合）を有する。同一性の尺度は、少なくとも約 3 5 % 、一般的には、少なくとも約 4 0 % 、しばしば、少なくとも約 5 0 % 、代表的には、少なくとも約 6 0 % 、通常は、少なくとも約 7 0 % 、好ましくは、少なくとも約 8 0 % 、そしてより好ましくは、少なくとも約 9 0 % であ

10

20

30

40

50

る。

【0041】

単離された I L - B 3 0 の D N A は、ヌクレオチド置換、ヌクレオチド欠失、ヌクレオチド挿入、および短いヌクレオチドストレッチの反転によって、容易に改変され得る。これらの改変は、これらの抗原、それらの誘導体、または類似の生理学的、免疫原性、抗原性、または他の機能的活性を有するタンパク質をコードする新規の D N A 配列を生じる。これらの改変された配列は、変異体抗原を産生するため、または発現を増強させるために使用され得る。増強された発現は、遺伝子増幅、増加された転写、増加された翻訳、および他の機構が関与し得る。「変異型 I L - B 3 0」は、上に提示された I L - B 3 0 の配列同一性の定義内に入るが、欠失、置換、または挿入のいずれであろうと、天然に普通に見出される I L - B 3 0 のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を有する別のポリペプチドを含む。これは、一般的には、配列番号 2 の配列を有するタンパク質と顕著な同一性を有し、およびそれらの配列と種々の生物学的活性（例えば、抗原性または免疫原性）を共有するタンパク質を含み、そして好ましい実施態様において、天然の完全長の開示された配列の大部分を含む。完全長の配列が代表的には好ましいが、短縮型バージョンもまた有用である。同様に、天然の供給源から見出される遺伝子またはタンパク質が、代表的には最も望ましい。類似の概念は、異なる I L - B 3 0 タンパク質、特に、種々の温血動物（例えば、哺乳動物および鳥類）において見出される I L - B 3 0 タンパク質に適用される。これらの記載は、一般的に、全ての I L - B 3 0 タンパク質を含み、具体的に考察された特定の霊長類の実施態様に限定されないことを意図する。

10

20

【0042】

I L - B 3 0 の変異誘発はまた、アミノ酸挿入または欠失を作製することによって行われ得る。置換、欠失、挿入、または任意の組み合わせが、最終構築物に達するように生成され得る。挿入は、アミノ末端融合またはカルボキシ末端融合を含む。ランダムな変異誘発を、標的コドンにおいて実施し得、次いで、発現された変異体は、所望の活性についてスクリーニングされ得る。公知の配列を有する D N A 中の所定の部位で置換変異体を作製する方法は、（例えば、M 1 3 プライマー変異誘発またはポリメラーゼ連鎖反応（P C R）技術によって）当該分野で周知である。例えば、S a m b r o o k ら（1989）；A u s u b e l ら（1987 および増補）；ならびに K u n k e l ら（1987）M e t h o d s i n E n z y m o l . 1 5 4 : 3 6 7 - 3 8 2 を参照のこと。好ましい実施態様としては、例えば、ヌクレオチドレベルまたはアミノ酸レベルにて 1 つのひだ（f o l d）、2 つのひだ、3 つのひだ、5 つのひだ、7 つのひだなどの好ましい保存的置換が挙げられる。好ましくは、これらの置換は、保存されたシステインから離れており、そしてしばしば、らせん構造ドメインから離れた領域に存在する。このような改変体は、特異的な抗体を産生するために有用であり得、そしてしばしば多くのまたは全ての生物学的特性を共有する。

30

【0043】

本発明はまた、組換えタンパク質（例えば、これらのタンパク質に由来するセグメントを使用した異種融合タンパク質）を提供する。異種融合タンパク質は、天然には、同じ様式で通常は融合されないタンパク質またはセグメントの融合物である。同様の概念は、異種核酸配列に適用される。

40

【0044】

さらに、新たな構築物は、他のタンパク質に由来する同様の機能的ドメインの組み合わせから作製され得る。例えば、標的結合セグメントまたは他のセグメントは、異なる新たな融合ポリペプチド間またはフラグメント間で「交換（s w a p）」され得る。例えば、C u n n i n g h a m ら（1989）S c i e n c e

2 4 3 : 1 3 3 0 - 1 3 3 6 ; および O ' D o w d ら（1988）J . B i o l . C h e m . 2 6 3 : 1 5 9 8 5 - 1 5 9 9 2 を参照のこと。

【0045】

B e a u c a g e および C a r r u t h e r s （1981）T e t r a . L e t t s .

50

22:1859-1862によって記載されるホスホルアミダイト方法は、適切な合成DNAフラグメントを産生する。二重鎖フラグメントは、しばしば、相補鎖を合成しそして適切な条件下でこの鎖とアニーリングさせるか、または適切なプライマー配列を用いたDNAポリメラーゼを使用して相補鎖を付加するか（例えば、PCR技術）のいずれかによって得られる。

【0046】

構造分析は、サイトカインのIL-6ファミリーと比較して、この遺伝子に適用され得る。このファミリーとしては、例えば、IL-6、IL-11、IL-12、G-CSF、LIF、OSM、CNTF、およびObが挙げられる。IL-6ファミリーの他のメンバーとのヒト、ブタ、およびマウスのIL-B30配列のアラインメントは、構造特徴の規定を可能にする。特に、βシートおよびαヘリックス残基は、例えば、RASMOLプログラム(Bazanら(1996)Nature 379:591; Lodiら(1994)Science 263:1762-1766; SayleおよびMilner-White(1995)TIBS 20:374-376; ならびにGronenbergら(1991)Protein Engineering 4:263-269を参照のこと)を使用して決定され得る。置換についての好ましい残基としては、レセプターと相互作用することが推測される、表面にむき出した残基が挙げられる。機能を保存する他の残基は、特に表面が露出された残基から離れた位置における、保存的置換基である。

10

【0047】

(IV. 機能的改変体)

20

IL-B30に対する生理学的応答のブロックは、そのレセプターに対するリガンドの結合の競合的阻害をもたらし得る。

【0048】

本発明のインビトロアッセイは、しばしば、単離されたタンパク質、これらのタンパク質のレセプター結合セグメントを含む可溶性フラグメント、または固相基質に付着したフラグメントを使用する。これらのアッセイはまた、結合セグメントの変異および改変、またはサイトカインの変異および改変（例えば、IL-B30アナログ）のいずれかの効果の診断的決定を可能にする。

【0049】

本発明はまた、例えば、サイトカインに対する中和抗体、またはレセプター結合フラグメントが試験化合物と競合する競合薬物スクリーニングアッセイの使用を意図する。

30

【0050】

IL-B30抗原の「誘導体」とは、天然に生じる形態からのアミノ酸配列変異体、グリコシル化改変体、および他の化学的部分を有する共有結合体または凝集結合体を含む。共有結合誘導体は、例えば、標準的方法によって、IL-B30のアミノ酸側鎖またはN末端またはC末端において見出される基に機能性を連結することによって調製され得る。例えば、LundbladおよびNoyes(1988)Chemical Reagents for Protein Modification, 第1巻~第2巻, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL; Hugli(1989編)Techniques in Protein Chemistry, Academic Press, San Diego, CA; およびWong(1991)Chemistry of Protein Conjugation and Cross Linking, CRC Press, Boca Raton, FLを参照のこと。

40

【0051】

特に、グリコシル化改変が挙げられ、例えば、ポリペプチドの合成およびプロセッシングの間か、またはさらなるプロセッシング工程においてポリペプチドのグリコシル化パターンを改変することによって作製される。例えば、Elbein(1987)Ann. Rev. Biochem. 56:497-534を参照のこと。リン酸化アミノ酸残基（例えば、ホスホチロシン、ホスホセリン、またはホスホスレオニン）を含む他の小さな改変を有する同じ1次アミノ酸配列を有するペプチドのバージョンもまた含まれる。

50

【0052】

IL-B30と他の相同的または非相同的タンパク質との間の融合ポリペプチドもまた提供される。多くのサイトカインレセプターまたは他の表面タンパク質は、多量体（例えば、ホモダイマー実体）であり、そして反復構築物は、タンパク質切断に対する感受性の減少を含む種々の利点を有し得る。代表的な例は、融合されたりガンドの存在または位置を容易に決定し得るように、レポーターポリペプチド（例えば、ルシフェラーゼ）のタンパク質のセグメントまたはドメイン（例えば、レセプター結合セグメント）との融合物である。例えば、Dullら、米国特許第4,859,609号を参照のこと。他の遺伝子融合パターンとしては、細菌βガラクトシダーゼ、trpE、プロテインA、βラクタマーゼ、αアミラーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、酵母α接合因子、およびHis6配列のFLAG配列のような検出または精製タグが挙げられる。例えば、Godowskiら（1988）Science 241:812-816を参照のこと。

10

【0053】

融合ペプチドは、代表的には、組換え核酸方法または合成ポリペプチド方法のいずれかによって作製される。核酸の操作および発現のための技術は、一般的に、例えば、Sambrookら（1989）Molecular Cloning: A Laboratory Manual（第2版）、第1巻～第3巻、Cold Spring Harbor Laboratory;およびAusubelら（1993編）Current Protocols in Molecular Biology, Greene and Wiley, NY.に記載される。ポリペプチドの合成のための技術は、例えば、Merrifield（1963）J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-2156; Merrifield（1986）Science 232:341-347; Athertonら（1989）Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford;およびGrant（1992）Synthetic Peptides: A User's Guide, W. H. Freeman, NY.に記載される。再折り畳み方法は、合成タンパク質に適用可能であり得る。

20

【0054】

本発明はまた、アミノ酸配列の改変またはグリコシル化における変化以外のIL-B30タンパク質の誘導体の使用を意図している。そのような誘導体は、化学的部分またはタンパク質キャリアーとの共有結合または凝集結合を含み得る。共有結合または凝集誘導体は、免疫原として、イムノアッセイの試薬として、または結合パートナー（例えば、他の抗原）のアフィニティー精製のような精製法において有用である。抗IL-B30抗体または別の結合組成物のアッセイ、または精製における使用のため、IL-B30は、当該分野において周知の方法により、固体支持体（例えば、臭化シアン活性化SEPHAROSE）に共有結合によって固定され得るかまたはグルタルアルデヒド架橋を用いるかもしくは用いずにポリオレフィン表面に吸着させ得る。また、IL-B30タンパク質は、例えば、診断アッセイでの使用のために検出可能な基で標識され得る。IL-B30の精製は、固定化された抗体または相補的な結合パートナー（例えば、レセプターの結合部分）によって達成され得る。

30

40

【0055】

可溶化されたIL-B30または本発明のフラグメントは、結合特異的抗血清または抗体の生成のための免疫原として使用され得る。精製した抗原は、モノクローナル抗体または抗原結合フラグメントをスクリーニングために使用され得、これらは、天然の抗体の抗原結合フラグメント（例えば、Fab, Fab', F(ab)₂など）を包含する。精製されたIL-B30抗原はまた、上昇したサイトカインレベルの存在に応答して生成した抗体を検出する試薬として使用され得、この存在は、異常または特定の生理学的状態または疾病状態の診断となり得る。この発明は、配列番号1で示されたヌクレオチド配列でコードされたアミノ酸配列、またはそれを含むたんぱく質のフラグメントに対して惹起した抗体を意図している。特に、この発明は、特定のドメイン（例えば、ヘリックスA、B、

50

CまたはD)に対して結合親和力を有するかまたはこれに対して惹起された抗体を意図している。

【0056】

本発明は、更なる密接に関連した種改変体の単離を意図している。サザンおよびノーザンブロット分析によって、同様の遺伝実体が他の哺乳動物に存在することが確かめられる。IL-B30は、種改変体(例えば、げっ歯動物、ウサギ目の動物、肉食動物、偶蹄類、奇蹄類および霊長類)において広範であるようである。

【0057】

本発明はまた、構造、発現、そして機能の特有性および類似性双方を示す一群の関連抗体を単離する手段を提供する。分子の多くの生理学的影響の解明は、分子の更なる別種または多型変異体の単離および特徴づけによって大いに加速する。詳細には、本発明は、異なる種においてさらなる相同な遺伝実体を同定するに有用なプローブを提供する。

【0058】

この単離された遺伝子は、IL-B30の発現が欠如した細胞(例えば、対応するタンパク質を欠き、そしてネガティブバックグラウンド活性を示す種タイプまたは細胞のいずれか)の形質転換を可能にする。このことによって、非形質転換コントロール細胞と比較して、IL-B30の機能の分析が可能になるはずである。

【0059】

これらの抗原によって媒介される様々な生理学的機能を達成する重要な構造エレメントの解明は、現代の分子生物学の標準技術を使用して行い得る(特に、関連したクラス数の比較において)。例えば、Cunninghamら(1989)Science 243:1339-1336に記載されたホモログスキャンニング変異誘発技術、O'Dowdら(1988)J. Biol. Chem. 263:15985-15992で使用されたアプローチ、およびLechleiterら(1990)EMBO J. 9:4381-4390を参照のこと。

【0060】

細胞内機能はおそらく、レセプターシグナル伝達を含む。しかし、タンパク質内在化は、ある環境下で起り得る。そして、細胞内成分とサイトカインとの間の相互作用も起り得る。相互作用成分とのIL-B30の相互作用の特定セグメントは、変異誘発または直接的な生化学的手段(例えば、架橋またはアフィニティ法)によって同定され得る。結晶学的または他の物理的方法による構造分析もまた適用される。シグナル変換のメカニズムの更なる研究は、アフィニティ法または遺伝的手段(例えば、変異体の相補分析)によって単離可能であり得る関連成分の研究を含む。

【0061】

IL-B30の発現および制御の更なる研究が追求される。この抗原に関連した制御エレメントは、異なる、生理学的、発生的、組織特異的または他の発現パターンを示すはずである。上流または下流の遺伝子領域(例えば、制御エレメント)は興味を持たれる。

【0062】

IL-B30抗原の構造研究は、新しい抗原の設計、特に、分子上にアゴニストあるいはアンタゴニスト特性を示すアナログの設計を導く。これは、所望のスペクトルの活性を示す抗原を単離するための以前、記載されたスクリーニング法と併用され得る。

【0063】

(V. 抗体)

抗体は、このIL-B30タンパク質の様々なエピトープ(種、多型あるいは対立遺伝子改変体、およびフラグメント(天然に存在する形態およびそれらの組換え形態の両方)を含む)に対して惹起され得る。加えて、抗体は、それらの活性形態または不活性形態(ネイティブ型または変性型を含む)のいずれかのIL-B30に対して惹起され得る。抗イデオタイプ抗体もまた意図される。

【0064】

抗原の予め決定されたフラグメントに対する抗体(結合フラグメントおよび単鎖型を含

10

20

30

40

50

む)は、免疫原性タンパク質とこのフラグメントとの結合体による動物の免疫によって惹起され得る。モノクローナル抗体は、所望の抗体を分泌している細胞から調製する。これらの抗体は、正常または欠損IL-B30に対する結合についてスクリーニングされ得、またはアゴニストまたはアンタゴニスト活性(例えば、レセプターで媒介された)についてスクリーニングされ得る。抗体は、アゴニストまたはアンタゴニスト(例えば、レセプターに対する結合を立体的にブロックすることによって)であり得る。これらのモノクローナル抗体は、通常、少なくとも K_D 約1mMで、より通常は少なくとも約300 μ Mで、代表的には少なくとも約100 μ Mで、より代表的には少なくとも約30 μ Mで、好ましくは、少なくとも約10 μ Mで、より好ましくは少なくとも約3 μ Mで、またはより強力で結合する。

10

【0065】

この発明の抗体はまた、診断的適用においても有用であり得る。捕捉または非中和抗体として、それらは、レセプターとの結合を阻害することなく、抗原と結合する能力についてスクリーニングされ得る。中和抗体として、それらは、競合的結合アッセイに有用であり得る。それらはまた、IL-B30タンパク質またはそのレセプターの検出または定量において有用である。例えば、Chan(1987年編)Immunology: A Practical Guide、Academic Press、Orlando、FL; Price and Newman(1991年編)Principles and Practice of Immunoassay、Stockton Press、N.Y.;およびNgo(1988年編)Nonisotopic Immunoassay、Plenum Press、N.Y.を参照のこと。交差吸収または他の試験は、様々なスペクトルの特異性(例えば、独特または共有の種特異性)を示す抗体を同定する。

20

【0066】

さらに、この発明の抗体(抗原を結合するフラグメントを含む)は、抗原に対して結合し、そして機能的結合を阻害する(例えば、生物学的応答を誘発し得るレセプターに対して)強力なアンタゴニストであり得る。それらはまた、非中和抗体として有用であり得、そして毒素または放射性核種と結合され得、その結果、この抗体が抗原と結合したとき、それを発現している(例えば、表面で)細胞は、死滅する。さらに、これらの抗体は、薬剤または他の治療剤と直接またはリンカーの手法によって間接にのいずれかで結合され得、そして薬剤標的化を達成し得る。

30

【0067】

抗原フラグメントは、免疫原として使用されるべき融合または共有結合したポリペプチドとして他の物質、特にポリペプチドと結合し得る。抗原とそのフラグメントは、様々な免疫原(キーホールリンペットヘモシアニン、ウシ血清アルブミン、破傷風毒素など)と融合または共有結合し得る。ポリクローナル抗血清調製法の説明については、Microbiology、Hoeber Medical Division、Harper and Row 1969; Landsteiner(1962)Specificity of Serological Reactions、Dover Publications、New York; Williamsら(1967)Methods in Immunology and Immunochemistry、vol. 1、Academic Press、New York;およびHarlow および Lane(1988)Antibodies: A Laboratory Manual、C SH Press、NY を参照のこと。

40

【0068】

いくつかの例で、様々な哺乳動物宿主(例えば、ネズミ、げっ歯動物、霊長類、ヒトなど)からモノクローナル抗体を調製することが望ましい。そのようなモノクローナル抗体を調製するための技術の記載は、例えば、Stitesら編、Basic and Clinical Immunology(第4版)、Lange Medical Publications、Los Altos、CA、ならびにそこに記載された参考文献;Harlow および Lane(1988)Antibodies: A Labor

50

atory Manual、CSH Press; Goding (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (第2版)、Academic Press、New York; および特に、Kohler および Milstein (1975) Nature 256: 495 - 497 (これは、モノクローナル抗体生成の1方法を議論する)に認められ得る。

【0069】

他の適切な技術は、インビトロで抗原ポリペプチドに対するリンパ球の暴露、あるいはファージまたは同様のベクターにおける抗体ライブラリーの選抜に対するリンパ球の暴露を含む。Huseら(1989)「λファージのイムノグロブリンレパートリーの大きなコンビナトリアルライブラリーの生成」、Science 246: 1275 - 1281; およびWardら、(1989) Nature 341: 544 - 546を参照のこと。本発明のポリペプチドおよび抗体は、修飾してまたはしないで使用され得、これらはキメラまたはヒト化した抗体を含む。度々、このポリペプチドと抗体は、共有結合または非共有結合のいずれかで検出可能なシグナルを提供する物質との結合によってラベルされる。広範囲の様々なラベルおよび結合技術は、公知でありそして広く科学および特許文献双方に報告されている。適切なラベルは、放射性核種、酵素、基質、コファクター、インヒビター、蛍光部分、化学発光部分、磁気粒子などを含む。そのようなラベルの使用を教示する特許は米国特許第3,817,837、3,850,752、3,939,350、3,996,345、4,277,437、4,275,149および4,366,241号を含む。組換えイムノグロブリンもまた作製され得る。Cabilly、米国特許第4,816,567号; Mooreら、米国特許第4,642,334号; およびQueenら(1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86: 10029 - 10033を参照のこと。

10

20

【0070】

この発明の抗体は、タンパク質単離においてアフィニティークロマトグラフィーにもまた使用し得る。この抗体が個体支持物と結合されたカラムは、調製され得る。例えば、Wilchekら(1984) Meth. Enzymol. 104: 3 - 55を参照のこと。

【0071】

各々のIL-B30に対して惹起された抗体はまた、抗イデオタイプ抗体を惹起するために有用である。これらは、それぞれの抗原の発現に関する様々な免疫学的状態の検出または診断において有用である。

30

【0072】

(VI. 核酸)

記載されたペプチド配列および関連試薬は、(例えば、天然源から)IL-B30をコードしているDNAクローンの検出、単離または同定に有用である。代表的には、それは、哺乳動物から遺伝子を単離するのに有用であり、そして、同様の手法が他種(例えば、トリおよび哺乳動物のような温血動物)から遺伝子を単離するのに適用される。交差ハイブリダイゼーションによって、同じものからIL-B30(例えば、多型改変体または他種)の単離がなされ得る。多くの異なったアプローチが首尾よく適切な核酸クローンを単離するため使用できる。

40

【0073】

この精製されたタンパク質または現定されたペプチドは、上に記載したように標準方法による抗体生成に有用である。合成ペプチドまたは精製タンパク質は、免疫系に対して呈示されて、モノクローナルまたはポリクローナル抗体を生成をし得る。例えば、Coligan(1991) Current Protocols in Immunology Wiley/Greene; およびHarlow および Lane(1989) Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Pressを参照のこと。

【0074】

50

例えば、この特定の結合組成物は、IL-B30を発現する細胞株から作製された発現ライブラリーのスクリーニングに使用され得る。細胞内発現のスクリーニングは、様々な染色または免疫蛍光法によって成し遂げ得る。結合組成物は、表面融合タンパク質を発現している細胞をアフィニティ精製、または選択するために使用され得る。

【0075】

このペプチドセグメントはまた、ライブラリーをスクリーニングするために適当なオリゴヌクレオチドを予想するために使用し得る。この遺伝コードは、スクリーニングのプロープとして有用な適当なオリゴヌクレオチドを選択するのに使用し得る。例えば、配列番号1を参照のこと。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術を組み合わせ、合成オリゴヌクレオチドは、ライブラリーから正しいクローンを選択するのに有用である。相補的配列もまた、プローブ、プライマーまたはアンチセンス鎖として使用され得る。例えば、アンカー化されたベクターまたはポリ-A相補的PCR技術、または他のペプチドの相補的DNAと結合した様々なフラグメントが、特に有用であるはずである。

【0076】

この発明は、生物学的に活性を有する対応したIL-B30ポリペプチド(特に、記載された配列の非翻訳5'部分をコードする部分が欠如しているポリペプチド)をコードする単離DNAまたはフラグメントの使用を意図する。加えて、この発明は、生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドをコードし、そして本明細書に記載されたDNA配列と適当な条件下でハイブリダイズし得る単離された、または組換えのDNAを包含する。該生物学的活性タンパク質またはポリペプチドは、インタクトな抗原またはフラグメントであり得、そして、例えば、配列番号2で開示されたアミノ酸配列(特に、成熟、分泌ポリペプチド)を有する。さらに、この発明は、単離されたまたは組換えDNA、またはそのフラグメントの使用を包含し、これらは分泌されたIL-B30と高いアイデンティティを示すタンパク質をコードする。この単離されたDNAは、5'および3'側面にそれぞれの調節配列を有し得る(例えば、プロモーター、エンハンサー、ポリ-A付加シグナルなど)。あるいは、発現は、コードセグメントの異種プロモーターへの作動可能な結合によって(例えば、内因性遺伝子の上流へのプロモーターの挿入によって)達成され得る。

【0077】

「単離された」核酸は、例えば、RNA、DNA、または混合したポリマーのような核酸である(これは、ネイティブな配列を天然に伴うほかの成分、(例えば、元の種由来のリボゾーム、ポリメラーゼ、および/または隣接ゲノム配列)から実質的に分離される)。この用語は、その自然に存在する環境から取り出された核酸配列を包含し、そして組換えまたはクローン化されたDNA単離物および化学的に合成されたアナログまたは異種系によって生物学的に合成されたアナログを含む。実質的に、純粋な分子は、その分子の単離された形態を含む。一般に、この核酸は、約50kb未満、普通は約30kb未満、代表的には、約10kb未満、そして好ましくは約6kb未満のベクターまたはフラグメントである。

【0078】

単離された核酸は、一般的に、分子の均質な組成物であるが、いくつかの実施態様において、わずかな異種性を含む。この異種性は、代表的に、所望の生物学的機能または活性に重要でないこのポリマーの末端、または部分に認められる。

【0079】

「組換え」核酸は、その産生の方法または構造のどちらかによって規定される。その産生法(例えば、ある方法により作製される産物)に対する文献で、この方法は、例えば、ヌクレオチド配列におけるヒト介入を含む組換え核酸技術(代表的には、選抜または生成を含む)の利用である。あるいは、この方法は、お互い天然には連続しないが、天然の産物、例えば、天然に存在する変異体を除外する2つのフラグメントの融合を含む配列の生成により作られる核酸であり得る。このように、例えば、任意の天然に存在しないベクター(合成オリゴヌクレオチド法を使用して得られる配列を含む核酸のような)で細胞を形

質転換することによって作られる産物が含まれる。そのような方法は、あるコドンと同じかまたは保存的アミノ酸をコードしている重複なコドンに置き換えるためにしばしばなされる。一方、代表的に配列認識部位の導入または除去をすることについてもなされている。

【0080】

あるいは、単一の遺伝実体を生成するための所望機能の核酸セグメントをともに結合することにもなされている。この遺伝的実体は、通常利用できる天然形態では見出されない機能の所望の組み合わせを含む。制限酵素認識部位は、しばしば、そのような人工操作の標的である。しかし、他の部位特定標的（例えば、プロモーター、DNA複製部位、調節配列、制御配列または他の有用な機能）が、設計によって組み込まれ得る。同様の概念が組換え体（例えば、融合物、ポリペプチド）のため意図される。具体的に含まれるのは、遺伝コードの重複性によりこれらの抗原のフラグメントと類似したポリペプチドをコードする合成核酸、および様々な異なる種または多型改変体由来の配列融合物である。

10

【0081】

核酸の文脈で、重要な「フラグメント」とは、少なくとも約17ヌクレオチドの連続したセグメントであり、一般に、少なくとも約22ヌクレオチド、通常、少なくとも約29ヌクレオチド、よりしばしば、少なくとも約35ヌクレオチド、代表的に、少なくとも約41ヌクレオチド、通常、少なくとも約47ヌクレオチド、好ましくは、少なくとも約55ヌクレオチド、そして特に好ましい実施態様では少なくとも約60またはそれ以上のヌクレオチド（例えば、67、73、81、89、95など）である。

20

【0082】

IL-B30タンパク質をコードするDNAは、特に、遺伝子、関連したまたは類似のタンパク質mRNAおよびcDNA種、ならびに異種からの相同性タンパク質をコードするDNAを同定するのに有用である。霊長類、げっ歯動物、イヌ、ネコおよびトリを含む他種で相同体が存在する。様々なIL-B30タンパク質は相同体であるべきであり、本明細書に含まれる。しかし、この抗原とより遠い進化関係にあるタンパク質でさえ、それらが十分な相同性を持つならばこれらの配列を使用して適切な条件で容易に単離され得る。霊長類IL-B30タンパク質が特に目的のタンパク質である。

【0083】

ゲノム配列（例えば、イントロンを含んだもの）由来の組換えクローンは、トランスジェニック研究（例えば、トランスジェニック細胞およびトランスジェニック生物体を含む）および遺伝子治療に有用である。例えば、Goodnow(1992)「Transgenic Animals」Roitt編、Encyclopedia of Immunology、Academic Press、San Diego、1502-1504頁、Travis(1992)Science 256:1392-1394、Kuhnら(1991)Science 254:707-710、Capecci(1989)Science 244:1288、Robertson(1987年編)Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach、IRL Press、Oxford、およびRosenberg(1992)J. Clinical Oncology 10:180-199を参照のこと。

30

40

【0084】

実質的な相同性（例えば、同一性）とは、核酸配列の比較文脈において、セグメントまたはこれらの相補鎖が、比較した場合、適当なヌクレオチド挿入または欠失で最適に整理化されると、少なくとも約50%のヌクレオチドで同一であり、一般に、少なくとも約58%、通常、少なくとも約65%、たびたび、少なくとも約71%、代表的に、少なくとも約77%、通常、少なくとも約85%、好ましくは、少なくとも約95~98%またはそれ以上、そして特定の実施態様では約99%と同等またはそれ以上のヌクレオチドで同一であることが意味される。あるいは、実質的な相同性は、代表的には、IL-B30の配列（例えば、配列番号1）を使用して、このセグメントが選ばれたハイブリダイゼーシ

50

ョン条件下で、ある鎖、またはその補体に対してハイブリダイズしたときに存在する。代表的に、選抜ハイブリダイゼーションは、少なくとも約30ヌクレオチドの範囲にわたって少なくとも約55%、好ましくは、約25ヌクレオチドの範囲にわたって少なくとも約75%、そして、最も好ましくは、約20ヌクレオチドにわたって少なくとも約90%で存在する場合に生じる。Kanehisa (1984) Nuc. Acids Res. 12: 203-213を参照のこと。同一性比較の長さは、記載されているように、より長い範囲にわたり得る。そして、特定の実施態様では、少なくとも約17ヌクレオチド、通常は、少なくとも約28ヌクレオチド、代表的に、少なくとも約40ヌクレオチド、そして好ましくは、少なくとも約75~100またはそれ以上のヌクレオチドの範囲にわたり得る。

10

【0085】

このハイブリダイゼーションの文脈での相同性に関して、ストリンジェントな条件は、塩、温度、有機溶媒および他のパラメーターのストリンジェントに組み合わせられた条件であり、代表的には、それらはハイブリダイゼーション反応を制御する。ストリンジェントな温度条件は普通、約30以上の温度を含み、通常、約37以上、代表的に、約55以上、好ましくは、約70以上の温度を含む。厳密な塩条件は、通常、約1000mMより低く、普通、約400mMより低く、代表的に、約250mMより低く、好ましくは約150mMより低い(約100、50、または20mMでさえも含む)。しかし、このパラメーターの組み合わせは、任意の単一パラメーターの測定よりはるかに重要である。例えば、Wetmur and Davidson (1968) J. Mol. Biol. 31: 349-370を参照のこと。ストリンジェントな条件下のハイブリダイゼーションは、少なくともバックグラウンドの2倍を超えるようなバックグラウンドを与え、好ましくは少なくとも3~5倍またはそれ以上であるバックグラウンドを与える。

20

【0086】

配列比較のために、代表的には、1つの配列が参照配列として作用し、それに対して試験配列が比較される。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験配列および参照配列がコンピューターに入力され、必要な場合には、サブ配列座標が指定され、そして、配列アルゴリズムプログラムパラメーターが指定される。次いで、配列比較アルゴリズムは、その指定されたプログラムパラメーターに基づいて、試験配列について、参照配列に対する配列同一性パーセントを計算する。

30

【0087】

比較のための配列の視覚的なアライメントは、例えば、SmithおよびWaterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482の局所相同性アルゴリズムによってか、NeedlemanおよびWunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443の相同性アラインメントアルゴリズムによって、PearsonおよびLipman (1988) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85: 2444の類似性検索法によってか、これらのアルゴリズムのコンピューター化された実行(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WIのGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA)によってか、または、視覚的検査(一般的には、Ausubelら、前出を参照のこと)によって、行われ得る。

40

【0088】

有用なアルゴリズムの1つの例は、PILEUPである。PILEUPは、漸進的な、ペアをつくるアラインメントを用いて、関連する配列の群から複数の配列アラインメントを作成し、関連性および配列同一性パーセントを示す。それはまた、アラインメントを作成するために使用されるクラスター化の関連性を示す系図または系統図をプロットする。PILEUPは、FengおよびDoolittle (1987) J. Mol. Evol. 35: 351-360の漸進的アラインメント法の単純化したものを使用する。使用される方法は、HigginsおよびSharp (1989) CABIOS 5: 151-

50

1 5 3 によって記載される方法に類似する。そのプログラムは、3 0 0 までの配列をアラインし得、それぞれの最大長は5 0 0 0ヌクレオチドまたは5 0 0 0アミノ酸である。複数のアラインメント手順は、2つの最も類似の配列のペアをつくるアラインメントで開始し、2つのアラインされた配列のクラスターを生成する。次いで、このクラスターは、次に最も関連する配列またはアラインされた配列のクラスターにアラインされる。配列の2つのクラスターは、2つの個々の配列のペアをつくるアラインメントの単純な拡張によってアラインされる。最終的なアラインメントは、一連の漸進的な、ペアをつくるアラインメントによって達成される。プログラムは、配列比較の領域に、特定の配列、およびそれらのアミノ酸またはヌクレオチド座標を指定すること、ならびにプログラムパラメーターを指定することによって実行される。例えば、参照配列は、他の試験配列と比較され得、以下のパラメーター：デフォルトギャップ重み(3 . 0 0)、デフォルトギャップ長重み(0 . 1 0)、および重みを付けた末端ギャップを用いて配列同一性関係のパーセントを決定する。

【0 0 8 9】

配列同一性パーセントおよび配列類似性パーセントを決定するのに適切な別のアルゴリズムの例は、A l t s c h u l ら、(1 9 9 0) J . M o l . B i o l . 2 1 5 : 4 0 3 - 4 1 0 に記載されるB L A S Tアルゴリズムである。B L A S T分析を実行するためのソフトウェアは、国立バイオテクノロジー情報センター([http:WWW.ncbi.nlm.nih.gov/](http://WWW.ncbi.nlm.nih.gov/))を通して公的に利用可能である。このアルゴリズムは、問合せ配列中の長さWの短いワード(word)を同定することによって、最初にハイスコア配列ペア(H S P s)を同定することを含み、その短いワードはデータベース配列中の同じ長さのワードとアラインされた場合に、ある正の値の閾値スコアTに一致するか、または満足するかのいずれかである。Tとは、隣接するワードスコア閾値という(A l t s c h u l ら、前出)。これらの最初の隣接するワードの一致は、それらを含むより長いH S Pを見出すための検索の開始のための種(seeds)として作用する。次いで、そのワードの一致は、累積のアラインメントスコアが増加され得る限りは、各々の配列に沿って、両方の方向に伸長される。各々の方向におけるワードの一致の伸長は、以下の場合に停止する：累積のアラインメントスコアがその達成された最大値から量Xだけ低下した場合；1つ以上のネガティブスコアの残基アラインメントの蓄積によって、その累積スコアがゼロ以下になった場合；または、いずれかの配列の末端に到達した場合。B L A S TアルゴリズムパラメーターW、T、およびXは、アラインメントの感度および速度を決定する。B L A S Tプログラムは、ワード長(W)11、B L O S U M 6 2スコア付けマトリックス(H e n i k o f fおよびH e n i k o f f(1 9 8 9) P r o c . N a t ' l A c a d . S c i . U S A 8 9 : 1 0 9 1 5を参照のこと)、アラインメント(B)50、期待値(E)10、M=5、N=4、および両方の鎖の比較を、デフォルトとして使用する。

【0 0 9 0】

配列同一性パーセントを計算するのに加えて、B L A S Tアルゴリズムはまた、2つの配列の間の類似性の統計学的な分析を行う(例えば、K a r l i nおよびA l t s c h u l(1 9 9 3) P r o c . N a t ' l A c a d . S c i . U S A 9 0 : 5 8 7 3 - 5 7 8 7を参照のこと)。B L A S Tアルゴリズムによって提供される類似性の1つの測定は、最小合計確率(P(N))であり、これは、2つのヌクレオチド間またはアミノ酸配列の間の偶然に生ずる一致の確率の表示を提供する。例えば、核酸は、試験核酸の、参照核酸との比較における最小合計確率が、約0 . 1未満、より好ましくは約0 . 0 1未満、そして最も好ましくは約0 . 0 0 1未満である場合に、参照配列に類似であるとみなされる。

【0 0 9 1】

ポリペプチドの2つの核酸配列が実質的に同一であるということのさらなる指標は、第1の核酸によってコードされるポリペプチドが、以下に示すように、第2の核酸によってコードされるポリペプチドと免疫学的に交差反応性であることである。従って、ポリペプ

10

20

30

40

50

チドは、代表的には、例えば、2つのポリペプチドが保存的置換によってのみ異なる場合に、第2のポリペプチドに実質的に同一である。2つの核酸配列が実質的に同一であることの別の指標は、その2つの分子が、以下に記載するように、ストリンジェントな条件下で互いにハイブリダイズすることである。

【0092】

他の哺乳動物種由来のIL-B30は、密接に関連する種の種間(cross-species)ハイブリダイゼーションによってクローニングされ、そして単離され得る。相同性は、関連性が遠い種間では相対的に低くなり得、従って、相対的に密接に関連する種のハイブリダイゼーションが、望ましい。あるいは、種特異性がより低い抗体調製物の調製は、発現クローニングアプローチにおいて有用であり得る。

10

【0093】

(VII. IL-B30; 模倣物の作製)

IL-B30またはそのフラグメントをコードするDNAは、化学合成、cDNAライブラリーのスクリーニング、または広範な種々の細胞株または組織サンプルから調製されたゲノムライブラリーのスクリーニングによって得られ得る。例えば、OkayamaおよびBerg(1982)Mol. Cell. Biol. 2: 161-170; GublerおよびHoffman(1983)Gene 25: 263-269; およびGlover(編 1984)DNA Cloning: A Practical Approach, IRL Press, Oxfordを参照のこと。あるいは、本明細書中で提供される配列は、有用なPCRプライマーを提供するか、またはIL-B30をコードする適切な遺伝子の合成的調製もしくは他の調製を可能にする(天然に生ずる実施態様を含む)。

20

【0094】

このDNAは、全長IL-B30またはフラグメント(これは次には、例えば、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を生成するために使用され得る)の合成のために; 結合研究のために; 改変分子の構築および発現のために; および、構造機能研究のために、広範な種々の宿主細胞中で発現され得る。

【0095】

本明細書で使用されるベクターは、プラスミド、ウイルス、バクテリオファージ、組込み可能DNAフラグメント、および宿主のゲノムへのDNAフラグメントの組込みを可能にする他のビヒクルを含む。例えば、Pouwelsら、(1985および補遺)Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y.; およびRodriguezら、(1988)(編)Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworth, Boston, MAを参照のこと。

30

【0096】

本発明の目的のために、DNA配列は、それらが互いに機能的に関連する場合に、作動可能に連結される。例えば、プレ配列または分泌リーダーのDNAは、プレタンパク質として発現される場合、またはポリペプチドを細胞膜へ方向付けることもしくはポリペプチドの分泌に関与する場合に、ポリペプチドに作動可能に連結される。プロモーターは、ポリペプチドの転写を制御する場合に、コード配列に作動可能に連結される; リボソーム結合部位は、翻訳を可能にするように配置される場合に、コード配列に作動可能に連結される。通常は、作動可能な連結は、連続的で、そしてリーディングフレームにあることを意味するが、リプレッサー遺伝子のような特定の遺伝子エレメントは、連続して連結されていないが、なおオペレーター配列に結合して、これは次には発現を制御する。例えば、Rodriguezら、第10章、205-236頁; BalbasおよびBolivar(1990)Methods in Enzymology 185: 14-37; およびAusubelら、(1993)Current Protocols in Molecular Biology, Greene and Wiley, NYを参照のこと。

40

。

50

【0097】

適切な発現ベクターの代表的な例は、pCDNA1；pCD（Okayamaら、（1985）Mol．Cell．Biol．5：1136-1142を参照のこと）；pMC1neo Poly-A（Thomasら、（1987）Cell 51：503-512を参照のこと）；およびpAC373またはpAC610のようなバキュロウイルスベクター（例えば、Miller（1988）Ann．Rev．Microbiol．42：177-199を参照のこと）を含む。

【0098】

特定のまたは規定されたグリコシル化パターンを提供する系で、IL-B30ポリペプチドを発現させることがしばしば所望される。例えば、LuckowおよびSummers（1988）Bio/Technology 6：47-55；ならびにKaufman（1990）Meth．Enzymol．185：487-511を参照のこと。

10

【0099】

IL-B30またはそのフラグメントは、細胞膜に、ホスファチジルイノシトール（PI）結合されるように操作され得るが、ホスファチジルイノシトール切断酵素（例えば、ホスファチジルイノシトールホスホリパーゼC）を用いる処理によって膜から除去される。これにより抗原が生物学的に活性な形態で放出され、そしてタンパク質化学の標準的な手順による精製が可能になる。例えば、Lowら、（1989）Biochim．Biophys．Acta 988：427-454；Tseら、（1985）Science 230：1003-1008；およびBrunnerら、（1991）J．Cell Biol．114：1275-1283を参照のこと。

20

【0100】

IL-B30が特徴付けされたので、そのフラグメントまたは誘導体が、ペプチドを合成するための従来のプロセスによって調製され得る。これらには、StewartおよびYoung（1984）Solid Phase Peptide Synthesis，Pierce Chemical Co．，Rockford，IL；BodanszkyおよびBodanszky（1984）The Practice of Peptide Synthesis，Springer-Verlag，New York；Bodanszky（1984）The Principles of Peptide Synthesis，Springer-Verlag，New York；およびVillafranca（編 1991）Techniques in Protein Chemistry II，Academic Press，San Diego，Caにおいて記載されるようなプロセスが含まれる。

30

【0101】

（VII．使用）

本発明は、本明細書中の別の箇所で記載される診断的適用において（例えば、IL-B30媒介状態において）、または以下の診断のためのキットの記載において、使用を見出す試薬を提供する。その遺伝子は、法医学において、例えば、げっ歯類をヒトから区別するために、または、ディファレンシャルな発現もしくは修飾パターンを示す異なる細胞間を区別するためのマーカーとして、有用である。

40

【0102】

本発明はまた、顕著な商業的および／または治療的可能性を有する試薬を提供する。IL-B30（天然に生じたものまたは組換え体）、そのフラグメント、およびそれに対する抗体ならびにIL-B30に対する結合アフィニティーを有するとして同定された化合物は、分子生物学、免疫学、または生理学の教育技術のための試薬として有用であるはずである。適切なキットは、例えば、タンパク質、抗体、クローニング方法、組織学などの産生または使用における実践的な実験室での演習において、その試薬を用いて調製され得る。

【0103】

その試薬はまた、異常な生理または発生に関連する状態（炎症状態を含む）の処置にお

50

いて有用である。それらは、相互作用する成分の存在または非存在についてのインビトロ試験において有用であり得、これは、特定の処置ストラテジーの成功と相関し得る。特に、種々の細胞（例えば、造血細胞またはリンパ球）の生理の調整は、本明細書中で提供される組成物を用いる処置のための適切な方法によって達成される。例えば、Thomson (1994; 編) The Cytokine Handbook (第2版) Academic Press, San Diego; Metcalf および Nicola (1995) The Hematopoietic Colony Stimulating Factors Cambridge University Press; ならびに、Aggarwal および Gutterman (1991) Human Cytokines Blackwell Pub. を参照のこと。

10

【0104】

例えば、IL - B30 による異常な発現または異常なシグナリングに関連する疾患または障害は、アゴニストまたはアンタゴニストの適当な標的であるようである。新規なサイトカインは、造血細胞、例えば、リンパ球（例えば、炎症および/または自己免疫障害のような、免疫学的応答に影響を与える）の調節または発生において役割を演じるはずである。あるいは、それは血管の生理または発生、あるいは神経細胞の効果に影響を与え得る。

【0105】

特に、サイトカインは、種々の状況において、細胞によるサイトカイン合成、増殖などを媒介するはずである。IL - B30 のアンタゴニスト（例えば、IL - B30 の天然に生ずる形態のムテイン変異体、またはブロック抗体）は、例えば、炎症または自己免疫応答のような状況において、免疫応答をブロックするための選択的かつ強力な方法を提供し得る。Samter ら、(編) Immunological Diseases 第1巻および第2巻、Little, Brown and Co. もまた参照のこと。

20

【0106】

さらに、特定の（例えば、炎症の他の修飾因子との）組合せ組成物が有用である。このような他の分子は、ステロイド、IL - 6 および/または G - CSF の他のバージョン（種変異体またはウイルスホモログを含む）、ならびにそれらのそれぞれのアンタゴニストを含み得る。

【0107】

ノーザンブロット分析によって IL - B30 mRNA を産生することが示されている細胞型のそれぞれにおいて、種々の異常な状態が知られている。Berkow (編) The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Merck & Co., Rahway, N.J.; Thorn ら、Harrison's Principles of Internal Medicine, McGraw-Hill, N.Y.; および Weatherall ら、(編) Oxford Textbook of Medicine, Oxford University Press, Oxford を参照のこと。多くの他の医学的状態および疾患は、マクロファージまたは単球による活性化を含み、そしてこれらの多くは、本明細書中に提供されるアゴニストまたはアンタゴニストによる処置に対して応答性である。例えば、Stites および Terr (編; 1991) Basic and Clinical Immunology Appleton and Lange, Norwalk, Connecticut; および Samter ら、(編) Immunological Diseases Little, Brown and Co. を参照のこと。これらの問題は、本明細書中に提供される組成物を使用する予防または処置に感受性であるはずである。膵島局在化は、糖尿病に対する関連性の可能性を示唆する。

30

40

【0108】

IL - B30、アンタゴニスト、抗体などは、精製され得、次いで患者（獣医学的な、またはヒトの患者）に投与され得る。これらの試薬は、治療的使用のために、従来の薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤（例えば、免疫原性アジュバント）中で、さらなる

50

活性または不活性成分、ならびに例えば、生理学的に無害な安定化剤、賦形剤、または保存剤と組合せられ得る。これらの組合せは、滅菌ろ過され得、そして用量バイアル中での凍結乾燥により用量形態にされるか、または安定化された水性調製物中で保存され得る。本発明はまた、補体結合でない形態を含む、抗体またはその結合フラグメントの使用を意図する。

【0109】

IL-B30またはそのフラグメントを用いる薬物スクリーニングは、IL-B30に対する結合アフィニティーを有するか、またはIL-B30機能に対する他の関連する生物学的効果（関連する成分の単離を含む）を有する化合物の同定のために行われ得る。次いで、引き続く生物学的アッセイは、その化合物が内因性の刺激活性を有し、そして、それゆえに、サイトカインの活性をブロックするという意味において、それがブロッカーまたはアンタゴニストであるかを決定するために使用され得る。同様に、内因性刺激活性を有する化合物は、シグナル経路を活性化し得、従ってそれがIL-B30の活性を刺激するという意味において、アゴニストである。本発明はさらに、アンタゴニストとしてIL-B30に対するブロッキング抗体の治療的使用、およびアゴニストとしての刺激抗体の治療的使用を意図する。このアプローチは、他のIL-B30種変異体を用いて、特に有用であるはずである。

【0110】

効果的な治療に必要な試薬の量は、投与の手段、標的部位、患者の生理学的状態、および投与される他の医薬を含む、多くの異なる因子に依存する。従って、処置用量は、安全性および有効性を最適化するように滴定すべきである。代表的には、インビトロで使用される用量は、これらの試薬のインサイチュ投与のための有効量に関する有用な手引き（guidance）を提供し得る。特定の障害の処置のための有効量の動物試験は、ヒト用量のさらなる予測的指標を提供する。種々の考慮が、例えば、Gilmanら（編 1990）GoodmanおよびGilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 第8版, Pergamon Press; およびRemington's Pharmaceutical Science, 第17版（1990）, Mack Publishing Co., Easton, Pennに記載される。投与のための方法は、その中で議論され、および以下の、例えば経口投与、静脈内投与、腹腔内投与、または筋肉内投与、経皮拡散、およびその他について議論される。薬学的に受容可能なキャリアには、例えば、Merck Index, Merck & Co., Rahway, New Jerseyに記載されるような、水、生理食塩水、緩衝液および他の化合物が含まれる。用量範囲は、適切なキャリアと共に、通常、1 mMの濃度より低い量、代表的には約10 μ M濃度未満、通常約100 nM未満、好ましくは約10 pM（ピコモル）未満、そして最も好ましくは約1 fM（フェムトモル）未満になることが期待される。徐放処方物、または徐放装置が、連続投与または長期投与のためにしばしば利用される。例えば、Langer（1990）Science 249: 1527-1533を参照のこと。

【0111】

IL-B30、そのフラグメント、およびそれに対する抗体またはそのフラグメント、アンタゴニストおよびアゴニストは、処置されるべき宿主に直接投与され得るか、または化合物の大きさに依存して、投与前に、卵白アルブミンまたは血清アルブミンのようなキャリアタンパク質へ、これらを結合させることが所望され得る。治療処方物は、多くの従来の用量処方物として投与され得る。活性成分が単独で投与されることが可能である場合、これを薬学的処方物として提示することが好ましい。代表的には、処方物は、上記で定義されるような、それらの1つ以上の受容可能なキャリアと共に、少なくとも1つの活性成分を含む。各キャリアは、他の成分と適合性であり、患者に対して無害であるという意味で、薬学的および生理学的の両方で受容可能であるべきである。処方物には、経口投与、直腸投与、経鼻投与、局所投与、または非経口投与（皮下、筋肉内、静脈内、皮内を含む）に適切なものが含まれる。この処方物は、単位用量形態で都合よく提供され得、そして

薬学の分野で周知の任意の方法によって調製され得る。例えば、Gilmanら(編 1990) GoodmanおよびGilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 第8版、Pergamon Press; およびRemington's Pharmaceutical Sciences, 第17版(1990)、Mack Publishing Co., Easton, Penn.; Avisら(編 1993) Pharmaceutical Dosage Form: Parenteral Medications, Dekker, New York; Liebermanら、(編 1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Dekker, New York; およびLiebermanら(編 1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Dekker, New Yorkを参照のこと。本発明の治療は、他の薬剤(例えば、IL-6もしくはG-CSF, またはこれらの対応するアンタゴニストを含む、他のサイトカイン)と組み合わせ、または関連して使用され得る。

【0112】

天然に生じる形態および組換え形態の、本発明のIL-B30は、そのタンパク質に対する結合活性について化合物をスクリーニングし得るキットおよびアッセイ方法において、特に有用である。自動化アッセイのいくつかの方法が、近年において開発され、短時間での何万もの化合物のスクリーニングを可能にした。例えば、Fodorら、(1991) Science 251: 767-773 (これは、固体基板上で合成される複数の規定されたポリマーによって結合アフィニティーを試験するための手段を記載する)を参照のこと。適切なアッセイの開発は、本発明によって提供されるような、大量の精製された可溶性IL-B30の利用可能性によって非常に促進され得る。

【0113】

他の方法は、IL-B30-IL-B30レセプター相互作用において重要な残基を決定するために使用され得る。相互作用および/またはシグナリングにおいて重要な特定の残基を決定するために、変異分析が行われ得る(例えば、Somozaら、(1993) J. Exp. Med. 178: 549-558)。PHD(RostおよびSander(1994) Proteins 19: 55-72)およびDSC(KingおよびSternberg(1996) Protein Sci. 5: 2298-2310)は、 α -ヘリックス(H)、 β -鎖(E)またはコイル(L)の二次構造予測を提供し得る。ヘリックスAおよびDは、レセプター相互作用において最も重要であり、Dヘリックスは、より重要な領域である。ヘリックスAは、ヒトにおいておよそpro(7)からhis(27)までにわたり、一方ヘリックスDは、およそtrp(135)からgly(162)までにわたる。表面に露出した残基は、レセプター結合に影響するが、一方埋め込まれた残基は一般的な構造に影響する。特定の重要性がある予測残基は、arg(146)、ser(147)、gln(149)、ala(150)、ala(153)、val(154)、ala(156)、arg(157)、ala(160)、およびhis(161)に対応するようである。

【0114】

例えば、アンタゴニストは、一旦抗原が、例えば三次元構造データによって構造的に定義されると、通常見出され得る。潜在的な相互作用アナログの試験は、精製されたIL-B30を使用する高度に自動化されたアッセイ方法の開発により、現在可能である。特に、新規なアゴニストおよびアンタゴニストは、本発明中に記載されるスクリーニング技術を使用することによって発見される。特に重要性のあるものは、IL-B30分子のスペクトルについて、組合せた結合アフィニティーを有することが見出された化合物、例えば、IL-B30の種改変体についてのアンタゴニストとして働き得る化合物である。

【0115】

薬物スクリーニングの1つの方法は、IL-B30を発現する組換えDNA分子を用いて安定に形質転換した、真核生物または原核生物宿主細胞を利用する。IL-B30を発

10

20

30

40

50

現する細胞は、他の分子からの単離において、単離され得る。このような細胞は、生存可能な形態または固定された形態のいずれかで、標準結合パートナー結合アッセイのために使用され得る。Parceら、(1989) Science 246:243-247; およびOwickiら、(1990) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87:4007-4011 (これらは、細胞応答を検出するための感度のよい方法を記載する)もまた参照のこと。

【0116】

薬物スクリーニングのための別の方法は、IL-B30に対する適切な結合親和性を有する化合物のためのハイスループットスクリーニングを提供するアプローチを含み、そしてGeyesen(1984年9月13日に公開された、欧州特許出願第84/03564号)において詳細に記載される。最初に、多数の異なる小さなペプチド試験化合物は、固体基板(例えば、プラスチックピンまたはいくつかの他の適切な表面)上で合成される(Fodorら、(1991)を参照のこと)。次いで全てのピンは、可溶化された未精製のIL-B30または可溶化された精製されたIL-B30と反応して、そして洗浄される。次の工程は、結合したIL-B30の検出を含む。

【0117】

合理的な薬物設計はまた、IL-B30および他のエフェクターまたはアナログの分子形状の構造的な研究に基づき得る。エフェクターは、結合に反応して他の機能を媒介する他のタンパク質であり得るか、あるいはIL-B30と通常は反応する他のタンパク質(例えば、レセプター)であり得る。特異的な他のタンパク質と相互作用する部位を決定するための1つの手段は、物理的構造決定(例えば、X線結晶学または2次元NMR技術)である。これらは、例えば、他のサイトカイン-レセプターモデルに対してモデル化される場合、どのアミノ酸残基が分子接触領域を形成するかに関して、ガイダンスを提供する。タンパク質の構造決定の詳細な説明については、例えば、BlundellおよびJohnson(1976) Protein Crystallography, Academic Press, New Yorkを参照のこと。

【0118】

(IX. キット)

本発明はまた、別のIL-B30または結合パートナーの存在を検出するための種々の診断キットおよび方法における、IL-B30タンパク質、それらのフラグメント、ペプチド、およびそれらの融合産物の使用を意図する。代表的には、このキットは、規定されたIL-B30ペプチドまたは遺伝子セグメント、あるいは、一方または他方(例えば、IL-B30フラグメントまたは抗体)を認識する試薬のいずれかを含む区画を有する。

【0119】

IL-B30に対する試験化合物の結合能力を決定するためのキットは、代表的には、試験化合物; 標識化合物(例えば、IL-B30について既知の結合親和性を有する結合パートナーまたは抗体); IL-B30の供給源(天然に存在するかあるいは組換えの); および遊離した標識化合物から結合した標識化合物を分離するための手段(例えば、分子を固定するための固相)、を含む。一旦化合物がスクリーニングされると、これらが、IL-B30シグナル伝達経路に対するアゴニストまたはアンタゴニストとして作用するかを決定するために、抗原に対して適切な結合親和性を有する化合物を、当該分野で周知であるような適切な生物学的アッセイにおいて評価し得る。組換えIL-B30ポリペプチドの利用可能性はまた、このようなアッセイを校正するために十分に規定された標準を提供する。

【0120】

例えば、サンプル中のIL-B30の濃度を決定するための好ましいキットは、代表的には、標識化合物(例えば、抗原について既知の結合親和性を有する結合パートナーまたは抗体)、サイトカインの供給源(天然に存在するかまたは組換えの)および遊離した標識化合物から結合した標識化合物を分離するための手段(例えば、IL-B30を固定化するための固相)を含む。試薬および取扱い説明書を含む区画は、通常は提供され

る。

【0121】

IL-B30またはフラグメントに特異的な抗原結合フラグメントを含む抗体は、上昇したレベルのIL-B30および/またはそのフラグメントの存在を検出するための診断適用に有用である。このような診断アッセイは、溶解物、生存細胞、固定化細胞、免疫蛍光法、細胞培養、体液を使用し得、そして血清などにおける抗原に関連する抗原の検出を含み得る。診断アッセイは、均質（遊離した試薬と抗原結合パートナー複合体との間の分離工程なしで）であるか、または不均一（分離工程を用いる）であり得る。種々の市販のアッセイキットには、例えば、放射免疫測定（RIA）、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）、酵素免疫法（EIA）、酵素増幅免疫アッセイ技術（EMIT）、基質標識免疫蛍光アッセイ（SLFIA）などがある。例えば、Van Vunakisら（1980）Meth Enzymol. 70:1-525; HarlowおよびLane（1980）Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press, NY; およびColiganら（編 1993）Current Protocols in Immunology、GreeneおよびWiley, NYを参照のこと。

10

【0122】

抗イデオタイプ抗体は、IL-B30に対する抗体の存在を診断するための類似の使用を有し得、それ自体、種々の異常状態を診断し得る。例えば、IL-B30の過剰産生は、種々の免疫学的反応を生じ得る。この過剰産生は、特に、ガンまたは異常な活性化または分化のような増殖性細胞の状態において、異常な生理学的状態を診断し得る。さらに、利用可能な分布パターンは、サイトカインが脾臓のランゲルハンス島において発現するという情報を提供し、このことは、サイトカインが、器官の機能（例えば、糖尿病に関する医学的状态において）に関与し得るということを示唆する。

20

【0123】

診断アッセイのための試薬は、アッセイの感度の最適化に関して、キットにおいて頻繁に、供給される。本発明のために、アッセイ、プロトコルおよび標識の性質に依存して、標識されたかまたは標識されていない、抗体または結合パートナー、あるいは標識されたIL-B30のいずれかが提供される。これは通常、緩衝液、安定化剤、シグナル産生に必要な材料（例えば、酵素にとっての基質）などのような他の付加物との組み合わせにおいて存在する。好ましくは、キットはまた、適切な使用および使用後の内容物の処分のための取扱い説明書を含む。代表的には、このキットには、各々の有用な試薬のための区画が含まれる。望ましくは、この試薬は、凍結乾燥した乾燥粉末として提供され、そしてこの試薬は、アッセイを実施するために適切な濃度の試薬を提供する水性培地において再構築され得る。

30

【0124】

薬物スクリーニングおよび診断アッセイの、前述した多くの成分は、修飾なく使用され得るか、または種々の方法で修飾され得る。例えば、標識は、検出可能なシグナルを直接的または間接的に提供する、共有結合または非共有結合部分によって達成され得る。これらのアッセイのいずれにおいても、結合パートナー、試験化合物、IL-B30またはそれらに対する抗体は、直接的または間接的のいずれかで標識され得る。直接的な標識についての可能性としては、標識群：¹²⁵Iのような放射標識、ペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼのような酵素（米国特許第3,645,090号）、および蛍光強度の変化をモニターし得る蛍光標識（米国特許第3,940,475号）、波長変化、または蛍光偏向が挙げられる。間接的な標識についての可能性としては、1つの成分のビオチン化に続いて上記の標識群の1つへ結合させたアビジンとの結合が挙げられる。

40

【0125】

遊離したIL-B30から結合したIL-B30を分離するか、あるいは遊離した試験化合物から結合した試験化合物を分離するための種々の方法がまた存在する。IL-B30は、種々のマトリクス上に固定され、続いて洗浄され得る。適切なマトリクスには、E

50

LISAプレート、フィルター、およびビーズのようなプラスチックが含まれる。例えば、Coliganら(編1993)Current Protocols in Immunology, 第1巻、第2章、GreeneおよびWiley, NYを参照のこと。他の適切な分離技術には、Rattleら(1984)Clin. Chem. 30:1457-1461に記載されるフルオレセイン抗体磁化粒子方法、および米国特許第4,659,678号に記載されるような二重抗体磁化粒子分離が、限定されることなく含まれる。

【0126】

種々の標識物に対するタンパク質またはそれらのフラグメントを連結するための方法は、文献において広範に報告されているので、本明細書中では詳細な議論を必要としない。多くの技術は、ペプチド結合を形成させるためのカルボジイミドまたは活性化エステルの使用、あるいは連結のための、クロロアセチルのような活性化ハロゲンまたはマレイミドのような活性化オレフィンと、メルカプト基の反応によるチオエーテルの形成などのいずれかによる、活性化されたカルボキシル基の使用を含む。融合タンパク質はまた、これらの適用における使用を見出す。

10

【0127】

本発明の別の診断上の局面は、IL-B30の配列から得られたオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列の使用を含む。これらの配列は、異常な状態(例えば、炎症性または自己免疫性)を有することが疑われる患者からのサンプルにおけるIL-B30メッセージのレベルを検出するためのプローブとして使用され得る。サイトカインは、活性化のためのマーカーまたはメディエーターであり得るので、サイトカインは、例えば、効果が進行して顕著になる前に予防的様式において、例えば、さらなる治療が要求される時点を決断するために、活性化細胞の数を決定するために有用であり得る。RNAおよびDNAヌクレオチド配列の両方の調製、配列の標識、および配列の好ましい大きさの調製は、文献において十分に説明および議論されている。例えば、Langer-Saferら(1982)Proc. Nat'l. Acad. Sci. 79:4381-4385; Caskey(1987)Science 236:962-967; およびWilchekら(1988)Anal. Biochem. 171:1-32を参照のこと。

20

【0128】

他の分子の定性的発現または定量的発現について試験する診断キットがまた、意図される。診断または予後は、マーカーとして使用される複数の徴候の組合わせに依存し得る。従って、キットはマーカーの組合わせについて試験し得る。例えば、Vialletら(1989)Progress in Growth Factor Res. 1:89-97を参照のこと。他のキットが他の細胞部分集団を評価するために使用され得る。

30

【0129】

(X. IL-B30レセプターの単離)

特異的リガンド-レセプター相互作用のリガンドを単離することによって、レセプターを単離するための方法がある。Gearingら(1989)EMBO J. 8:3667-3676を参照のこと。例えば、IL-B30サイトカインのレセプターへの結合を妨げることなく、IL-B30サイトカインを標識するための手段は、決定され得る。例えば、親和性標識は、リガンドのアミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかと融合され得る。このような標識は、FLAGエピトプタグまたは、例えばIgドメインまたはFcドメインであり得る。発現ライブラリーは、サイトカインの特異的結合について、例えば、細胞選別、または亜集団(このような結合成分を発現する)を検出するための他のスクリーニングによって、スクリーニングされ得る。例えば、Hoら(1993)Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:11267-11271; およびLiuら(1994)J. Immunol. 152:1821-29を参照のこと。あるいは、パンニング方法が使用され得る。例えば、SeedおよびAruffo(1987)Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 84:3365-3369を参照のこと。

40

50

【 0 1 3 0 】

標識とのタンパク質架橋技術は、IL - B 3 0 サイトカインの結合パートナーを単離するために適用され得る。これは、例えば、リガンド - レセプター様様式で、サイトカインと特異的に相互作用するタンパク質の同定を可能にする。

【 0 1 3 1 】

初期の実験は、既知のIL - 6またはG - C S Fレセプター成分がIL - B 3 0に対する応答に関与するかどうかを決定するために実施される。これらの機能性レセプター複合体が、IL - B 3 0レセプター複合体（特異的レセプターサブユニットまたはアクセサリレセプターサブユニットのいずれか）と、多くのまたは全ての成分を共有し得ることもまた、十分可能である。

10

【 0 1 3 2 】

本発明の多くの改変および変更は、当業者に明らかであるように、その精神および範囲から逸脱することなくなされ得る。本明細書中に記載される特定の実施態様は、例示の目的のためにのみ提供されるが、本発明は、これらの請求項が与えられる等価物の権利の全範囲とともに、添付の請求項の文言によってのみ限定される。

【 実施例 】

【 0 1 3 3 】

（ I . 一般的な方法 ）

以下の多くの標準的方法が、例えば、Maniatisら（1982）Molecular Cloning, A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Sambrookら（1989）Molecular Cloning, A Laboratory Manual（第2版）第1巻～第3巻, CSH Press. NY; Ausubelら, Biology Greene Publishing Associates, Brooklyn, NY; またはAusubelら（1987および補遺）Current Protocols in Molecular Biology Wiley/Greene, NY; Innisら（編 1990）PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications Academic Press, NYにおいて記載されるか、または参照される。タンパク質精製のための方法には、硫酸アンモニウム沈澱、カラムクロマトグラフィー、電気泳動、遠心分離、結晶化および他の方法が含まれる。例えば、Ausubelら（1987および定期的な補遺）; Deutscher（1990）「Guide to Protein Purification」, Methods in Enzymology 第182巻およびこのシリーズの他の巻; Coliganら（1995および補遺）Current Protocols in Protein Science John WileyおよびSons, New York, NY; P. Matsudaira（編 1993）A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing, Academic Press, San Diego, CA; およびタンパク質精製産物の使用についての製造者の文献、例えば、Pharmacia, Piscataway, NJ, またはBio-Rad, Richmond, CAを参照のこと。組換え技術との組み合わせは、適切なセグメント（エピトープタグ）への融合（例えば、（例えば、プロテアーゼで除去可能である配列を介して）融合され得るFLAG配列または等価物）を可能にする。例えば、Hochuli（1989）Chemische Industrie 12: 69 - 70; Hochuli（1990）「Purification of Recombinant Proteins with Metal Chelate Absorbent」Setlow（編）Genetic Engineering, Principle and Methods 12: 87 - 98, Plenum Press, NY. およびCroweら（1992）OIA express: The High Level Expression & Pr

20

30

40

50

rotein Purification System QUIAGEN, Inc. Chatsworth, CAを参照のこと。

【0134】

標準の免疫学的技術は、例えば、Hertzenbergら(編 1996) Weir's Handbook of Experimental Immunology 第1巻～第4巻, Blackwell Science; Coligan(1991) Current Protocols in Immunology Wiley/Greene, NY; および Methods in Enzymology 第70巻、第73巻、第74巻、第84巻、第92巻、第93巻、第108巻、第116巻、第121巻、第132巻、第150巻、第162巻および第163巻に記載される。サイトカインアッセイは、例えば、Thomson(編 1994) The Cytokine Handbook(第2版) Academic Press, San Diego; MetcalfおよびNicola(1995) The Hematopoietic Colony Stimulating Factors Cambridge University Press; ならびに Aggarwal および Gutterman(1991) Human Cytokines Blackwell Pubに記載される。

10

【0135】

血管性生物学的活性のためのアッセイは、当該分野で周知である。これらは、腫瘍または他の組織(例えば、動脈平滑筋増殖)(例えば、Koyamaら(1996) Cell 87: 1069 - 1078)を参照のこと)、血管上皮への単球の接着(McEvoyら(1997) J. Exp. Med. 185: 2069 - 2077を参照のこと)などにおける血管形成および血管拡張(angiostatic)活性を含む。Ross(1993) Nature 362: 801 - 809; RekhterおよびGordon(1995) Am. J. Pathol. 147: 668 - 677; Thybergら(1990) Atherosclerosis 10: 966 - 990; および Gumbiner(1996) Cell 84: 345 - 357もまた参照のこと。

20

【0136】

神経細胞の生物学的活性のためのアッセイは、例えば、Wouterlood(編 1995) Neuroscience Protocols modules 10, Elsevier; Methods in Neurosciences Academic Press; および Neuromethods Humana Press, Totowa, NJに記載される。発生システムの方法論は、例えば、Meisami(編) Handbook of Human Growth and Developmental Biology CRC Press; および Chrispeels(編) Molecular Techniques and Approaches in Developmental Biology Interscienceに記載される。

30

【0137】

FACS分析は、Melamedら(1990) Flow Cytometry and Sorting Wiley-Liss, Inc, New York, NY; Shapiro(1988) Practical Flow Cytometry Liss, New York, NY; および Robinsonら(1993) Handbook of Flow Cytometry Methods Wiley-Liss, New York, NYに記載される。

40

【0138】

(II. ヒトIL-B30のクローニング)

遺伝子配列を、表1に提供する。この配列は、メラノサイト、仔ウシ心臓、および妊娠中の子宮から作製された、cDNAライブラリーに由来する。また、脾臓のランゲルハンス島由来のcDNAライブラリー配列から見出される。これらの配列は、PCRプライマーまたはプローブの調製して、遺伝子の細胞分布を決定を可能にする。この配列はメッセージをコードするゲノムDNAの単離を可能にする。

50

【 0 1 3 9 】

プローブまたはPCRプライマーを使用して、種々の組織または細胞型がプローブされ、細胞分布を決定する。PCR産物は、例えばTAクローニングキット (Invitrogen) を使用してクローニングされる。生じるcDNAプラスミドは、自動化シーケンサー (Applied Biosystems) で、両末端から配列決定される。

【 0 1 4 0 】

(III. IL - B 3 0の細胞発現)

霊長類IL - B 3 0をコードするcDNAについて特異的な、適切なプローブまたはプライマーが調製される。代表的には、このプローブは、例えば、ランダムプライミングによって標識される。この発現は、多分、記載される細胞型において存在し、そして多分、脾臓のランゲルハンス島において存在する。サザン分析：一次増幅されたcDNAライブラリーからのDNA (5 µg) が、適切な制限酵素で消化され、インサートを放出し、1%アガロースゲルで泳動され、そしてナイロン膜 (Schleicher and Schuell、Keene、NH) へトランスファーされる。

【 0 1 4 1 】

ヒトmRNA単離のためのサンプルには、以下が含まれる：末梢血単核細胞 (単球、T細胞、NK細胞、顆粒球細胞、B細胞)、休止状態 (T 1 0 0)；末梢血単核細胞、抗CD 3と共に、2時間、6時間、12時間プールして活性化 (T 1 0 1)；T細胞、TH 0クローンM o t 7 2、休止状態 (T 1 0 2)；T細胞、TH 0クローンM o t 7 2、抗CD 2 8および抗CD 3と共に、3時間、6時間、12時間プールして活性化させた、(T 1 0 3)；T細胞、TH 0クローンM o t 7 2、特異的ペプチドと共に、2時間、7時間、12時間プールしてアネルギー処理 (T 1 0 4)；T細胞、TH 1クローンH Y 0 6、休止状態 (T 1 0 7)；T細胞、TH 1クローンH Y 0 6、抗CD 2 8および抗CD 3と共に、3時間、6時間、12時間プールして活性化 (T 1 0 8)；T細胞、TH 1クローンH Y 0 6、特異的ペプチドと共に、2時間、6時間、12時間プールしてアネルギー処理 (T 1 0 9)；T細胞、TH 2クローンH Y 9 3 5、休止状態 (T 1 1 0)；T細胞、TH 2クローンH Y 9 3 5、抗CD 2 8および抗CD 3と共に、2時間、7時間、12時間プールして活性化 (T 1 1 1)；T細胞腫瘍株ジャーカットおよびH u t 7 8、休止状態 (T 1 1 7)；T細胞クローン、プールしたA D 1 3 0 . 2、T c 7 8 3 . 1 2、T c 7 8 3 . 1 3、T c 7 8 3 . 5 8、T c 7 8 2 . 6 9、休止状態 (T 1 1 8)；T細胞無作為γδT細胞クローン、休止状態 (T 1 1 9)；CD 2 8 - T細胞クローン；脾細胞、休止状態 (B 1 0 0)；脾細胞、抗CD 4 0およびIL - 4で活性化 (B 1 0 1)；B細胞E B V株、プールしたW T 4 9、R S B、J Y、C V I R、7 2 1 . 2 2 1、R M 3、H S Y、休止状態 (B 1 0 2)；B細胞株J Y、P M Aおよびイノマイシンと共に、1時間、6時間プールして活性化 (B 1 0 3)；プールしたNK 2 0クローン、休止状態 (K 1 0 0)；プールしたNK 2 0クローン、P M Aおよびイノマイシンと共に6時間活性化させた、プールしたNK 2 0クローン (K 1 0 1)；NK Lクローン、L G L白血病患者の末梢血由来、IL - 2処理 (K 1 0 6)；造血性前駆体株T F 1、P M Aおよびイノマイシンと共に1時間、6時間プールして活性化させた (C 1 0 0)；U 9 3 7前駆単球株、休止状態 (M 1 0 0)；U 9 3 7前駆単球株、P M Aおよびイノマイシンと共に1時間、6時間プールして活性化 (M 1 0 1)；洗浄された単球、L P S、I F N γ、抗IL - 1 0と共に1時間、2時間、6時間、12時間、24時間プールして活性化 (M 1 0 2)；洗浄された単球、L P S、I F N γ、IL - 1 0と共に、1時間、2時間、6時間、12時間、24時間プールして活性化 (M 1 0 3)；洗浄された単球、L P S、I F N γ、抗IL - 1 0と共に4時間、16時間プールして活性化 (M 1 0 6)；洗浄された単球、L P S、I F N γ、IL - 1 0と共に、4時間、16時間プールして活性化 (M 1 0 7)；洗浄された単球、L P Sで1時間活性化 (M 1 0 8)；洗浄された単球、L P Sで6時間活性化 (M 1 0 9)；D C 7 0 % C D 1 a +、これはC D 3 4 + G M - C S F、T N F αで12日目由来、休止状態 (D 1 0 1)；D C 7 0 % C D 1 a +、これはC D 3 4 + G M - C S F、T N F αで12日目由来、P M Aおよびイオノマイシンで1時間活

10

20

30

40

50

性化 (D 1 0 2) ; D C 7 0 % C D 1 a +、これは C D 3 4 + G M - C S F、T N F α で 1 2 日目由来、P M A およびイオノマイシンで 6 時間活性化 (D 1 0 3) ; D C 9 5 % C D 1 a +、これは C D 3 4 + G M - C S F、T N F α で 1 2 日目に F A C S で分離、P M A およびイオノマイシンと共に 1 時間、6 時間プールして活性化 (D 1 0 4) ; D C 9 5 % C D 1 4 +、前 C D 3 4 + G M - C S F、T N F α で 1 2 日目に F A C S で分離、P M A およびイオノマイシンと共に 1 時間、6 時間プールして活性化 (D 1 0 5) ; D C C D 1 a + C D 8 6 +、これは C D 3 4 + G M - C S F、T N F α で 1 2 日目に F A C S で分離、P M A およびイオノマイシンと共に 1 時間、6 時間プールして活性化 (D 1 0 6) ; 単球 G M - C S F、I L - 4 5 日目由来の D C、休止状態 (D 1 0 7) ; 単球 G M - C S F、I L - 4 5 日目由来の D C、休止状態 (D 1 0 8) ; 単球 G M - C S F、I L - 4 5 日目由来の D C、L P S で 4 時間、1 6 時間プールして活性化 (D 1 0 9) ; 単球 G M - C S F、I L - 4 5 日目由来の D C、T N F α 、単球スーブで 4 時間、1 6 時間プールして活性化 (D 1 1 0) ; 上皮細胞、未刺激 ; 上皮細胞、I L - 1 β で活性化 ; 肺線維芽肉腫株 M R C 5、P M A およびイオノマイシンと共に 1 時間、6 時間プールして活性化 (C 1 0 1) ; 腎臓上皮ガン細胞株 C H A、P M A およびイオノマイシンと共に 1 時間、6 時間プールして、活性化 (C 1 0 2) 。I L - B 3 0 の転写物の発現は、洗浄された単球、L P S、I F N γ 、抗 I L - 1 0 と共に 4 時間、1 6 時間プールして活性化 (M 1 0 6) ; 洗浄された単球、L P S、I F N γ 、抗 I L - 1 0 と共に 1 時間、2 時間、6 時間、1 2 時間、2 4 時間プールして活性化 (M 1 0 2) ; 洗浄された単球、L P S で 6 時間活性化 (M 1 0 9) ; および洗浄された単球、L P S で 1 時間活性化 (M 1 0 8) において非常に高かった。発現は、D C 9 5 % C D 1 a +、これは C D 3 4 + G M - C S F、T N F α 1 2 日目 F A C S 分離由来、P M A およびイオノマイシンで 1、6 時間プールして活性化 (D 1 0 4) ; および N K 2 0 クローン、P M A およびイオノマイシンで 6 時間プールして活性化 (K 1 0 1) において高かった。より少ない発現は、D C 7 0 % C D 1 a +、これは C D 3 4 + G M - C S F、T N F α 1 2 日目由来、P M A およびイオノマイシンで 6 時間活性化 (D 1 0 3) ; D C 7 0 % C D 1 a +、これは C D 3 4 + G M - C S F、T N F α 1 2 日目由来、P M A およびイオノマイシンで 1 時間活性化 (D 1 0 2) ; T 細胞、T H 1 クローン H Y 0 6、特異的ペプチドを用いて 2、6、1 2 時間プールしてアネルギー処理 (T 1 0 9) ; 末梢血単核細胞、抗 C D 3 を用いて 2、6、1 2 時間プールして活性化 (T 1 0 1) ; T 細胞、T H 0 クローン M o t 7 2、抗 C D 2 8 および抗 C D 3 を用いて 3、6、1 2 時間プールして活性化 (T 1 0 3) ; 脾臓細胞、抗 C D 4 0 および I L - 4 を用いて活性化 (B 1 0 1) ; T 細胞、T H 0 クローン M o t 7 2、特異的ペプチドを用いて 2、7、1 2 時間プールしてアネルギー処理 (T 1 0 4) ; 脾臓細胞、休止状態 (B 1 0 0) ; T 細胞、T H 1 クローン H Y 0 6、抗 C D 2 8 および抗 C D 3 を用いて 3、6、1 2 時間プールして活性化 (T 1 0 8) ; 上皮細胞、I L - β 活性化 ; 洗浄した単球、L P S、I F N γ 、I L - 1 0 を用いて 4、1 6 時間プールして活性化 (M 1 0 7) ; および B 細胞株 J Y、P M A およびイオノマイシンで 1、6 時間プールして活性化 (B 1 0 3) において検出された。検出可能な発現は、単球、G M - C S F、I L - 4 5 日目由来の D C、L P S で 4、1 6 時間プールして活性化 (D 1 0 9) ; T 細胞、T H 0 クローン M o t 7 2、休止状態 (T 1 0 2) ; 末梢血単核細胞 (単球、T 細胞、N K 細胞、顆粒球、B 細胞)、休止状態 (T 1 0 0) ; T 細胞 C D 4 + C D 4 5 R O -、抗 C D 2 8、I L - 4、および抗 I N F γ 中 2 7 日目に極性化されている、T 細胞の T H 2 極性化、抗 C D 3 および抗 C D 2 8 を用いて 4 時間活性化 (T 1 1 6) ; T 細胞クローン、プールした A D 1 3 0 . 2、T c 7 8 3 . 1 2、T c 7 8 3 . 1 3、T c 7 8 3 . 5 8、T c 7 8 2 . 6 9、休止状態 (T 1 1 8) ; U 9 3 7 前単核細胞株、休止状態 (M 1 0 0) ; 造血性前駆体株 T F 1、P M A およびイオノマイシンで 1、6 時間プールして活性化 (C 1 0 0) ; T 細胞、T H 2 クローン H Y 9 3 5、抗 C D 2 8 および抗 C D 3 を用いて 2、7、1 2 時間プールして活性化 (T 1 1 1) ; D C C D 1 a + C D 8 6 +、C D 3 4 + G M - C S F、T N F α 1 2 日目 F A C S 分離由来、P M A およびイオノマイシンで 1、6 時間プールして活性化 (D

106) ; 洗浄した単球、LPS、IFN γ 、IL-10で1、2、6、12、24時間
 プールして活性化(M103) ; DC、これは単球 GM-CSF、IL-4 5日目由
 来、TNF α 、単球スープで4、16時間プールして活性化(D110) ; DC、これは
 単球由来 GM-CSF、IL-4 5日目、休止状態(D108) ; U937前単球株
 、PMAおよびイオノマイシンで1、6時間プールして活性化(M101) ; T細胞ラン
 ダム $\gamma\delta$ T細胞クローン、休止状態(T119) ; およびT細胞、TH1クローンHY0
 6、抗CD28および抗CD3を用いて、3、6、12時間プールして活性化(T108
)において観察された。他のサンプルにおいては、シグナルは検出されなかった。

【0142】

要約すれば、その分布が、活性化マクロファージにおいて増加したIL-B30(炎症
 における役割を示唆する) ; 活性化したTh1細胞(Tヘルパーサブセット(特に、Th
 1免疫応答)における調節またはエフェクターの役割を示唆する) ; そして、活性化樹状
 細胞(抗原提示における役割、または胚中心のTまたはB細胞のDCとの相互作用を、示
 唆する)を示す。

【0143】

マウスmRNA単離のためのサンプルとしては、以下 : 休止状態マウス線維芽細胞L細
 胞株(C200) ; Bra f : ER(Bra fのエストロゲンレセプターとの融合)でト
 ランスフェクトされた細胞、コントロール(C201) ; 脾臓由来のMe114+ネイテ
 イブT細胞、休止状態(T209) ; 脾臓由来のMe114+ネイティブT細胞、IFN γ
 、IL-12を用いて刺激、そして抗IL-4でTH1細胞に極性化、IFN γ および
 IL-4に、6、12、24時間プールして曝露(T210) ; 脾臓由来のMe114+
 ネイティブT細胞、IL-4および抗IFN γ を用いて刺激してTh2細胞に極性化、IL
 -4および抗IFN γ に、6、13、24時間プールして曝露(T211) ; T細胞、
 TH1極性化(Me114 明るい、脾臓由来のCD4+細胞、IFN γ および抗IL-
 4を用いて7日間極性化 ; T200) ; T細胞、TH2極性化(Me114 明るい、脾
 臓由来のCD4+細胞、IL-4および抗IFN γ を用いて7日間極性化 ; T201) ;
 T細胞、トランスジェニックBalb/C由来で高度に3×にTH1極性化(Opens
 hawら、(1995) J. Exp. Med. 182 : 1357-1367を参照のこと
 ; 抗CD3を用いて2、6、24時間プールして活性化 ; T202) ; T細胞、トランス
 ジェニックBalb/C由来で高度に3×にTH2極性化(抗CD3を用いて2、6、2
 4時間プールして活性化 ; T203) ; T細胞、トランスジェニックC57 b1/6由
 来で高度に3×にTH1極性化(抗CD3を用いて2、6、24時間プールして活性化 ;
 T212) ; T細胞、トランスジェニックC57 b1/6由来で高度に3×にTH2極
 性化(抗CD3を用いて2、6、24時間プールして活性化 ; T213) ; T細胞、高度
 にTH1極性化(トランスジェニックBalb/C由来の未処置CD4+T細胞、IFN γ
 、IL-12、および抗IL-4を用いて3×に極性化 ; IGIF、IL-12、およ
 び抗IL-4を用いて、6、12、24時間刺激、プールした) ; CD44 - CD25
 + 前T細胞、胸腺より分離(T204) ; TH1 T細胞クローンD1.1、抗原によ
 る最後の刺激後、3週間休止状態(T205) ; TH1 T細胞クローンD1.1、10
 μ g/ml ConA刺激15時間(T206) ; TH2 T細胞クローンCDC35、
 抗原を用いる最後の刺激後3週間休止状態(T207) ; TH2 T細胞クローンCDC
 35、10 μ g/ml ConA刺激15時間(T208) ; 未刺激B細胞株CH12(
 B201) ; 未刺激成熟B細胞白血病細胞株A20(B200) ; 脾臓由来の未刺激大B
 細胞(B202) ; 全脾臓由来のB細胞、LPS活性化(B203) ; 脾臓由来のメトリ
 ザマイド富化樹状細胞、休止状態(D200) ; 骨髓由来の樹状細胞、休止状態(D20
 1) ; 未刺激の骨髓由来の樹状細胞、抗B220、抗CD3, および抗クラスIIを用い
 て枯渇、GM-CSFおよびIL-4中で培養(D202) ; 骨髓由来の樹状細胞、抗B
 220、抗CD3, および抗クラスIIを用いて枯渇させ、GM-CSFおよびIL-4
 中で培養、抗CD40を用いて1日間、5日間プールして刺激(D203) ; 単球細胞株
 RAW264.7、LPSで4時間活性化(M200) ; GMおよびM-CSFを用いて

10

20

30

40

50

誘導された骨髄マクロファージ (M201) ; GM-CSFを用いて誘導された骨髄マクロファージ、LPS、IFN γ 、およびIL-10を用いて24時間刺激 (M205) ; 骨髄マクロファージ由来、GM-CSFを用いる、LPS、IFN γ 、および抗IL-10を用いて24時間刺激 (M206) ; 腹膜のマクロファージ (M207) ; マクロファージ細胞株J774、休止状態 (M202) ; 0.5、1、3、6、12時間でのプールしたマクロファージ細胞株J774+LPS+抗IL-10 (M203) ; 0.5、1、3、5、12時間でのプールしたマクロファージ細胞株J774+LPS+IL-10 (M204) ; 未刺激マスト細胞株MC-9およびMCP-12 (M208) ; 脳微小血管内皮細胞由来の不死化内皮細胞株、未刺激 (E200) ; 脳微小血管内皮細胞由来の不死化内皮細胞株、TNF α を用いてオーバーナイトで刺激 (E201) ; 脳微小血管内皮細胞由来の不死化内皮細胞株、TNF α を用いてオーバーナイトで刺激 (E202) ; 脳微小血管内皮細胞由来の不死化内皮細胞株、TNF α およびIL-10を用いてオーバーナイトで刺激 (E203) ; wt C57 b1/6マウスからの全大動脈、5ヶ月齢のApoE KOマウス由来の全大動脈 (X207) ; 12ヶ月齢のApoE KOマウス由来の全大動脈 (X207) ; wt 胸腺 (O214) ; 全胸腺、rag-1 (O208) ; 全腎臓、rag-1 (O209) ; 全腎臓、NZ B/Wマウス ; および全心臓、rag-1 (O202) 、が挙げられる。高いシグナルが、LPSで4時間活性化された単球細胞株RAW264.7 (M200) ; T細胞、トランスジェニックC57 b1/6から高度に3 $\times$ TH1極性化する (抗CD3を用いて、2、6、24時間プールして活性化 ; T212) ; および高度にTH1極性化しているT細胞 (トランスジェニックBalb/C由来の未処置のCD4+ T細胞、IFN γ 、IL-12、および抗IL-4を用いて3 $\times$ に極性化 ; IGIF、IL-12、および抗IL-4を用いて、6、12、24時間刺激 (プールした) 、において検出された。検出可能なシグナルが、T細胞において検出され、トランスジェニックBalb/Cから高度に3 $\times$ TH1極性化した (Openshawら、(1995) J. Exp. Med. 182 : 1357-1367 ; 抗CD3を用いて2、6、24時間活性化 (プールした) ; T202) ; T細胞、TH2極性化 (Me114 明るい、脾臓由来のCD4+細胞、IL-4および抗IFN γ を用いて7日間極性化 ; T201) ; T細胞、TH1極性化 (Me114 明るい、脾臓由来のCD4+細胞、IFN γ および抗IL-4を用いて7日間極性化 ; T200) ; 0.5、1、3、6、12時間でのプールしたマクロファージ細胞株J774+LPS+抗IL-10 (M203) ; マクロファージ細胞株J774、休止状態 (M202) ; 0.5、1、3、5、12時間でのプールしたマクロファージ細胞株J774+LPS+IL-10 (M204) ; 脳微小血管内皮細胞由来の不死化内皮細胞株、TNF α を用いてオーバーナイトで刺激 (E201) ; GM-CSFを用いて誘導された骨髄マクロファージ、LPS、IFN γ 、および抗IL-10を用いて24時間刺激 (M206) 、において検出された。他のサンプルは、シグナルを示さない。RAW264.7マウス単球細胞株における発現は、タンパク質の天然の供給源を示唆する。

【0144】

(IV. IL-B30の染色体マッピング)

IL-B30をコードする単離されたcDNAを使用する。染色体マッピングは、標準的な技術である。例えば、BIOS Laboratories (New Haven, CT) およびPCRを用いたマウス体細胞ハイブリッドパネルの使用法を参照のこと。付随的な証拠は、マウスIL-B30遺伝子が第10番染色体に位置することを示唆する。

【0145】

(V. IL-B30タンパク質の精製)

複数のトランスフェクト細胞株を、他の細胞と比較して高いレベルでサイトカインを発現する細胞株についてスクリーニングする。種々の細胞株をスクリーニングし、そして取り扱いにおけるそれらの有利な特性について選択する。天然のIL-B30は、天然の供給源から単離され得るか、または形質転換した細胞から適切な発現ベクターを使用して発現することによって単離され得る。発現したタンパク質の精製は、細胞溶解物もしくは上

清から、標準的な手順によって達成されるか、または高効率で有効な精製をするための操作手段と組み合わせられ得る。F L A GまたはH i s 6セグメントは、このような精製の特色のために使用され得る。あるいは、アフィニティークロマトグラフィーが特異的抗体とともに使用され得る（以下を参照のこと）。

【0146】

タンパク質は、所望によりc o l i発現系、昆虫細胞発現系、または哺乳動物発現系において産生される。

【0147】

（V I . 相同なI L - B 3 0遺伝子の単離）

I L - B 3 0 c D N Aまたは他の種の対応する配列は、所望の供給源（例えば、霊長類細胞c D N Aライブラリー）からライブラリーをスクリーニングするためのハイブリダイゼーションプローブとして使用され得る。多くの異なる種が、プローブを使用して、簡易なハイブリダイゼーションに必要なストリンジェンシーについて、およびその存在についての両方についてスクリーニングされ得る。適切なハイブリダイゼーション条件を使用して、交差ハイブリダイゼーションの特異性を示すクローンについて選択する。

10

【0148】

ペプチド配列に基づく縮重プローブを使用するハイブリダイゼーションによるスクリーニングはまた、適切なクローンの単離を可能にする。あるいは、P C Rスクリーニングのための適切なプライマーの使用は、適切な核酸クローンの富化を生じる。

【0149】

類似の方法は、種改変体、多型改変体、または対立遺伝子改変体のいずれかを単離するために適用可能である。種改変体は、プローブとしての1つの種からの全長単離体またはフラグメントの単離に基づく種間ハイブリダイゼーション技術を使用して単離される。

20

【0150】

あるいは、ヒトI L - B 3 0に対して惹起された抗体は、適切な（例えば、c D N A）ライブラリー由来の交差反応性タンパク質を発現する細胞についてスクリーニングするために使用される。精製されたタンパク質または規定されたペプチドは、上記のように、標準的な方法によって抗体を産生するために有用である。合成ペプチドまたは精製されたタンパク質は、モノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体を生成するために免疫系に対して提示される。例えば、C o l i g a n (1 9 9 1) C u r r e n t P r o t o c o l s i n I m m u n o l o g y W i l e y / G r e e n e ; ならびにH a r l o w およびL a n e (1 9 8 9) A n t i b o d i e s : A L a b o r a t o r y M a n u a l C o l d S p r i n g H a r b o r P r e s s を参照のこと。得られる抗体は、記載されるように、スクリーニング、精製、または診断のために使用される。

30

【0151】

（V I I . I L - B 3 0に特異的な抗体の調製）

合成ペプチドまたは精製されたタンパク質は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を生成するために免疫系に対して提示される。例えば、C o l i g a n (1 9 9 1) C u r r e n t P r o t o c o l s i n I m m u n o l o g y W i l e y / G r e e n e ; ならびにH a r l o w およびL a n e (1 9 8 9) A n t i b o d i e s : A L a b o r a t o r y M a n u a l C o l d S p r i n g H a r b o r P r e s s を参照のこと。ポリクローナル血清またはハイブリドーマが調製され得る。適切な状況において、結合試薬は、上記のように（例えば、蛍光もしくはその他）標識されるか、またはパニング法のために基板に固定化されるかのいずれかである。免疫選択および関連する技術は、所望により、選択的試薬を調整するために利用可能である。

40

【0152】

（V I I I . 生物学的機能の幅の評価）

I L - B 3 0の生物学的活性を、I L - B 3 0とI L - 6とG - C S Fとの間の配列相同性および構造相同性に基づいて試験した。最初に、I L - 6またはG - C S Fの生物学的活性を示したアッセイを試験した。

50

【 0 1 5 3 】

(A . 細胞の増殖に関する効果)

種々の細胞型の増殖に関する効果を、種々の濃度のサイトカインを使用して評価する。用量応答分析を、関連するサイトカイン I L - 6、G - C S F などと組み合わせて行う。

【 0 1 5 4 】

(B . ヒト単球上の細胞表面分子の発現に対する効果)

単球を、正常な健常ドナーの末梢血単核細胞からのネガティブ選択によって精製する。簡単には、 3×10^8 個のフィコールバンド化単核細胞を、例えば、 $200 \mu\text{l}$ の $\alpha\text{CD}2$ (L e u - 5 A)、 $200 \mu\text{l}$ の $\alpha\text{CD}3$ (L e u - 4)、 $100 \mu\text{l}$ の $\alpha\text{CD}8$ (L e u 2 a)、 $100 \mu\text{l}$ の $\alpha\text{CD}19$ (L e u - 1 2)、 $100 \mu\text{l}$ の $\alpha\text{CD}20$ (L e u - 1 6)、 $100 \mu\text{l}$ の $\alpha\text{CD}56$ (L e u - 1 9)、 $100 \mu\text{l}$ の $\alpha\text{CD}67$ (I O M 6 7 ; I m m u n o t e c h , W e s t b r o o k , M E)、および抗グリコホリン抗体 (1 0 F 7 M N , A T C C , R o c k v i l l e , M D) からなるモノクローナル抗体のカクテル (B e c t o n - D i c k i n s o n ; M o u n t a i n V i e w , C A) とともに氷上でインキュベートする。抗体結合細胞を洗浄し、次いでヒツジ抗マウス I g G 結合磁気ビーズ (D y n a l , O s l o , N o r w a y) とともにビーズ対細胞比 2 0 : 1 でインキュベートする。抗体結合細胞を、磁場をかけることによって単球から分離する。引き続いて、ヒト単球を、I L - B 3 0、I L - 6、G - C S F、もしくはこれらの組み合わせの非存在下または存在下で 1 % ヒト A B 血清を含有する Y s s e l の培地 (G e m i n i B i o p r o d u c t s , C a l a b a s a s , C A) にて培養する。

10

20

【 0 1 5 5 】

細胞表面分子の発現の分析は、直接免疫蛍光によって行い得る。例えば、 2×10^5 個の精製ヒト単球を、1 % ヒト血清を含有するリン酸緩衝化生理食塩水 (P B S) において氷上で 2 0 分間インキュベートする。細胞を $200 \times g$ でペレット化する。細胞を 2 0 m l の P E または F I T C 標識した m A b 中で再懸濁する。氷上でのさらなる 2 0 分間のインキュベーションの後、細胞を 1 % ヒト血清を含有する P B S 中で洗浄し、続いて P B S 単独で 2 回洗浄する。細胞を、1 % パラホルムアルデヒドを含有する P B S において固定し、そして F A C S c a n フローサイトメーター (B e c t o n D i c k i n s o n ; M o u n t a i n V i e w , C A) 上で分析する。例示的な m A b を使用する (例えば、B e c t o n - D i c k i n s o n からの、C D 1 1 b (抗 m a c 1)、C D 1 1 c (g p 1 5 0 / 9 5)、C D 1 4 (L e u - M 3)、C D 5 4 (L e u 5 4)、C D 8 0 (抗 B B 1 / B 7)、H L A - D R (L 2 4 3)、および C D 8 6 (F U N 1 ; P h a r m i n g e n)、C D 6 4 (3 2 . 2 ; M e d a r e x)、C D 4 0 (m A b 8 9 ; S c h e r i n g - P l o u g h F r a n c e))。

30

【 0 1 5 6 】

(C . ヒト単球によるサイトカイン産生に対する I L - B 3 0 の効果)

ヒト単球を、記載するように単離し、そして 1 % ヒト A B 血清を I L - B 3 0 (1 / 1 0 0 希釈のバキュロウイルス発現材料) の非存在下または存在下で含有する Y s s e l の培地 (G e m i n i B i o p r o d u c t s , C a l a b a s a s , C A) において培養する。さらに、単球を、I L - B 3 0 の非存在下または存在下で L P S (E . c o l i 0 1 2 7 : B 8 D i f c o) で刺激し、細胞培養上清におけるサイトカイン (I L - 1 β 、I L - 6、T N F α 、G M - C S F、および I L - 1 0) の濃度を E L I S A によって決定する。

40

【 0 1 5 7 】

サイトカインの細胞質内染色のために、単球を、I L - B 3 0 および L P S (E . c o l i 0 1 2 7 : B 8 D i f c o) および 1 0 m g / m l の B r e f e l d i n A (E p i c e n t r e t e c h n o l o g i e s M a d i s o n W I) の存在下または非存在下で、Y s s e l の培地において 1 2 時間培養する (1 0 0 万 / m l)。細胞を P B S で洗浄し、そして室温で 2 0 分間、2 % ホルムアルデヒド / P B S 溶液中でインキ

50

ュベートする。引き続き、細胞を洗浄し、透過化緩衝液 (PBS / BSA (0.5%) / アジド (1 mM) 中の 0.5% サポニン (Sigma)) において再懸濁し、そして 20 分間室温でインキュベートする。細胞 (2×10^5) を遠心分離し、そして透過化緩衝液で 1:10 に希釈した直接結合体化した抗サイトカイン mAb の 20 ml 中で室温で 20 分間再懸濁する。以下の抗体を使用し得る: IL-1 α -PE (364-3B3-14); IL-6-PE (MQ2-13A5); TNF α -PE (MAb11); GM-CSF-PE (BVD2-21C11); および IL-12-PE (C11.5.14; Pharmingen San Diego, CA)。引き続き、細胞を透過化緩衝液中で 2 回、そして PBS / BSA / アジド 中で 1 回洗浄し、そして FACSscan フローサイトメーター (Becton Dickinson; Mountain View, CA) 上で分析する。

【0158】

(D. ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) の増殖に対する IL-B30 の効果)

全 PBMC を、正常な健常ドナーのバフィーコートから、記載される (Boyum ら) ようにフィコールハイパークによる遠心分離によって単離する。PBMC を、96 ウェルプレート (Falcon, Becton-Dickinson, NJ) 中で、IL-B30 の非存在下または存在下で 1% ヒト AB 血清を含有する 200 μ l の Yssel の培地 (Gemini Bioproducts, Calabases, CA) において培養する。細胞を、培地単独か、または 100 U/ml の IL-2 (R&D Systems) と組み合わせて、120 時間培養する。3H-チミジン (0.1 mCi) を、培養の最後の 6 時間の間に添加し、そして 3H-チミジンの取りこみを、液体シンチレーションカウンティングによって決定する。

【0159】

天然のタンパク質、組換えタンパク質、および融合タンパク質を、多くの他の生物学的アッセイ系において、例えば、T 細胞、B 細胞、NK、マクロファージ、樹状細胞、造血前駆体など上で、アゴニストおよびアンタゴニストの活性について試験する。IL-6 および G-CSF の構造的関連のため、これらの活性に関連するアッセイが分析されるべきである。

【0160】

IL-B30 を、IL-6 または G-CSF レセプターを発現するトランスフェクト細胞およびコントロール上でアゴニストまたはアンタゴニストについて評価する。例えば、Hōら (1993) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90, 11267-11271; Hōら (1995) Mol. Cell. Biol. 15:5043-5053; および Liu ら (1994) J. Immunol. 152:1821-1829 を参照のこと。

【0161】

IL-B30 を、マクロファージ/樹状細胞活性化および抗原提示アッセイ、抗原または同種異系刺激に応答した T 細胞サイトカイン産生および増殖における効果について評価する。例えば、de Waal Malefyt ら (1991) J. Exp. Med. 174:1209-1220; de Waal Malefyt ら (1991) J. Exp. Med. 174:915-924; Fiorentino ら (1991) J. Immunol. 147, 3815-3822; Fiorentino ら (1991) J. Immunol. 146:3444-3451; および Groux ら (1996) J. Exp. Med. 184:19-29 を参照のこと。

【0162】

IL-B30 をまた、NK 細胞刺激に対する効果について評価する。アッセイは、例えば、Hsu ら (1992) Internat. Immunol. 4:563-569; および Schwarzs ら (1994) J. Immunother. 16:95-104 に基づき得る。

【0163】

B細胞増殖および分化の効果を、例えば、Defranceら(1992) J. Exp. Med. 175: 671-682; Roussetら(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1890-1893において記載される方法論(IgG2およびIgA2スイッチ因子アッセイ(switch factor assay)を含む)によって分析する。COS7上清とは異なり、NIH3T3およびCOP上清は、見かけ上、ヒトB細胞アッセイには干渉しないことに、注目すべきである。

【0164】

(IX. 遺伝的に改変された動物の作製および分析)

トランスジェニックマウスは、標準的な方法によって作製され得る。このような動物は、特定の組織、または生物の全体に渡って、遺伝子の欠失の効果を決定するために有用である。このようなものは、種々の段階の動物または特定の組織の発達に対して、興味深い洞察を提供し得る。さらに、生物学的ストレスに対する種々の応答に対する効果を評価し得る。例えば、Hoganら(1995) Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual (第2版) Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照のこと。

【0165】

トランスジェニックマウスは作製されており、そしてその動物は誕生時に生きているようであるが、成長することができず、そして代表的には数週間以内に死亡する。その構築物は、広範でかつ高度な発現を導くはずのCMVエンハンサーを伴うアクチンプロモーターに基づいている。それらのマウスは、IL-6トランスジェニックマウスと同様に、成長阻害動物(runted)である。さらに、それらは、腹部の膨張、胃および腸の炎症、細胞の肝臓への浸潤を示し、そして代表的には50日目をむかえる前に死亡する。これらのマウスは繁殖しない。トランスジェニックマウスの第2のサブセットは、表現型の重篤度がより少なく、そしてそれらを繁殖させる試みが行われている。

【0166】

マウスIL-B30のゲノム構造は決定されている。IL-B30ノックアウトマウスの産生のためのストラテジーが開発されており、そして構築が開始されている。

【0167】

本明細書中で引用される全ての参考文献は、あたかも各個々の刊行物または特許出願が、具体的にそして個々に全ての目的のためにその全体が参考として援用されることが示されてるかと同様な程度まで、本明細書中で参考として援用される。

【0168】

当業者に明らかなように、本発明の多くの修飾および改変が、その精神および範囲から逸脱することなく成され得る。本明細書中に記載される特定の実施態様は、例示の目的のためのみで提供され、そして本発明は、添付の請求の範囲の文言、ならびにこのような請求項に与えられる等価物の権利の全範囲によってのみ限定される。

【配列表】

2013034480000001.app

10

20

30

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)		
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A	4 H 0 4 5
C 0 7 K	14/54	(2006.01)	C 0 7 K	14/54		
C 0 7 K	16/24	(2006.01)	C 0 7 K	16/24		
C 1 2 N	5/071	(2010.01)	C 1 2 N	5/00	2 0 2 A	
C 1 2 N	15/02	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	C	
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z	
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D	
G 0 1 N	33/532	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	P	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	G 0 1 N	33/532	A	
			C 1 2 P	21/08		

(74)代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ジェイ . フェルナンド バザン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 2 5 , メンロ パーク , ユニバーシティ ドライブ
7 7 5

F ターム(参考) 2G045 AA40 BA13 BB20 CA18 CA19 CB01 CB17 CB26 DA14 DA36
 FB01 FB03 FB08 FB12 FB13
 4B024 AA01 AA11 BA26 BA56 CA04 DA02 DA06 GA11 HA01 HA14
 HA15
 4B063 QA13 QA18 QQ08 QQ43 QQ79 QR32 QR48 QR56 QR77 QS33
 QS34 QX02
 4B064 AG27 CA20 DA01 DA13
 4B065 AA90X BB19 BB34 CA44 CA46
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA02 DA76 EA20 EA50 FA72
 FA74

专利名称(译)	哺乳动物细胞因子：白细胞介素-B30和相关试剂		
公开(公告)号	JP2013034480A	公开(公告)日	2013-02-21
申请号	JP2012203186	申请日	2012-09-14
[标]申请(专利权)人(译)	默沙东CORP.		
申请(专利权)人(译)	默克公司和夏普公司巨蛋		
[标]发明人	ジェイフェルナンドバザン		
发明人	ジェイ. フェルナンド バザン		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12Q1/68 C07K14/54 C07K16/24 C12N5/071 C12N15/02 G01N33/50 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/532 C12P21/08 A61K38/00 C12N15/24 C12P21/02 G01N33/68		
CPC分类号	A61K38/00 C07K14/54		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12Q1/68.A C07K14/54 C07K16/24 C12N5/00.202.A C12N15/00.C G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N33/53.D G01N33/53.P G01N33/532.A C12P21/08 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/24 C12N5/071 C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB20 2G045/CA18 2G045/CA19 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/CB26 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/FB13 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA26 4B024/BA56 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA14 4B024/HA15 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/BB19 4B065/BB34 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA02 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	08/900905 1997-07-25 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

种类的蛋白质，与在哺乳动物细胞（例如哺乳动物免疫系统细胞）的生物学和生理调节中起作用的蛋白质有关。特别是，它提供了纯化的基因，蛋白质，抗体和相关有用的试剂（例如，用于调节包括造血细胞在内的多种细胞类型的活性，发育，分化和功能）的试剂。编码各种哺乳动物蛋白的氨基酸和DNA序列，它们是细胞因子，是分泌的分子，可以在例如免疫细胞或其他细胞之间介导信号。新型白介素组合物和相关化合物及其使用方法。[选择图]无