



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 149 149**

51 Int. Cl.:
C07K 14/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **98938877 .2**

96 Fecha de presentación : **13.08.1998**

97 Número de publicación de la solicitud: **1003781**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.05.2000**

54 Título: **Proteínas de unión a interleuquina-18, su preparación y uso.**

30 Prioridad: **14.08.1997 IL 121554**
27.08.1997 IL 121639
29.09.1997 IL 121860
06.11.1997 IL 122134
22.07.1998 IL 125463

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2009

73 Titular/es:
YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT Co., Ltd.
The Weizmann Institute of Science
P.O. Box 95
Rehovot 76100, IL

72 Inventor/es: **Novick, Daniela;**
Dinarelli, Charles;
Rubinstein, Menachem y
Kim, Soo, Hyun

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 149 149 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteínas de unión a interleuquina-18, su preparación y uso.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a proteína de unión de interleuquina-18 (IL-18), denominada a partir de ahora IL-18BP, capaz de unirse a IL-18. Más particularmente, esta invención se refiere a IL-18BP soluble que puede obtenerse a partir de fluidos corporales, a IL-18BPs solubles que pueden obtenerse mediante expresión de vectores de ADN adecuados en células hospedantes, a homólogos de IL-18BP codificados por virus que pueden obtenerse mediante expresión de vectores de ADN adecuados en células hospedantes, a vectores que expresan las diversas IL-18BPs, a vectores útiles para la expresión de IL-18BP en humanos y en otros mamíferos, a anticuerpos contra IL-18BPs, al uso terapéutico de dichas IL-18BPs para modular y/o bloquear la actividad de IL-18, al uso terapéutico de dichos vectores de expresión para modular y/o bloquear la actividad de IL-18 y al uso de los anticuerpos.

15 **Antecedentes de la invención**

En 1989 se describió una actividad en suero inducida por endotoxinas que indujo interferón- γ (IFN- γ) obtenido a partir de células de bazo de ratón (27). Esta actividad en suero no funcionó como un inductor directo de IFN- γ , sino más bien como un coestimulante junto con IL-2 o mitógenos. Un intento por purificar la actividad de suero de ratón post-endotoxina reveló una proteína aparentemente homogénea de 50-55 kDa (26). Puesto que otras citoquinas pueden actuar como coestimulantes para la producción de IFN- γ , el fallo en la neutralización de anticuerpos de IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, o de TNF para neutralizar la actividad en suero sugirieron que se trataba de un factor distinto. En 1995, los mismos científicos demostraron que el coestimulante inducido por endotoxina para la producción de IFN- γ estaba presente en extracto de hígado de ratones precondicionados con *P. acnes* (31). En este modelo, la población hepática de macrófagos (células de Kupffer) se expandió y en estos ratones una dosis baja de lipopolisacárido bacteriano (LPS), que en ratones no precondicionados no es letal, se vuelve letal. El factor, llamado factor inductor de IFN- γ (IGIF) y más tarde designado como interleuquina-18 (IL-18), fue purificado hasta homogeneidad a partir de 1.200 gramos de hígado de ratón tratado con *P. acnes*. Se usaron oligonucleótidos degenerados derivados de secuencias de aminoácidos de IL-18 purificada para clonar un ADNc murino de IL-18 (31). La IL-18 es una proteína de 18-19 kDa de 157 aminoácidos, que no tiene similitudes obvias con ningún péptido de las bases de datos. Los ARNs mensajeros correspondientes a IL-18 y interleuquina-12 (IL-12) se detectan fácilmente en células de Kupffer y en macrófagos activados. La IL-18 recombinante induce IFN-gamma de forma más potente que la IL-12, aparentemente a través de un mecanismo separado (31). Similar a la actividad en suero inducida por endotoxina, la IL-18 no induce IFN- γ por sí misma, sino que actúa básicamente como coestimulante junto con mitógenos o con IL-2. La IL-18 potencia la proliferación de células T, aparentemente a través de un mecanismo dependiente de IL-2, y potencia la producción de citoquinas Th1 *in vitro*, y exhibe un sinergismo cuando se combina con IL-12 en términos de una producción potenciada de IFN- γ (24).

Se demostró que anticuerpos neutralizantes de IL-18 de ratón previenen la letalidad de LPS en bajas dosis en ratones precondicionados con *P. acnes*. Otros autores han publicado la importancia del IFN- γ como mediador de letalidad de LPS en ratones precondicionados. Por ejemplo, anticuerpos neutralizantes anti-IFN- γ protegieron ratones frente a shock de tipo Shwartzman (16), y ratones tratados con galactosamina deficiente en el receptor IFN- γ se mostraron resistentes frente a la muerte inducida por LPS (7). Por tanto, era de esperar que los anticuerpos neutralizantes de IL-18 murina protegieran a los ratones precondicionados con *P. acnes* frente a LPS letal (31). El tratamiento con IL-18 antimurina también protegió a los ratones supervivientes frente a citotoxicidad hepática severa.

Después de que la forma murina fuera clonada, la secuencia de ADNc humano para la IL-18 fue publicada en 1996 (38). La IL-18 humana recombinante exhibe una actividad de IL-18 natural (38). La IL-18 humana recombinante no tiene actividad directa de inducción de IFN- γ sobre células T humanas, sino que actúa como un coestimulante para la producción de IFN- γ y otras citoquinas de célula colaboradora T-1 (Th1) (38). Hasta la fecha, se concibe la IL-18 básicamente como un coestimulante para la producción de citoquinas Th1 (IFN- γ , IL-2 y factor estimulador de colonia granulocito-macrófago) (20), y también como un coestimulante para la citotoxicidad mediada por ligando FAS de clones de células asesinas naturales murinas (37).

Mediante la clonación de IL-18 a partir de tejidos afectados y el estudio de la expresión génica de IL-18, se descubrió una estrecha relación entre esta citoquina y una enfermedad autoinmune. El ratón diabético no obeso (NOD) desarrolla espontáneamente insulinitis y diabetes autoinmunes, lo que puede acelerarse y sincronizarse mediante una única inyección de ciclofosfamida. Se describió el ARNm de IL-18 mediante PCR de transcriptasa inversa en páncreas de ratones NOD durante las primeras etapas de la insulinitis. Los niveles de ARNm de IL-18 aumentaron rápidamente después de un tratamiento con ciclofosfamida, precediendo a un aumento del ARNm de IFN- γ , y posteriormente a la aparición de diabetes. Cabe destacar que esta cinética se asemeja a la del ARNm de IL-12-p40, dando como resultado una estrecha correlación de niveles de ARNm individuales. La clonación del ADNc de IL-18 a partir de ARN de páncreas seguida de un secuenciamiento reveló una identidad con la secuencia de IL-18 clonada a partir de células de Kupffer y macrófagos pre-activados *in vivo*. También macrófagos de ratones NOD respondieron a ciclofosfamida con expresión génica de IL-18, mientras que macrófagos procedentes de ratones Balb/c tratados en paralelo no lo hicieron. Por lo tanto, la expresión de IL-18 está regulada de forma anormal en ratones NOD autoinmunes y está estrechamente relacionada con el desarrollo de diabetes (32).

La IL-18 desempeña un papel potencial en la inmunoregulación o en la inflamación aumentando la actividad funcional de ligando Fas en células Th1 (10). La IL-18 también se expresa en el córtex adrenal y por tanto podría ser un neuro-inmunomodulador secretado, que desempeña un papel importante para orquestar el sistema inmune después de una experiencia estresante (9).

In vivo la IL-18 se forma mediante ruptura de pro-IL-18, y su actividad endógena parece ser la responsable de la producción de IFN- γ en la letalidad mediada por *P. acnes* y LPS. Debido a su actividad, el bloqueo de la actividad biológica de IL-18 en enfermedades humanas constituye una estrategia terapéutica para muchas enfermedades. Esto puede lograrse usando receptores dobles o bloqueando anticuerpos del receptor IL-18 ligado a célula.

Las proteínas de unión de citoquinas (receptores de citoquinas solubles) corresponden con los dominios de unión de ligando extracelulares de sus respectivos receptores de citoquinas de la superficie celular. Son derivados bien mediante una división alternativa de un pre-ARNm, común al receptor de la superficie celular, o bien mediante ruptura proteolítica del receptor de la superficie celular. En el pasado se han descrito receptores solubles de ese tipo, e incluyen, entre otros, los receptores solubles de IL-6 e IFN- γ (30), TNF (11, 12), IL-1 e IL-4 (21), IFN- α/β (28, 29) y otros. Una proteína de unión de citoquinas, denominada osteoprotegerina (OPG, también conocida como factor inhibidor de osteoclasto, OCIF), un miembro de la familia TNFR/Fas, parece ser el primer ejemplo de un receptor soluble que existe únicamente en forma de proteína secretada (1, 34, 39).

Resumen de la invención

La presente invención proporciona proteínas de unión de IL-18 (IL-18BPs) seleccionadas del grupo que consiste en:

- (a) polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2 ó 6;
- (b) polipéptidos como los definidos en (a) sin una secuencia líder;
- (c) muteínas que tienen al menos un 80% de homología con la IL-18BP tal como se define en (a) o (b), proteínas fusionadas, derivados modificados químicamente, derivados permutados circularmente, y mezclas de los mismos, de los polipéptidos definidos en (a) o (b); y que se unen a IL-18 y bloquean la producción inducida por IL-18 de IFN- γ .

La invención también proporciona un proceso para aislar IL-18BPs a partir de fluidos humanos, y un proceso para obtenerlas por medios recombinantes. La invención también proporciona factores de expresión de IL-18BPs, adecuados para la expresión de IL-18BP en humanos y en otros mamíferos. IL-18BPs específicas, homólogos de IL-18BP codificados víricamente, proteínas fusionadas, muteínas, derivados modificados químicamente, y derivados permutados circularmente de las mismas de la presente invención son útiles para modular y/o bloquear las actividades biológicas de la IL-18.

También se proporcionan vehículos de expresión replicable que contienen ADNs adecuados para la expresión de las diversas IL-18BPs en células hospedantes, células hospedantes transformadas según lo expuesto en la presente memoria y proteínas y polipéptidos producidos mediante expresión de dichos hospedantes.

La invención además proporciona composiciones farmacéuticas que consisten en vehículos adecuados y IL-18BPs, o IL-18BPs víricas, o vectores para expresar las mismas en humanos y otros mamíferos, para el tratamiento de enfermedades y afecciones que requieran la modulación o el bloqueo de la actividad de IL-18.

La invención proporciona además anticuerpos de las IL-18BPs y de las IL-18BPs víricas, adecuados para purificación por afinidad e inmunoensayos de los mismos.

Descripción de las figuras

Figura 1: muestra la SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecilsulfato sódico) de proteína de unión de IL-18 purificada por afinidad de ligando. Se cargaron proteínas urinarias crudas (concentradas mediante ultrafiltración de 500 L de orina humana normal) en una columna de IL-18-agarosa. La columna fue lavada y las proteínas ligadas fueron eluidas a pH 2,2. Las fracciones eluidas fueron neutralizadas y se analizaron alícuotas mediante SDS-PAGE (10% en acrilamida) en condiciones no reductoras y con tinción de plata. Las bandas son: 1: proteínas urinarias crudas (1,5 μ g, cargadas en el gel); 2-9: eluciones 1-8, respectivamente, de la columna de IL-18-agarosa; 10: marcadores de peso molecular, en kD, indicados en el lateral derecho. Una flecha indica la banda correspondiente a IL-18BP.

Figura 2: muestra un autorradiograma de SDS-PAGE (7,5% en acrilamida) de complejos que consisten en ¹²⁵I-IL-18 (peso molecular aparente de 19 kD), entrecruzado con las siguientes preparaciones de proteína de unión de IL-18 soluble: Banda 1: Lavado de la columna de afinidad de IL-18. Banda 2: Elución 2 de la columna de afinidad de IL-18. Banda 3: Elución 3 de la columna de afinidad de IL-18. Los marcadores de peso molecular se indican en el lateral derecho (en kD). Una flecha indica el producto entrecruzado (58 kD).

ES 2 149 149 T3

Figura 3: muestra la inhibición de la producción inducida mediante IL-18 de IFN- γ por la IL-18BP.

(A) Se estimularon esplenocitos de ratón (24 h, 37°C) con las combinaciones indicadas de LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e IL-18 humana (5 ng/mL), añadidas bien directamente o bien después de un pre-mezclamiento (1 h, 37°C) con IL-18BP urinaria. El nivel de $\text{muIFN-}\gamma$ en el cultivo se determinó después de 24 h.

(B) Se incubaron esplenocitos de ratón (24 h) con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) junto con IL-18 murina (10 ng/mL) pre-mezclada (1 h, 37°C) con concentraciones crecientes de IL-18BP humana.

(C) Se incubaron esplenocitos de ratón (24 h) con LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) junto con concentraciones crecientes de IL-18BP humana.

(D) Se incubaron esplenocitos de ratón (24 h) con Con A (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), junto con concentraciones crecientes de IL-18BP humana.

(E) Se estimularon células KG-1 humanas con TNF- α (20 ng/mL) y huIL-18 (25 ng/mL), añadidas por separado o después de un pre-mezclamiento (1 h, 37°C) con IL-18BP urinaria.

Figura 4: muestra la secuencia de ADNc y de proteína de IL-18BPa humana. El péptido señal está subrayado.

Figura 5: muestra la secuencia de ADNc y de proteína de IL-18BPb humana. El péptido señal está subrayado.

Figura 6: muestra la secuencia de ADNc y de proteína de IL-18BPc humana. El péptido señal está subrayado.

Figura 7: muestra la secuencia de ADNc y de proteína de IL-18BPd humana. El péptido señal está subrayado.

Figura 8: muestra la secuencia del gen de IL-18BP humana. Se determinó la secuencia de un clon genómico humano (7,1 kb) y se comparó con la de varios clones de ADNc aislados a partir de 3 bibliotecas de ADNc. El codón de inicio de la traducción común lo conforman los nucleótidos 683-685. El gen NuMA1 está localizado en la cadena negativa, desde el nucleótido 3578 hasta el final.

Figura 9: muestra el efecto de IL-18BP recombinante en la actividad de IL-18 humana y de ratón.

La IL-18BPa marcada con His₆ fue expresada temporalmente en células COS7 y fue purificada.

(A) Se premezcló IL-18 humana (5 ng/mL) bien con IL-18BPa marcada con His₆ ó bien con RPMI, y se añadió a células de bazo de ratón junto con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se midió la producción de IFN- γ después de 24 h.

(B) Se premezcló IL-18 de ratón (10 ng/mL) bien con IL-18BPa marcada con His₆ ó bien con RPMI, y se añadió a células de bazo de ratón junto con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se midió la producción de IFN- γ después de 24 h.

(C) Se premezcló IL-18 humana (25 ng/mL) bien con COS7-IL-18BPa o bien con RPMI, y se añadió a PBMC humanas en presencia de IL-12 (10 ng/mL).

(D) Se premezcló IL-18 humana (25 ng/mL) bien con COS7-IL-18BPa o bien con RPMI, y se añadió a células KG-1 humanas en presencia de TNF- α (20 ng/mL).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a varias IL-18BPs e IL-18BPs víricas que se unen a IL-18. Dichas IL-18BPs pueden ser capaces de modular y/o bloquear las actividades biológicas de la IL-18. La expresión "IL-18BPs e IL-18BPs víricas" incluye la proteína madura (sin la secuencia señal), la proteína que comprende secuencias señal, muteínas de IL-18BPs e IL-18BPs víricas, derivados de IL-18BPs e IL-18BPs víricas, y formas truncadas de IL-18BPs e IL-18BPs víricas, y sales de las mismas.

La invención se refiere además a vectores replicables, adecuados para la expresión de varias IL-18BPs en células hospedantes y en bacterias hospedantes. La invención se refiere además a vectores de expresión, adecuados para la expresión de varias IL-18PBs en humanos y en otros mamíferos.

La invención se refiere además a ADNs que codifican para varias IL-18BPs, muteínas, proteínas fusionadas, derivados modificados químicamente, y mezclas de los mismos. Dicho ADN puede ser un ADN genómico, un ADNc, un ADN sintético, un producto de PCR o combinaciones de los mismos. Dichos ADNs pueden insertarse en vectores replicables para la expresión de varias IL-18BPs en células hospedantes, de acuerdo con la invención.

Un ADN de este tipo codifica una IL-18BP que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 10 y proporcionada con un codón de parada en su extremo 3'.

ES 2 149 149 T3

Los vectores de expresión adecuados para la expresión de varias IL-18BPs o IL-18BPs víricas en humanos y en otros mamíferos, es decir para terapia génica, pueden ser vectores víricos u otros tipos de vectores en los que se ha insertado un gen de IL-18BP o un ADNc de IL-18BP de un modo tal que permita una expresión eficaz de una IL-18BP en humanos y en otros mamíferos.

5

El aislamiento de IL-18BP puede llevarse a cabo de acuerdo con la invención, por ejemplo haciendo pasar un fluido humano, tal como orina o suero, a través de una columna cromatográfica a la que se ha acoplado IL-18, y después de eso eluyendo la IL-18BP ligada.

10

Las diversas IL-18BPs también pueden prepararse a través de medios recombinantes, es decir, mediante la expresión de IL-18BP en un hospedante adecuado, tras ligar operativamente promotores, potenciadores de la expresión, secuencias reguladoras, etc., adecuadas para el hospedante concreto empleado, por ejemplo que permitan la expresión en la orientación correcta.

15

Las diversas IL-18BPs e IL-18BPs víricas, y los vectores para expresar IL-18BP en humanos y otros mamíferos, pueden emplearse en el tratamiento y la paliación de afecciones en las que está implicada la IL-18, o provocadas por un exceso de IL-18 administrada exógenamente o producida endógenamente. Dichas afecciones son, por ejemplo, enfermedades autoinmunes, diabetes de tipo I, artritis reumatoide, rechazos de injertos, enfermedad inflamatoria del intestino, sepsis, esclerosis múltiple, enfermedades cardíacas isquémicas (que incluyen ataques al corazón), lesiones cerebrales isquémicas, hepatitis crónica, soriasis, pancreatitis crónica, pancreatitis aguda y otros similares.

20

De acuerdo con la presente invención, se aisló IL-18BP a partir de orina normal humana empleando una única etapa cromatográfica. Se cargó una preparación de proteínas urinarias humanas no purificada concentrada a partir de 500 L de orina humana normal en una columna que consiste en IL-18 humana ligada a agarosa. La columna fue lavada y las proteínas ligadas fueron eluidas a pH bajo. Las fracciones eluidas fueron neutralizadas y se analizaron alícuotas mediante SDS-PAGE (poliacrilamida al 10%) en condiciones no reductoras y con tinción de plata. Se obtuvo específicamente una banda de proteína de aproximadamente 40 kD en las fracciones eluidas (Figura 1).

25

La proteína de aproximadamente 40 kD obtenida en la primera etapa fue identificada como una proteína de unión de IL-18 por su capacidad para entrelazarse específicamente con ¹²⁵I-IL-18 (Figura 2). La proteína de aproximadamente 40 kD fue caracterizada también mediante análisis de secuencia proteica N-terminal. Se tomaron alícuotas de la proteína eluida y se las sometió a SDS-PAGE, electrotinción con una membrana de PVDF y a análisis de microsecuencia proteica. De forma similar, se sometieron alícuotas de la proteína eluida a análisis directo de microsecuencia proteica. En ambos casos, se obtuvieron dos secuencias de polipéptidos. Una secuencia principal y una secuencia secundaria, correspondiente esta última a un fragmento de defensina humana (número de acceso p11398), que empiezan en el aminoácido 65. La sustracción de la secuencia de defensina conocida proporcionó la siguiente secuencia:

35

T-P-V-S-Q-Q-x-x-x-A-A-A

40

1 . . . 5 . . . 10 . .

en la que x representa un aminoácido todavía sin determinar.

45

Con el fin de obtener una secuencia más larga y más precisa, y con el fin de identificar residuos de cisteína potenciales, se redujo una alícuota de la fracción eluida con DTT en condiciones desnaturalizantes, se hizo reaccionar con 4-vinil piridina, se desaló mediante un dispositivo de micro-ultrafiltración (Ultrafree, límite 10.000 Da, Millipore) y se sometió a análisis de microsecuencia proteica. Tras el ciclo N° 1 de secuenciamiento, la proteína residual se hizo reaccionar con o-ftalaldehído para bloquear todos los polipéptidos N-terminales que no eran Pro, y a continuación se retomó el secuenciamiento. De este modo se obtuvo la siguiente secuencia proteica sencilla:

50

TPVSQXXXAA

XASVRSTKDP

CPSQPPVFPA

AKQCPALEVT

55

1

10

20

30

40

(T=Thr; P=Pro; V=Val; S=Ser; Q=Gln; X=Desconocido; A=Ala; R=Arg; K=Lys; D=Asp; C=Cys; F=Phe; L=Leu; E=Glu)

60

La secuencia resultante es significativamente diferente a la de cualquier otra proteína conocida, según pudo determinarse buscando en las bases de datos de proteínas. Sin embargo, buscando en la base de datos de The Institute of Genomic Research (TIGR) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mediante el programa de búsqueda tblastn se obtuvo un archivo de ADNc, denominado THC123801, cuyo marco de lectura abierto (218 codones), una vez traducido, contiene una secuencia altamente homóloga a la de la secuencia N-terminal de la IL-18BP. Dicha homología se muestra a continuación:

65

ES 2 149 149 T3

línea de células T Jurkat, de PBMC y de bazo humano. Los diversos clones de ADNc independientes correspondieron a cuatro variantes de división de la IL-18BP (SEC ID N°: 1, 3, 5 y 7). Todas las variantes de división codificaron para proteínas secretadas solubles putativas. La más abundante (IL-18BPa) tenía un marco de lectura abierto de 192 codones, que codifica para un péptido señal y que en la presente memoria se denomina a veces "secuencia líder" de 28 residuos de aminoácido seguidos por una IL-18BPa putativa madura, cuyos primeros 40 residuos coinciden perfectamente con la secuencia proteica N-terminal de la IL-18BP urinaria (SEC ID N°: 2). La posición de los residuos de cisteína sugirió que este polipéptido pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig). Cabe destacar que cada uno de los cuatro residuos de Gln de la IL-18BPa madura era una posición potencial de N-glicosilación. Las otras tres variantes de la IL-18BP eran menos abundantes que la IL-18BPa. Incluían un ADNc de IL-18PBb más corto, de 1 kb, que codifica para un péptido señal de 28 residuos de aminoácido seguidos de una proteína madura de 85 residuos de aminoácido (SEC ID N°: 4). Una tercera variante, la IL-18PBc, estaba representada por un ADNc de 2,3 kb, que codifica para un péptido señal de 28 residuos de aminoácido seguidos de una IL-18BP madura de 169 residuos de aminoácido (SEC ID N°: 6). La cuarta variante, IL-18BPd, codificaba para un péptido señal de 28 residuos de aminoácido seguidos de una IL-18BP madura de 133 residuos de aminoácido (SEC ID N°: 8).

Para estudiar en más detalle la posible existencia de otras variantes de división de la IL-18BP, se escrutó una biblioteca genómica humana con una sonda correspondiente al ADNc de longitud completa de la IL-18BP. En esta biblioteca se identificaron cinco clones genómicos, de distinta longitud. Dichos clones fueron sometidos a análisis de secuencia de ADN con cebadores externos e internos. En conjunto, se montó una secuencia de 7,8 kb a partir de estos clones (SEC ID N°: 9). No se identificó ningún exón que codificara para un receptor trans-membrana (TM) en la secuencia de 7,8 kb. Todas las variantes compartían una posición de inicio de la traducción común, codificada para el mismo péptido señal de 28 residuos de aminoácido y proteínas maduras solubles de diversos tamaños y secuencias C-terminales. La localización de la IL-18BP contiene un gen adicional, que codifica para la proteína de aparato mitótico nuclear 1 (NUMA1), posicionada en la cadena menos. Este descubrimiento localiza el gen de IL-18BP en el cromosoma humano 11q13 (36).

Se llevó a cabo una búsqueda de homología con la secuencia proteica completa de la IL-18BPa y la base de datos GenPept (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), usando el algoritmo Smith Watermann. Se descubrió que los homólogos de la IL-18BP son expresados en varios virus de la viruela como proteínas secretadas de función previamente desconocida. Se ha publicado previamente que los virus codifican para varios receptores de citoquina y que dichas moléculas codificadas víricamente sirven como receptores de señuelo que inhiben las respuestas inmunes neutralizando sus correspondientes citoquinas (revisado por Spriggs, MK, 1994, Curr. Opin. Immunol., 6, 526-529). Por lo tanto, la invención se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden un homólogo codificado víricamente de la IL-18BP que se une a IL-18 y que bloquea la producción de IFN- γ inducida por IL-18. En la Tabla 1 se proporcionan ejemplos de homólogos codificados víricamente de la IL-18BP.

De acuerdo con la presente invención, el homólogo codificado víricamente de la IL-18BP puede estar expresado en un hospedante procariótico o eucariótico. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "homólogo codificado víricamente de IL-18BP" se refiere a una similitud de al menos el 50% en una secuencia de al menos 70 residuos de aminoácido. Más preferiblemente, tiene una similitud de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% o, más preferiblemente, al menos el 90%, en una secuencia de 100 residuos de aminoácido.

TABLA 1

Proteínas codificadas víricamente, que muestran una elevada homología con la IL-18BP humana

Secuencia GenPept	Tipo de virus
MCU60315_54	U60315 Virus molluscum contagiosum subtipo 1
MCU60315_54	U60315 Virus molluscum contagiosum subtipo 1
SWPHLSB_12	L22013 Virus de la viruela porcina
CV41KBL_14	Virus de la viruela bobina
VVCGAA_5	Virus variola
U01161_3 174	Virus Ectromelia (virus de la viruela de ratón)
VVU18340_6	Virus variola
VVU18338_7	Virus variola
VVU18337_7	Virus variola
VARCG_7 173	Virus variola principal
MCU60315_51	Virus molluscum contagiosum
HNABV_1	Nuevo virus asociado a Hepatitis no A y no B

ES 2 149 149 T3

La IL-18BPa fue expresada en células COS7 de mono. Para este propósito, se insertó el ADNc de IL-18BPa en el vector de expresión de mamífero pEF-BOS. Se añadió una casete que codifica para una secuencia (His)₆ en el extremo 3' del ORF de IL-18BP en el marco, con el objetivo de facilitar la purificación de la proteína recombinante. Se transfectaron de forma temporal células COS7 con el vector de expresión y se concentró el medio libre de suero de dichas células (150 mL) y se purificó mediante cromatografía de quelación de metales. La IL-18BPa apareció como una banda sencilla en el SDS-PAGE con tinción de plata en condiciones reductoras y no reductoras, y presentó la misma masa molecular aparente que la IL-18BP urinaria. El análisis de secuencia proteica de dicha preparación reveló la misma secuencia N-terminal que la IL-18BP urinaria. El análisis de inmunotinción de la IL-18BPa con anticuerpos elevados contra la IL-18BP urinaria reveló la misma banda de masa molecular que la proteína urinaria. Además, usando inmunoprecipitación seguida de SDS-PAGE y autorradiografía, la IL-18BPa fue capaz de desplazar la ¹²⁵I-IL-18BP urinaria de la unión del anticuerpo. Por lo tanto, la IL-18BPa corresponde estructuralmente a la IL-18BP aislada de la orina.

Se evaluó IL-18BPa purificada y sin purificar para determinar su capacidad para inhibir la actividad biológica de la IL-18. La IL-18BPa inhibió la actividad de IL-18 humana y de ratón en esplenocitos murinos, PBMC y la línea de células humanas KG-1 (Figura 9). Estos resultados confirman la identidad de ADNc de IL-18BPa como la que codifica para una IL-18BP biológicamente activa.

La invención se refiere además a muteínas de IL-18BPs y a IL-18BPs víricas y a proteínas fusionadas que consisten en IL-18BPs naturales e IL-18BPs víricas, o sus muteínas o sus fragmentos, fusionadas a otro polipéptido o proteína, y que son capaces de unirse a IL-18 y de bloquear la producción de IFN- γ inducida por IL-18.

Tal como se usa en la presente invención, el término "muteínas" se refiere a análogos de una IL-18BP, o a análogos de una IL-18BP vírica, en los que uno o más residuos de aminoácido de una IL-18BP natural o una IL-18BP vírica son sustituidos por diferentes residuos de aminoácido, o son eliminados, o uno o más residuos de aminoácido son añadidos a la secuencia natural de una IL-18BP, o de una IL-18BP vírica, sin cambiar considerablemente la capacidad de los productos resultantes en comparación con la IL-18BP natural o la IL-18BP vírica para unirse a IL-18 y para bloquear la producción de IFN- γ inducida por IL-18. Dichas muteínas se preparan empleando técnicas de síntesis y/o de mutagénesis dirigida a una posición conocidas, o mediante cualquier técnica conocida adecuada para ello.

Cualquier muteína de este tipo presenta preferiblemente una secuencia de aminoácidos suficientemente duplicativa de la de una IL-18BP, o suficientemente duplicativa de la de una IL-18BP vírica, tal como que presente una actividad sustancialmente similar a la de una IL-18BP. Una actividad de la IL-18BP es su capacidad para unirse a IL-18. Siempre que la muteína presente una actividad de unión a IL-18 sustancial, puede usarse en la purificación de IL-18, por ejemplo mediante cromatografía de afinidad, y por tanto puede considerarse que tiene una actividad sustancialmente similar a la IL-18BP. Por lo tanto, se puede determinar si una muteína dada tiene sustancialmente la misma actividad que la IL-18BP por medio de experimentos rutinarios que comprenden someter dicha muteína, por ejemplo, a un ensayo competitivo de sándwich sencillo para determinar si se une o no a una IL-18 marcada apropiadamente, tal como un radioinmunoensayo o un ensayo ELISA.

En una realización preferida, cualquier muteína de este tipo tiene al menos un 40% de identidad o de homología con respecto a la secuencia de una IL-18BP o de un homólogo de IL-18BP codificado líricamente. Más preferiblemente, tiene una identidad o una homología al menos del 50%, al menos del 60%, al menos del 70%, al menos del 80% o, más preferiblemente, al menos del 90%.

Las muteínas de polipéptidos de IL-18BP o las muteínas de IL-18BPs víricas, que pueden usarse de acuerdo con la presente invención, o el ácido nucleico que codifica para ellas, incluyen un conjunto finito de secuencias sustancialmente correspondientes como péptidos o polinucleótidos de sustitución que pueden ser obtenidas de forma rutinaria por el especialista en la técnica, sin una experimentación innecesaria, en base a las enseñanzas y las guías presentadas en la presente memoria. Para una descripción detallada de la química y la estructura de las proteínas véase Schulz, G.E. y col., *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag, Nueva York, 1978; y Creighton, T.E., *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, que se incorporan a la presente memoria a modo de referencia. Para una presentación de sustituciones de secuencia de nucleótidos, tal como preferencias de codones, véase Ausubel y col., ver arriba, en §§ A.1.1-A.1.24, y Sambrook y col., ver arriba, en Apéndices C y D.

Los cambios preferidos para muteínas de acuerdo con la presente invención son lo que se conoce como sustituciones "conservativas". Las sustituciones conservativas de aminoácidos de polipéptidos o proteínas de IL-18BP o de IL-18BPs víricas pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo que tiene propiedades fisicoquímicas suficientemente similares, de tal modo que la sustitución entre miembros del grupo conservará la función biológica de la molécula, Grantham, *Science*, Volumen 185, páginas 862-864 (1974). Está claro que también se pueden hacer inserciones y eliminaciones de aminoácidos en las secuencias anteriormente definidas sin alterar su función, particularmente si las inserciones o eliminaciones solamente implican unos pocos aminoácidos, por ejemplo, por debajo de treinta, y preferiblemente por debajo de diez, y no eliminan o desplazan aminoácidos que son críticos para una conformación funcional, por ejemplo, residuos de cisteína, Anfinsen, "Principles That Govern The Folding of Protein Chains", *Science*, Volumen 181, páginas 223-230 (1973). Las proteínas y muteínas producidas mediante dichas eliminaciones y/o inserciones entran dentro del ámbito de la presente invención.

ES 2 149 149 T3

Sin embargo, los residuos de cisteína que no son requeridos para la actividad biológica pueden ser reemplazados por otros residuos, por ejemplo con el fin de evitar la formación de puentes de disulfuro intra o intermoleculares no deseados que puedan provocar una reducción en la actividad de las IL-18BPs.

- 5 Preferiblemente, los grupos aminoácido sinónimos son los definidos en la Tabla I. Más preferiblemente, los grupos aminoácido sinónimos son los definidos en la Tabla II; y aún más preferiblemente los grupos aminoácido sinónimos son los definidos en la Tabla III.

10

TABLA I

Grupos Preferidos de Aminoácidos Sinónimos

15

Aminoácido	Grupo Sinónimo
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
20 Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
25 Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
30 Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys
35 His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
40 Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
45 Trp	Trp

50

55

60

65

ES 2 149 149 T3

Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Met

5
10 Los ejemplos de producción de sustituciones de aminoácidos en proteínas que pueden usarse para obtener muteínas de polipéptidos o proteínas de IL-18BP, o muteínas de IL-18BPs víricas, para su uso en la presente invención incluyen cualesquier etapas de método conocidas, tales como las presentadas en las Patentes de EE.UU. RE 33.653, 4.959.314, 4.588.585 y 4.737.462 a nombre de Mark y col.; 5.116.943 a nombre de Koths y col.; 4.965.195 a nombre de Namen y col.; 4.879.111 a nombre de Chong y col.; y las proteínas con lisina sustituida presentadas en la Patente de EE.UU. 15 N° 4.904.584 (Shaw y col.).

En otra realización preferida de la presente invención, cualquier muteína de una IL-18BP o de una IL-18BP vírica, tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde esencialmente a la de una IL-18BP, o a la de una IL-18BP vírica. La expresión “corresponde esencialmente” pretende comprender proteínas con cambios menores respecto a la 20 secuencia de la proteína natural que no afectan a las características básicas de las proteínas naturales, particularmente en la medida de su capacidad para unirse a IL-18. El tipo de cambios que generalmente se consideran dentro del lenguaje de “corresponde esencialmente” son aquellos que se producirían como resultado de técnicas convencionales de mutagénesis del ADN que codifica dichas proteínas, dando como resultado unas pocas modificaciones menores, y escrutando en busca de la actividad deseada del modo discutido anteriormente. Además de unirse a la IL-18, las 25 muteínas también modulan y/o bloquean la actividad de IL-18.

Las muteínas de acuerdo con la presente invención incluyen proteínas codificadas por un ácido nucleico, tal como ADN o ARN, que se hibrida con ADN o ARN, que codifica una IL-18BP o una IL-18BP vírica, de acuerdo con la presente invención, en condiciones de severidad. La invención también incluye dicho ácido nucleico, que también es 30 útil como sonda para la identificación y la purificación del ácido nucleico deseado. Además, dicho ácido nucleico sería un candidato a cebador para determinar si codifica un polipéptido, que retenga la actividad funcional de una IL-18BP de la presente invención. La expresión “condiciones de severidad” se refiere a condiciones de hibridación y posterior lavado, que los especialistas en la técnica denominan convenientemente “de severidad”. Véase Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, ver arriba, *Interscience N.Y.*, §§6.3 y 6.4 (1987, 1992), y Sambrook y col, ver arriba. 35 Sin limitación, los ejemplos de condiciones de severidad incluyen condiciones de lavado 12-20°C por debajo de la T_m calculada para el híbrido en estudio, por ejemplo, 2 x SSC y 0,5% SDS durante 5 minutos, 2 x SSC y 0,1% SDS durante 15 minutos; 0,1 x SSC y 0,5% SDS a 37°C durante 30-60 minutos y a continuación, 0,1 x SSC y 0,5% SDS a 68°C durante 30-60 minutos. Los especialistas en la técnica comprenderán que las condiciones de severidad también dependen de la longitud de las secuencias de ADN, de las sondas de oligonucleótidos (tal como 10-40 bases) o de las 40 sondas de oligonucleótidos mixtos. Si se usan sondas mixtas, es preferible usar cloruro de tetrametilamonio (TMAC) en lugar de SSC. Véase *Ausubel*, ver arriba.

La invención incluye además ácidos nucleicos que codifican para IL-18BP de acuerdo con la presente invención, pero que difieren en la secuencia de codón debido a la degeneración del código genético. Dicho ADN, que posible- 45 mente no se hibrida en condiciones de severidad con las secuencias de ADN mostradas en las Figuras 4 a 7, pero que aún así es capaz de codificar una IL-18BP de acuerdo con la presente invención también es abarcado por la invención.

La expresión “proteína fusionada” se refiere a un polipéptido que comprende una IL-18BP, o una muteína de la misma, fusionada con otra proteína que, por ejemplo, tiene un tiempo de residencia extendido en los fluidos corporales. 50 Por tanto, una muteína puede estar fusionada a otra proteína, polipéptido o similar, por ejemplo, una inmunoglobulina o un fragmento de la misma. También puede estar fusionada a polietilenglicol (PEG) a fin de prolongar el tiempo de residencia.

El término “sales” se refiere en la presente memoria tanto a sales de grupos carboxílicos como a sales ácidas de adición de grupos amino de una IL-18BP, muteínas o proteínas fusionadas de la misma. Las sales de un grupo 55 carboxílico pueden formarse por medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, férricas o de zinc, y otras similares, y sales con bases orgánicas como las formadas, por ejemplo, con aminas, tales como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y similares. Las sales ácidas de adición incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales 60 con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Por supuesto, cualquier sal debe tener una actividad sustancialmente similar a la IL-18BP.

“Derivados modificados químicamente”, tal como se usa en la presente memoria, cubre derivados de IL-18BPs y sus muteínas y proteínas fusionadas, que pueden prepararse por ejemplo a partir de grupos funcionales que se presen- 65 tan como cadenas laterales en los residuos o los grupos N- ó C-terminales, por medios conocidos en la técnica, y que se incluyen en la invención siempre que sean farmacéuticamente aceptables, es decir que no destruyan la actividad de la proteína que es sustancialmente similar a la actividad de la IL-18BP, y no confieran propiedades tóxicas a las

ES 2 149 149 T3

composiciones que las contengan. Estos derivados pueden, por ejemplo, incluir cadenas laterales de polietilenglicol, que pueden enmascarar sitios antigénicos y prolongar la residencia de una IL-18BP en los fluidos corporales. Otros derivados incluyen ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxilo por reacción con amoníaco o con aminas primarias o secundarias, derivados de N-acilo de grupos amino libres de los residuos de aminoácido formados con restos de acilo (por ejemplo, grupos alcanilo o aroilo carbocíclicos) o derivados O-acilo de grupos hidroxilo libres (por ejemplo los de residuos de serilo o treonilo) formados con restos acilo.

La expresión “derivados permutados circularmente” tal como se usa en la presente memoria se refiere a una molécula lineal en la que los extremos han sido unidos, bien directamente o bien a través de un ligando, para producir una molécula circular, y a continuación la molécula circular es abierta en otra localización para producir una nueva molécula lineal con extremos diferentes a los extremos de la molécula original. Las permutaciones circulares incluyen aquellas moléculas cuya estructura es equivalente a una molécula que ha sido ciclada y después abierta. Por tanto, una molécula permutada circularmente puede ser sintetizada desde cero como una molécula lineal y nunca sufrir una etapa de ciclación y apertura. La preparación de derivados permutados circularmente se describe en el documento WO95/27732.

Varias células recombinantes tales como células procarióticas, por ejemplo *E. coli*, u otras células eucarióticas, tales como levadura o células de insecto pueden producir IL-18BPs. Los métodos para construir vectores apropiados, que porten ADN que codifica para una IL-18BP y adecuados para transformar (por ejemplo, *E. coli*, células de mamífero y células de levadura); o infectar células de insecto con el objetivo de producir una IL-18BP recombinante son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Ausubel y col., editores, “Current Protocols in Molecular Biology” *Current Protocols*, 1993; y Sambrook y col., eds. “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 2ª edición, Cold Spring Harbor Press, 1989.

Para los propósitos de expresión de proteínas de IL-18BP, se inserta ADN que codifica una IL-18BP, muteínas o proteínas fusionadas, y las señales reguladoras de la traducción y la transcripción ligadas operativamente, en vectores que son capaces de integrar las secuencias génicas deseadas en el cromosoma celular hospedante. Con el fin de ser capaz de seleccionar las células que han integrado de forma estable el ADN introducido en sus cromosomas, se usa uno o más marcadores que permiten la selección de células hospedantes que contienen el vector de expresión. El marcador puede proporcionar prototrofia a un hospedante auxotrópico, resistencia biocida, por ejemplo, antibióticos, o resistencia a metales pesados, tal como cobre o similar. El gen marcador seleccionable puede estar ligado directamente a las secuencias génicas de ADN que se van a expresar, o puede introducirse en la misma célula mediante cotransfección. También pueden necesitarse elementos adicionales para una síntesis óptima de ARNm de proteína de unión de cadena sencilla. Dichos elementos pueden incluir señales de división, así como promotores de la transcripción, potenciadores y señales de terminación.

Dicha molécula de ADN que se va a introducir en las células seleccionadas preferiblemente será incorporada en un plásmido o vector vírico capaz de replicación autónoma en el hospedante receptor. Los plásmidos procarióticos preferidos son los derivados de pBr322. Los vectores eucarióticos preferidos incluyen BPV, vaccinia, SV40, círculo de 2 micras, etc., o sus derivados. Dichos plásmidos y vectores son bien conocidos en la técnica (2-5, 22). Una vez que el vector o la secuencia de ADN que contiene la(s) construcción(es) ha sido preparado para expresión, el vector de expresión puede ser introducido en una célula hospedante apropiada mediante cualquiera de una serie de medios adecuados, tales como transformación, transfección, lipofección, conjugación, fusión de protoplasto, electroporación, precipitación de fosfato cálcico, microinyección directa, etc.

Las células hospedantes que se van a usar en la presente invención pueden ser procarióticas o eucarióticas. Los hospedantes procarióticos preferidos incluyen bacterias tales como *E. coli*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, etc. El hospedante procariótico más preferido es *E. coli*. Los hospedantes bacterianos de interés particular incluyen la cepa 294 de *E. coli* K12 (ATCC 31446), *E. coli* X1776 (ATCC 31537), *E. coli* W3110 (F⁻, lambda⁻, fototrópico, ATCC 27325). En dichas condiciones, la proteína no será glicosilada. El hospedante procariótico debe ser compatible con la réplica y con las secuencias de control del plásmido de expresión.

Sin embargo, puesto que las IL-18BPs naturales son proteínas glicosiladas, se prefieren los hospedantes eucarióticos sobre los procarióticos. Los hospedantes eucarióticos preferidos son células de mamífero, por ejemplo, células humanas, de mono, de ratón y células de ovario de hámster Chino (CHO), debido a que proporcionan modificaciones post-traducción a las moléculas proteicas que incluyen un correcto plegado, una correcta formación de enlaces de disulfuro, así como una glicosilación en las posiciones correctas. Asimismo, las células de insecto y de levadura pueden llevar a cabo modificaciones de péptido post-traducción que incluyen la glicosilación de manosa superior.

Existe una serie de estrategias de ADN recombinante que utilizan secuencias de promotor fuertes y un elevado número de copias de plásmidos, que pueden utilizarse para la producción de las proteínas deseadas en células de levadura y de insecto. Las células de levadura y de insecto reconocen secuencias líderes en productos génicos de mamíferos clonados y secretan IL-18BP madura. Tras la introducción del vector, las células hospedantes son cultivadas en un medio selectivo, que selecciona en función del crecimiento de células que contienen vector. La expresión de la(s) secuencia(s) génica(s) clonada(s) da como resultado la producción de una IL-18BP, proteínas de fusión o muteínas de la misma. Los procedimientos de clonación, aislamiento de clones, identificación, caracterización y secuenciamiento mencionados anteriormente se describen con más detalle a continuación en los Ejemplos.

ES 2 149 149 T3

Las proteínas expresadas son aisladas y purificadas a continuación mediante cualquier procedimiento convencional que implica extracción, precipitación, cromatografía, electroforesis, o similar, o mediante cromatografía de afinidad, por ejemplo usando anticuerpos monoclonales anti-IL-18BP inmovilizados sobre una matriz de gel contenida en el interior de una columna. Las preparaciones sin purificar que contienen dicha IL-18BP recombinante se hacen pasar a través de la columna, mediante lo cual la IL-18BP queda ligada a la columna a través del anticuerpo específico a la vez que las impurezas pasan de largo. Después de lavar, la proteína es eluida del gel en las condiciones empleadas habitualmente para este propósito, es decir a un alto o un bajo pH, por ejemplo pH 11 ó pH 2.

La invención se refiere además a vectores útiles para la expresión de una IL-18BP o sus derivados en mamíferos y más específicamente en humanos. Los vectores para la expresión a corto y largo plazo de genes en mamíferos son bien conocidos en la bibliografía. Algunos estudios han demostrado que la administración de genes a, por ejemplo, músculo esquelético, músculo liso vascular e hígado da como resultado niveles sistémicos de proteínas terapéuticas. El músculo esquelético es una diana útil debido a su gran masa, vascularidad y accesibilidad. Sin embargo, otras dianas y particularmente precursores de médula ósea de células inmunes han sido usados con éxito. Los vectores actualmente disponibles para la expresión de proteínas en por ejemplo músculo incluyen ADN plásmido, liposomas, conjugados proteína-ADN y vectores basados en adenovirus, virus adeno-asociados y virus del herpes. Entre ellos, los vectores basados en virus adeno-asociados (AAV) han sido los más útiles con respecto a la duración y a los niveles de expresión génica y con respecto a las consideraciones de seguridad (Kessler, P.D. 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 14082-14087).

Los procedimientos para la construcción de un vector basado en AAV han sido descritos con detalle (Snyder y col., 1996, Current Protocols in Human Genetics, Capítulos 12.1.1-12.1.17, John Wiley & Sons) y se incorporan a esta patente. En resumen, el plásmido psub201, que contiene el genoma de AAV natural, es cortado con la enzima de restricción Xba I y ligado con una construcción que consiste en un promotor eucariótico eficiente, por ejemplo, el promotor de citomegalovirus, una secuencia de consenso de Kozak, una secuencia de ADN que codifica para una IL-18BP o sus muteínas o proteínas de fusión, una región 3' no traducida adecuada y una señal de poliadenilación, por ejemplo la señal de poliadenilación del virus 40 de simio. El plásmido recombinante resultante es cotransfectado con un plásmido de AAV colaborador, por ejemplo pAAV/Ad en células de mamífero, por ejemplo células T293 humanas. A continuación los cultivos son infectados con adenovirus como virus colaborador y los sobrenadantes de los cultivos son recolectados después de 18-60 horas. Los sobrenadantes son fraccionados mediante precipitación de sulfato de amonio, purificados en un gradiente de densidad de CsCl, dializados y a continuación calentados hasta 56°C para destruir cualquier adenovirus, mientras que el AAV recombinante resultante, capaz de expresar IL-18BP o una IL-18BP vírica, o sus muteínas o proteínas de fusión, permanece estable en esta etapa.

Hasta el momento, no se ha establecido el papel fisiológico de los receptores de citoquinas solubles. Los receptores solubles se unen a sus ligandos específicos y en la mayoría de los casos inhiben su actividad biológica, tal como se demostró, por ejemplo, en el sistema TNF (11, 12). En muy pocos casos, por ejemplo la IL-6, el receptor soluble potencia la actividad biológica. Se descubrió que el receptor TNF soluble recombinante, también conocido como TBP (proteína de unión de TNF), prevenía el choque séptico en modelos de animales, mientras que las formas solubles del receptor IL-1 tenían efectos profundamente inhibidores sobre el desarrollo de aloreactividad *in vivo* en receptores de aloinjertos de ratón.

De formar similar, las IL-18BPs y las IL-18BPs víricas de la presente invención pueden encontrar un uso como modulares de la actividad de IL-18, por ejemplo en la diabetes de tipo I, en la sepsis, en enfermedades autoinmunes, en rechazos de injertos, en artritis reumatoide, en la enfermedad inflamatoria del intestino, sepsis, esclerosis múltiple, enfermedad cardíaca isquémica que incluye los ataques agudos al corazón, lesiones cerebrales isquémicas, hepatitis crónica, soriasis, hepatitis crónica y hepatitis aguda. Por tanto pueden usarse, por ejemplo, en cualquier enfermedad en la que la producción endógena o la administración exógena de IL-18 induzcan la enfermedad o agrave la situación del paciente.

La presente invención se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y una IL-18BP o una IL-18BP vírica de la invención, o sus muteínas, proteínas fusionadas y sus sales o sus derivados modificados químicamente, activos.

La presente invención se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y, por ejemplo, un vector vírico tal como uno cualquiera de los vectores víricos basados en AAV mencionados, u otro vector que exprese una IL-18BP o sus muteínas o proteínas de fusión, y que sea adecuado para la administración a humanos y otros mamíferos para el propósito de alcanzar la expresión *in vivo* de IL-18BP o sus muteínas o fragmentos o proteína de fusión de la invención, es decir para su uso en terapia génica.

Las composiciones farmacéuticas de la invención están preparadas para administración mediante mezclamiento de una IL-18BP o una IL-18BP vírica, o sus derivados, o vectores para expresar las mismas con vehículos fisiológicamente aceptables, y/o estabilizantes y/o excipientes, y se preparan en formas dosificables, por ejemplo, mediante liofilización en viales de dosificación. El método de administración puede ser mediante cualquiera de los modos aceptados de administración para agentes similares y dependerá de la afección que se vaya a tratar, por ejemplo, intravenosamente, intramuscularmente, subcutáneamente, mediante inyección local o aplicación tópica, o continuamente mediante infusión, etc. La cantidad de compuesto activo a administrar dependerá de la ruta de administración, de la enfermedad que va a ser tratada y de la condición del paciente. La inyección local, por ejemplo, requerirá una menor cantidad de la proteína en relación al peso corporal que la infusión intravenosa.

Por consiguiente, las IL-18BPs, o las IL-18BPs víricas, o los vectores que las expresan *in vivo*, están indicados para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, diabetes de Tipo I, artritis reumatoide, rechazos de injertos, enfermedad inflamatoria del intestino, sepsis, esclerosis múltiple, enfermedad cardíaca isquémica que incluye ataques agudos al corazón, lesiones cerebrales isquémicas, hepatitis crónica, soriasis, pancreatitis crónica y pancreatitis aguda, y enfermedades similares, en las que se produce una expresión aberrante de IL-18 que conduce a un exceso de IL-18, o en casos de complicaciones debidas a IL-18 administrada exógenamente.

La invención también incluye anticuerpos contra una IL-18BP. El término “anticuerpo” pretende incluir anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (MAbs), anticuerpos quiméricos, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) de anticuerpos que pueden ser marcados en forma soluble o ligada, y anticuerpos humanizados, así como fragmentos de los mismos, proporcionados mediante cualquier técnica conocida tal como ruptura enzimática, síntesis de péptidos o técnicas recombinantes, aunque sin limitarse a ellas.

Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpos derivadas de sueros de animales inmunizados con un antígeno. Un anticuerpo monoclonal contiene una población sustancialmente homogénea de anticuerpos específicos de antígenos, población que contiene posiciones de unión de epítomos sustancialmente similares. Los MAbs se pueden obtener mediante métodos conocidos por los especialistas en la técnica. Véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495-497 (1975); Patente de EE.UU. N° 4.376.110; Ausubel y col., eds., ver arriba, Harlow y Lane, *ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); y Colligan y col., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. y Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), cuyos contenidos completos se incorporan a la presente memoria a modo de referencia. Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, GILD y cualquier subclase de las mismas. Se puede cultivar un hibridoma que produzca un Mab de la presente invención *in vitro*, *in situ* o *in vivo*. La producción de altos títulos de MAbs *in vivo* o *in situ* hace de éste el método de producción preferido actualmente.

Los anticuerpos quiméricos son moléculas, de las cuales diferentes porciones derivan de diferentes especies animales, tal como las que tienen una región variable derivada de un MAb murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos quiméricos se usan principalmente para reducir la inmunogenicidad aplicada y para aumentar los rendimientos de producción, por ejemplo, cuando los MAbs murinos tienen rendimientos elevados a partir de hibridomas pero una mayor inmunogenicidad en humanos, de tal modo que se usan MAbs quiméricos humano/murino. Los anticuerpos quiméricos y los métodos para su producción son conocidos en la técnica (Cabilly y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3273-3277 (1984); Morrison y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855 (1984); Boulianne y col., *Nature* 312: 643-646 (1984); Cabilly y col., Solicitud de Patente Europea 125023 (publicada el 14 de noviembre de 1984); Neuberger y col., *Nature* 314: 268-270 (1985); Taniguchi y col., Solicitud de Patente Europea 171496 (publicada el 19 de febrero de 1985); Morrison y col., Solicitud de Patente Europea 173494 (publicada el 5 de marzo de 1986); Neuberger y col., Solicitud PCT WO 8601533 (publicada el 13 de marzo de 1986); Kudo y col., Solicitud de Patente Europea 184187 (publicada el 11 de junio de 1986); Morrison y col., Solicitud de Patente Europea 173494 (publicada el 5 de marzo de 1986); Sahagan y col., *J. Immunol.* 137: 1066-1074 (1986); Robinson y col., Publicación de Patente Internacional WO 9702671 (publicada el 7 de mayo de 1987); Liu y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3439-3443 (1987); Sun y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 214-218 (1987); Better y col., *Science* 240: 1041-1043 (1988); y Harlow y Lane, *ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL*, ver arriba. Estas referencias se incorporan por completo a la presente memoria a modo de referencia.

Un anticuerpo anti-idiotípico (anti-Id) es un anticuerpo que reconoce generalmente determinantes únicos, asociados con la posición de unión de antígenos de un anticuerpo. Se puede preparar un anticuerpo Id inmunizando a un animal de la misma especie y tipo genético (por ejemplo, cepa de ratón) como fuente del MAb con el MAB del que se está preparando un anti-Id. El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante produciendo un anticuerpo para dichos determinantes idiotípicos (el anticuerpo anti-Id). Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 4.699.880, que se incorpora al completo a la presente memoria modo de referencia.

El anticuerpo anti-Id también puede usarse como “inmunógeno” para inducir una respuesta inmune en otro animal, produciendo el denominado anticuerpo anti-anti-Id. El anti-anti-Id puede ser epitópicamente idéntico al MAB original que indujo el anti-Id. Por tanto, usando anticuerpos de los determinantes idiotípicos de un MAB, es posible identificar otros clones que expresen anticuerpos de especificidad idéntica.

Por consiguiente, los MAbs generados contra IL-18BP y proteínas relacionadas de la presente invención pueden usarse para inducir anticuerpos anti-Id en animales adecuados, tales como ratones BALB/c. Las células de bazo de dichos ratones inmunizados son usadas para producir hibridomas anti-Id que secretan MAbs anti-Id. Además, los MAbs anti-Id pueden acoplarse a un vehículo tal como hemocianina de lapa de ojo de herradura (KLH) y usarse para inmunizar otros ratones BALB/c. Los sueros de estos ratones contendrán anticuerpos anti-anti-Id que tienen las propiedades de unión del MAB original específico de un epítomo o epítomos de IL-18BP o de una IL-18BP vírica.

Por tanto, los MAbs anti-Id tienen sus propios epítomos idiotípicos, o “idiótopos” que fueron obtenidos manipulando anticuerpos de ratón mediante métodos de ingeniería genética para ser más compatibles con el cuerpo humano. Dichos anticuerpos humanizados presentan una inmunogenicidad reducida y una farmacocinética mejorada en humanos. Pueden prepararse mediante técnicas conocidas en la técnica, tal como se describe, por ejemplo, para anticuerpos anti-TNF humanizados en *Molecular Immunology*, Vol. 30, N° 16, páginas 1443-1453, 1993.

ES 2 149 149 T3

El término “anticuerpo” también pretende incluir tanto moléculas intactas como fragmentos de las mismas, tales como, por ejemplo, Fab y F(ab')₂, que son capaces de unirse a antígeno. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación, y pueden presentar menos unión a tejido no específico que un anticuerpo intacto (Wahl y col., *J. Nucl. Med.* 24: 316-325 (1983)). Cabe destacar que el Fab y el F(ab')₂ y otros fragmentos de los anticuerpos útiles en la presente invención pueden usarse para la detección y la cuantificación de una IL-18BP o una IL-18BP vírica, de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria para moléculas de anticuerpos intactas. Dichos fragmentos se producen típicamente mediante ruptura proteolítica, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂).

Se dice que un anticuerpo es “capaz de unirse” a una molécula si es capaz de reaccionar específicamente con la molécula para unir de este modo la molécula al anticuerpo. El término “epítipo” pretende referirse a la porción de cualquier molécula capaz de ser ligada por un anticuerpo que también puede ser reconocida por dicho anticuerpo. Los epítipos o “determinantes antigénicos” normalmente consisten en agrupamientos superficiales de moléculas activas químicamente tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares, y tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

Un “antígeno” es una molécula o una porción de una molécula capaz de ser ligada por un anticuerpo que adicionalmente es capaz de inducir a un animal a producir anticuerpos capaces de unirse a un epítipo de dicho antígeno. Un antígeno puede tener uno o más de un epítipo. La reacción específica mencionada antes pretende indicar que el antígeno reaccionará, de un modo altamente selectivo, con su correspondiente anticuerpo y no con la multitud de otros anticuerpos que pueden ser suscitados por otros antígenos.

Los anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpos, útiles en la presente invención pueden usarse para detectar cuantitativamente o cualitativamente una IL-18BP en una muestra o para detectar la presencia de células que expresan dichas proteínas de la presente invención. Esto puede llevarse a cabo mediante técnicas de inmunofluorescencia empleando un anticuerpo marcado fluorescentemente (véase más adelante) acoplado con detección microscópica de luz, detección citométrica de flujo o detección fluorométrica.

Los anticuerpos (o fragmentos de los mismos) útiles en la presente invención pueden emplearse histológicamente, como en microscopía de inmunofluorescencia o inmunoelectrónica, para la detección *in situ* de una IL-18BP. La detección *in situ* puede llevarse a cabo extrayendo un espécimen histológico de un paciente, y proporcionando un anticuerpo marcado de la presente invención a dicho espécimen. El anticuerpo (o fragmento) se proporciona preferiblemente aplicando o cubriendo con el anticuerpo (o fragmento) marcado una muestra biológica. Mediante el uso de dicho procedimiento, es posible determinar no solo la presencia de una IL-18BP sino también su distribución en el tejido examinado. Usando la presente invención, los especialistas en la técnica percibirán fácilmente que se puede modificar cualquiera de una amplia variedad de métodos histológicos (tal como procedimientos de tinción) con el objetivo de lograr dicha detección *in situ*.

Dichos ensayos para una IL-18BP normalmente comprenden incubar una muestra biológica, tal como un fluido biológico, un extracto de fluido, células recién cosechadas tales como linfocitos o leucocitos, o células que han sido incubadas en cultivo de tejido, en presencia de un anticuerpo marcado de forma detectable capaz de identificar IL-18BP y de detectar el anticuerpo por medio de cualquiera de una serie de técnicas bien conocidas en la técnica.

La muestra biológica puede ser tratada con un soporte o vehículo de fase sólida tal como nitrocelulosa, u otro soporte o vehículo sólido que sea capaz de inmovilizar células, partículas celulares o proteínas solubles. El soporte o vehículo puede ser lavado entonces con tampones adecuados y ser tratado con un anticuerpo marcado de forma detectable de acuerdo con la presente invención. El soporte o vehículo de fase sólida puede ser lavado entonces con el tampón una segunda vez para eliminar los anticuerpos no ligados. La cantidad de marca ligada sobre dicho soporte o vehículo sólido puede ser detectada a continuación empleando medios convencionales.

Por “soporte de fase sólida”, “vehículo de fase sólida”, “soporte sólido”, “vehículo sólido”, “soporte” o “vehículo” se entiende cualquier soporte o vehículo capaz de ligar antígeno o anticuerpos. Los soportes o vehículos bien conocidos incluyen vidrio, polipropileno, poliestireno, polietileno, dextrano, amilasas de nylon, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, gabros y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble en cierta medida o insoluble para los propósitos de la presente invención. El material soporte puede tener virtualmente cualquier configuración estructural siempre que la molécula acoplada sea capaz de unirse a un antígeno o anticuerpo. Por tanto, la configuración del soporte o vehículo puede ser esférica, como en una perla, o cilíndrica, como en la superficie interior de un tubo de ensayo, o en la superficie exterior de una varilla. De forma alternativa, la superficie puede ser plana, tal como una hoja, tira de ensayo, etc. Los soportes o vehículos preferidos incluyen perlas de poliestireno. Los especialistas en la técnica conocerán otros muchos vehículos adecuados para ligar anticuerpos o antígenos, o serán capaces de determinar los mismos mediante el uso de experimentación rutinaria.

La actividad de unión de un lote dado de anticuerpos de acuerdo con la presente invención puede determinarse de acuerdo con métodos bien conocidos. Los especialistas en la técnica serán capaces de determinar las condiciones de ensayo operativas y óptimas para cada determinación empleando experimentación rutinaria.

Se pueden añadir otras etapas tales como lavado, agitación, movimiento, filtración y similares, a los ensayos, según sea habitual o necesario en la situación particular.

Uno de los ensayos en los que un anticuerpo de acuerdo con la presente invención puede ser marcado de forma detectable es mediante la unión del mismo a una enzima y su uso en un inmunoensayo enzimático (EIA). Dicha enzima, a su vez, cuando se expone después a un sustrato apropiado, reaccionará con el sustrato de tal modo que producirá un resto químico que puede ser detectado, por ejemplo, por medio espectrofotométricos, fluorométricos o visuales. Las enzimas que pueden usarse como marca detectable del anticuerpo incluyen, aunque sin limitación, malato deshidrogenasa, nucleasa estafilococal, delta-5-esteroide isomerasa, deshidrogenasa de alcohol de levadura, alfa-glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinaesterasa. La detección puede llevarse a cabo mediante métodos colorimétricos, que emplean un sustrato cromogénico para la enzima. La detección también puede llevarse a cabo mediante comparación visual de la extensión de la reacción enzimática de un sustrato en comparación con patrones preparados de forma similar.

La detección se puede llevar a cabo usando cualquiera de una serie de inmunoensayos adicionales. Por ejemplo, marcando con radiactividad los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpo es posible detectar una IL-18BP mediante el uso de un radioinmunoensayo (RIA). Una buena descripción de RIA puede encontrarse en *Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology*, por Work, T.S. y col., North Holland Publishing Company, NY (1978) con referencia particular al capítulo titulado "An Introduction to Radioimmuno Assay and Related Techniques" por Chard, T. incorporado aquí a modo de referencia. El isótopo radioactivo puede ser detectado por medios como el uso de un contador gamma o un contador de centelleo o mediante autorradiografía.

También es posible marcar un anticuerpo de acuerdo con la presente invención con un compuesto fluorescente. Cuando el anticuerpo marcado fluorescentemente es expuesto a una luz con la longitud de onda apropiada, su presencia puede ser detectada debido a la fluorescencia. Entre los compuestos marcadores fluorescentes usados más habitualmente se encuentran el isotiocianato de fluoresceína, la rodamina, la ficoeritrina, la ficocianina, la aloficocianina, el o-ftalaldehído y la fluorescamina.

El anticuerpo también puede ser marcado de forma detectable usando metales que emiten fluorescencia tal como ¹⁵²Eu, u otros de la serie de los lantánidos. Estos metales pueden unirse al anticuerpo usando grupos quelantes de metales tales como el ácido dietilentriamino pentaacético (ETPA).

El anticuerpo también puede ser marcado de forma detectable acoplándolo a biotina. El anticuerpo biotinilado puede ser detectado mediante avidina o estreptoavidina acopladas a un compuesto fluorescente o a una enzima tal como peroxidasa o a un isótopo radioactivo y similar.

El anticuerpo también puede ser marcado de forma detectable acoplándolo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo marcado quimioluminiscentemente se determina a continuación detectando la presencia de la luminiscencia producida durante el curso de una reacción química. Los ejemplos de compuestos marcadores quimioluminiscentes particularmente útiles son el luminol, el isoluminol, el éster teromático de acridinio, el imidazol, la sal de acridinio y el éster de oxalato.

Igualmente, se puede usar un compuesto bioluminiscente para marcar el anticuerpo de la presente invención. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia que se da en sistemas biológicos en los que una proteína catalítica aumenta la eficacia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia. Compuestos bioluminiscentes importantes para los propósitos de marcado son la luciferina, la luciferasa y la aecuorina.

Una molécula de anticuerpo de la presente invención puede ser adaptada para su utilización en un ensayo inmunométrico, también conocido como ensayo "dos-sitios" o "sándwich". En un ensayo inmunométrico típico, se liga una cantidad de anticuerpo (o de fragmento de anticuerpo) no marcado a un soporte o vehículo sólido y se añade una cantidad de anticuerpo soluble marcado de forma detectable para permitir la detección y/o la cuantificación del complejo ternario formado entre el anticuerpo en fase sólida, el antígeno y el anticuerpo marcado.

Los ensayos inmunométricos típicos, y preferidos, incluyen ensayos "hacia delante" en los que el anticuerpo ligado a la fase sólida se pone en primer lugar en contacto con la muestra que está siendo evaluada para extraer el antígeno de la muestra mediante formación de un complejo binario anticuerpo-antígeno en fase sólida. Tras un periodo de incubación adecuado, el soporte o vehículo sólido es lavado para eliminar el residuo de la muestra de fluido, incluyendo el antígeno no reaccionado, si hay algo, y a continuación se pone en contacto con la disolución que contiene una cantidad desconocida de anticuerpo marcado (que actúa como "molécula informadora"). Tras un segundo periodo de incubación para permitir que el anticuerpo marcado forme un complejo con el antígeno ligado al soporte o vehículo sólido a través de un anticuerpo no marcado, el soporte o vehículo sólido es lavado una segunda vez para eliminar el anticuerpo marcado no reaccionado.

En otro tipo de ensayo "sándwich", que también puede ser útil con los antígenos de la presente invención, se usan los ensayos denominados "simultáneos" e "inversos". Un ensayo "simultáneo" implica una única etapa de incubación ya que el anticuerpo ligado al soporte o vehículo sólido y el anticuerpo marcado se añaden ambos a la muestra que se está evaluando al mismo tiempo. Después de que se haya completado la incubación, el soporte o vehículo sólido se lava para eliminar el residuo de muestra fluida y de anticuerpo marcado no acomplexado. La presencia de anticuerpo

ES 2 149 149 T3

marcado asociado al soporte o vehículo sólido se determina entonces como se haría en un ensayo de sándwich “hacia delante” convencional.

En el ensayo “inverso” se utiliza en primer lugar la adición progresiva de una disolución de anticuerpos marcados a la muestra fluida, seguida de la adición de anticuerpo no marcado ligado a un soporte o vehículo sólido después de un periodo de incubación adecuado. Después de una segunda incubación, la fase sólida es lavada de un modo convencional para liberarla del residuo de la muestra que está siendo evaluada y de la disolución de anticuerpos marcados no reaccionados. La determinación de anticuerpos marcados asociados a un soporte o vehículo sólido se determina entonces como en los ensayos “simultáneos” y “hacia delante”.

La presente invención también proporciona moléculas de ADN que codifican IL-18BP tal como se ha definido antes, vectores replicables que comprenden cualquier molécula de ADN de ese tipo, células hospedantes transformadas con dichos vehículos de expresión que incluyen células procarióticas y eucarióticas y hospedantes, preferiblemente células CHO. La invención también incluye un proceso para la producción de vectores de expresión que codifican para IL-18BP de la presente invención para el propósito de su expresión en humanos y otros mamíferos.

La invención también incluye un proceso para la producción de IL-18BP de la presente invención mediante el cultivo de una célula transformada de acuerdo con la presente invención, y la recuperación de la proteína codificada por la molécula de ADN y el vehículo de expresión dentro de dicha célula hospedante transformada.

Además del uso de una IL-18BP o de una IL-18BP vírica para modular la actividad de la IL-18, también se pueden emplear, por supuesto, para la purificación de la propia IL-18. Para este propósito, la IL-18BP o una IL-18BP vírica se acopla a una columna de afinidad y se hace pasar IL-18 sin purificar. Entonces se puede recuperar la IL-18 de la columna mediante, por ejemplo, elusión a pH bajo.

La invención se ilustrará ahora a través de los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1

Aislamiento de una proteína de unión de IL-18

Se acopló IL-18 de *E. coli* (2,5 mg, Peprotech, NJ) a Affigel-10 (0,5 mL, BioRad), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se empaquetó en una columna. Se cargaron proteínas urinarias sin purificar (concentradas por un factor de 1000, 500 mL) en la columna con un caudal de 0,25 mL/min. La columna fue lavada con 250 mL de NaCl 0,5 M en disolución salina tamponada con fosfato (PBS). A continuación las proteínas ligadas fueron eluidas con ácido cítrico 25 mM, pH 2,2 y benzamidina (1 mM), y fueron neutralizadas inmediatamente con Na₂CO₃ 1 M. Se recogieron fracciones de 1 mL. Las fracciones fueron analizadas mediante SDS-PAGE y tinción de plata. La proteína de unión de IL-18 eluyó en las fracciones 2-8 en forma de proteína de ~40.000 Dalton (Figura 1). La banda de ~40 kD, correspondiente a la IL-18BP, exhibió un color amarillo distintivo al someterse a tinción de plata. Las diversas fracciones fueron analizadas por reticulado con ¹²⁵I-IL-18, SDS-PAGE y autorradiografía como se describe en el Ejemplo 2. Se descubrió una proteína de unión de IL-18 en las fracciones 2-8, eluida de la columna de IL-18-agarosa (Figura 2).

Ejemplo 2

Reticulado de IL-18BP purificada por afinidad con IL-18 marcada

Se incubaron (70 minutos a 4°C) muestras (40 µL) de IL-18BP de la etapa de purificación por afinidad con ¹²⁵I-IL-18 (5.000.000 cpm). A continuación se añadió suberato de disuccinimidilo (DSS), disuelto en dimetil sulfóxido (Me₂SO, 20 mM), hasta una concentración final de 2 mM y se dejó reposar la mezcla durante 20 minutos a 4°C. Se detuvo la reacción mediante la adición de Tris-HCl 1 M pH 7,5, y NaCl 1 M hasta una concentración final de 100 mM. Se añadió una muestra de tampón que contenía Ditiotreitól (DTT, 25 mM final) y se analizaron las mezclas mediante SDS-PAGE (acrilamida al 7,5%) seguida de autorradiografía (Figura 2).

Se observó una banda específica con un peso molecular de 58 kD, que consistía probablemente en una proteína de ~40 kD reticulada con la ¹²⁵I-IL-18 de ~20 kD en fracciones eluidas de la columna de afinidad de IL-18 (bandas 2 y 3) pero no de la columna de lavado (banda 1), que contenían todas las demás proteínas urinarias no purificadas.

Ejemplo 3

Análisis de secuencia de proteínas

Las fracciones eluidas de la columna de afinidad del Ejemplo 1 fueron resueltas mediante SDS-PAGE (acrilamida al 10%) en condiciones no reductoras, fueron electropunteadas en una membrana de PVDF (Pro-Blot, Applied biosystems, EE.UU.). La membrana fue teñida con azul de coomassie, se escindió la banda de ~40 kD y fue sometida a

Ejemplo 4

La IL-18BP es una glicoproteína

5 Alícuotas (0,3 mL) de fracciones eluidas del Ejemplo 1 fueron purificadas aún más mediante cromatografía de exclusión de tamaño en una columna Superose 12 (1X30 cm, Pharmacia, Suecia). La columna fue pre-equilibrada y eluida con disolución salina tamponada con fosfato y azide de sodio (0,02%) con un caudal de 0,5 mL/min, y se recogieron fracciones de 1 minuto. La proteína de unión de IL-18 eluyó en las fracciones 20-25 como una proteína de ~40.000 Dalton, según pudo determinarse mediante SDS-PAGE y tinción de plata. Se hizo reaccionar una muestra que contenía la proteína de ~40.000 Dalton (fracción 23, 50 μ L, ~50 ng de proteína) con N-glicosidasa F (PNGase F, Biolab) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, la alícuota fue desnaturalizada por ebullición en presencia de SDS al 5% durante 10 minutos, 10x tampón G7 (2,5 μ L), NP-40 al 10% (2,5 μ L) y PNGase F (1 μ L), 1 h a 37°C. La muestra fue analizada mediante SDS-PAGE (acrilamida al 10%) en condiciones no reductoras y se comparó con IL-18BP no digerida de la misma fracción de Superose 12. Se descubrió que la banda de ~40 kD de la IL-18BP desaparecía de la fracción tratada con PNGase. Se obtuvieron nuevas bandas, correspondientes a 30 kD (justo por encima de la banda de PNGase) y a 20 kD. La eliminación de la banda de ~40 kD indica que dicha banda es una proteína N-glicosilada.

Ejemplo 5

Bloqueo de la actividad biológica de la IL-18 mediante IL-18BP

La capacidad de la IL-18BP aislada a partir de orina para bloquear la actividad de IL-18 fue determinada midiendo la producción inducida por IL-18 de IFN- γ en células mononucleares. La IL-18 induce IFN- γ cuando se añade junto con una baja concentración de LPS, IL-12, IL-2 u otros estimulantes. La actividad de IL-18 fue evaluada en esplenocitos murinos, en células mononucleares sanguíneas periféricas humanas (PBMC) y en la línea de células KG-1 humanas. Se prepararon células de bazo a partir de ratones sanos, fueron lavadas y suspendidas en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% a 5×10^6 células/mL. Se estimularon cultivos de 1,0 mL con LPS (bien con 0,5 ó con 1 μ g/mL) junto con IL-18 recombinante humana o murina (0,5 ó 5 ng/mL). La proteína de unión de IL-18 humana (0,5 ó 50 ng/mL) fue añadida a la IL-18 recombinante antes de ser añadida a células de bazo. Después de cultivar durante 24 h, las células de bazo fueron sometidas a tres ciclos de congelación (-70°C) y descongelación (temperatura ambiente), los desechos celulares fueron eliminados mediante centrifugación y los sobrenadantes fueron evaluados para determinar IFN- γ usando los kits ELISA para IFN- γ de ratón (Endogen). Tal como se muestra en la Figura 3A, la IL-18BP bloqueó la actividad de huIL-18 en esplenocitos murinos de un modo dependiente de la dosis. Por el contrario, a modo de control, el receptor soluble de interferón- α/β no tuvo ningún efecto. La actividad de IL-18 murina recombinante se vio inhibida de una forma similar por la IL-18BP, lo que sugiere que la IL-18BP reconoce IL-18 murina (Figura 3B). En esplenocitos murinos se induce IL-18 endógena por efecto de altas concentraciones de LPS, lo que conduce a la producción de IFN- γ . De hecho, la inducción de IFN- γ por LPS (10 μ g/mL) también se vio inhibida por la IL-18BP urinaria (Figura 3C). La concanavalina A (con A) activa células T para producir IFN- γ en ausencia de IL-18 (13). De hecho, la inducción de IFN- γ por Con A no se vio inhibida por IL-18BP incluso a altas concentraciones (Figura 3D). Esta observación demostró que la IL-18BP era un inhibidor específico de la bioactividad de la IL-18 más que un inhibidor no específico de la producción de IFN- γ . La IL-18BP también inhibió la actividad de la IL-18 humana en células KG-1 humanas inducida por una combinación de IL-18 y TNF- α (Figura 3E).

Los datos anteriores demuestran que la IL-18BP urinaria inhibe la actividad de IL-18 tanto humana como murina, según se ha determinado mediante co-inducción de IFN- γ en células mononucleares humanas y murinas. La concentración de IL-18BP que redujo la actividad de IL-18 en >90% fue comparable a la de la propia IL-18, lo que sugiere una elevada interacción de afinidad entre estas dos proteínas.

Ejemplo 6

Aislamiento de clones de ADNc que codifican para IL-18BP

Se transcribió inversamente el ARN total de células T de Jurkat (CRL 8163, American Type Culture Collection) con transcriptasa inversa SuperScript RNase H⁻ (Gibco-BRL) y cebadores aleatorios (Promega, Madison WI). Los fragmentos de ADNc resultantes fueron amplificados a continuación mediante PCR, usando polimerasa de ADN Taq (Sigma) y cebadores correspondientes al clon TIGR THC123801, nucleótidos 24-44 (sentido) y 500-481 (inversos). La amplificación se llevó a cabo en 30 ciclos de maduración (55°C, 2 minutos) y extensión (70°C, 1 minuto). Los productos PCR resultantes fueron resueltos mediante electroforesis de gel de agarosa (1%), fueron eluidos y clonados en vector de clonación pGEM-Teasy TA (Promega). El ADN de los clones individuales fue secuenciado con cebadores T7 y SP6.

El fragmento de 477 pb resultante fue marcado con ³²P mediante una imprimación aleatoria. Esta sonda se usó para escrutar varias bibliotecas genómicas y de ADNc humano. Los filtros de nitrocelulosa duplicados fueron levantados y se hibridó con la sonda a 60°C en un tampón que consistía en 6xSSC, 10x disolución de Denhardt, SDS al 0,1% y 100 μ g/mL de ADN de esperma de salmón. Los filtros fueron lavados y expuestos toda la noche a -80°C a película Kodak

ES 2 149 149 T3

XAR. Los clones doble-positivos fueron purificados en placa. Los plásmidos fueron escindidos de los clones λ pCEV9 y autoligados. Se aislaron clones de ADNc de otras bibliotecas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El análisis de secuencia de ADN automatizado de los clones aislados fue llevado a cabo con secuenciadores de modelo 373A y 377 (Applied Biosystems) usando cebadores sentido y antisentido. Se usaron los protocolos estándares para estos procedimientos de clonación (33).

Se escrutaron las siguientes bibliotecas: una biblioteca de ADNc de monocitos humanos, construida en vector de clonación λ pCEV9 (15), suministrada amablemente por T. Miki; una biblioteca de ADNc de células T leucémicas de Jurkat humanas, una biblioteca de ADNc de leucocitos sanguíneos periféricos humanos y una biblioteca de ADNc de bazo humano, todos de Clontech (Palo Alto, CA). Una biblioteca genómica de placenta humana en vector lambda FIX II fue suministrada por Stratagene (La Jolla, CA).

Todos los clones de ADNc obtenidos correspondieron a cuatro variantes de división de IL-18BP diferentes, y fueron caracterizados. Todas las variantes de división codificaban para proteínas secretadas solubles putativas. La más abundante (IL-18BP) tenía un marco de lectura abierto de 192 codones, que codifican para un péptido señal de 28 residuos de aminoácido seguidos de una IL-18BP putativa madura, cuyos primeros 40 residuos (SEC ID N°: 10) coincidieron perfectamente con la secuencia de proteína N-terminal de la IL-18BP urinaria (SEC ID N°: 2). La posición de los residuos de cisteína sugirió que este polipéptido pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig). Cada uno de los cuatro residuos Gln dentro de la IL-18BP madura constituía una posición de N-glicosilación potencial. Las otras tres variantes de división de la IL-18BP fueron significativamente menos abundantes.

Otro ADNc de IL-18BPb de 1 kb codificaba para una proteína madura de 85 residuos de aminoácido (SEC ID N°: 4). Una tercera variante, IL-18BPc, fue representada por un ADNc de 2,3 kb, que codifica para una IL-18BP madura de 169 residuos de aminoácido (SEC ID N°: 6). La cuarta variante, IL18BPd, codificó para una IL-18BP madura de 133 residuos de aminoácido (SEC ID N°: 8). Se produjo una división en exón en dos posiciones a lo largo del pro-ARNm. Estos eventos y un exón 5' adicional en la IL-18BPd dieron lugar a 3 UTRs 5' diferentes en los diversos clones de ADNc. Por tanto, es bastante posible que las diferentes variantes de IL-18BP puedan ser generadas en respuesta a distintas señales de regulación de la transcripción.

Hasta el momento no se ha encontrado ningún ADNc que codifique para un receptor con un dominio transmembrana.

Ejemplo 7

Construcción de un vector de expresión de mamífero, producción de IL-18BP recombinante, y evaluación de las actividades biológicas de IL-18BP recombinante

La región codificadora del ADNc de IL-18BPa fue amplificada mediante PCR con el cebador sentido 5' TATATC TAGAGCCACCATGAGACACAACCTGGACACCA.

y el cebador inverso:

5' ATATCTAGATTAATGATGATGATGATGATGACCCTGCTGCTGTGGACTGC.

Los productos PCR fueron cortados con Xba I y clonados en la posición Xba I del vector de expresión pEF-BOS (25), para dar lugar a pEF-BOS-IL-18BPa. Las construcciones fueron confirmadas mediante secuenciamiento de ADN.

Se incubaron cargas de 6×10^7 células COS7 en 1,4 mL de tampón TD, que contiene ADN de plásmido de pEF-BOS-IL-18BPa (10 μ g) y DEAE-dextrano (120 μ g) durante 30 minutos a temperatura ambiente, como se ha descrito previamente (35). A continuación las células fueron lavadas con DMEM -FBS al 10%, colocadas en placa durante 4 horas en DMEM-10, lavadas e incubadas durante 3-5 días en DMEM libre de suero. El medio de cultivo fue cosechado, concentrado en factor de 6 mediante ultrafiltración (corte en 10 kD) y se aisló la IL-18BP-His₆ en una columna Talon (Clontech) con imidazol como eluyente de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La reactividad inmunológica cruzada de la IL-18BP urinaria y de la expresada en COS7 fue determinada como se indica a continuación: la IL-18BP urinaria (5 μ g) fue marcada con ¹²⁵I mediante el procedimiento de cloramina T. Se mezclaron los sobrenadantes de células COS7 (250 μ L) (1 h, temperatura ambiente, volumen final 500 μ L) con el anticuerpo de IL-18BP urinaria, se diluyó 1:1000 en disolución salina tamponada con fosfato (PBS), Tween 20 al 0,05% y albúmina de suero bovino al 0,5% (Tampón de Lavado). A continuación se añadió IL-18BP marcada con ¹²⁵I (10⁶ cpm) y después de 1 h se añadió proteína G-sepharose (20 μ L). La mezcla fue suspendida (1,5 h, 4°C), a continuación las perlas fueron aisladas y lavadas 3x con Tampón de Lavado y una vez con PBS. Entonces las perlas fueron eluidas con un tampón de Muestra, resueltas mediante SDS-PAGE (acrilamida al 10%) en condiciones reductoras, seguido de autorradiografía.

ES 2 149 149 T3

La IL-18BPa apareció como una única banda en SDS-PAGE con tinción de plata en condiciones reductoras y no reductoras, y presentó la misma masa molecular aparente que la IL-18BP urinaria (datos no mostrados). El análisis de secuencia proteica de esta preparación reveló la misma secuencia N-terminal que la IL-18BP urinaria, lo que indica que esta última no fue degradada en su extremo N.

5

El análisis de inmunotinción de la IL-18BPa con anticuerpos elevados contra la IL-18BP urinaria reveló la misma banda de masa molecular que la de la proteína urinaria. Además, usando inmunoprecipitación seguida de SDS-PAGE y autorradiografía, la IL-18BPa fue capaz de desplazar a la ¹²⁵I-IL-18BP urinaria de su unión con el anticuerpo. Por tanto, la IL-18BPa corresponde estructuralmente con la IL-18BP urinaria.

10

La IL-18BPa sin purificar y purificada fue evaluada para determinar su capacidad para inhibir la actividad biológica de la IL-18. La IL-18BPa inhibió de un modo dependiente de la dosis la actividad de inducir IFN- γ de la IL-18 humana y de ratón en esplenocitos murinos, PBMC y en la línea celular humana KG-1 (Figura 9).

15

Los resultados de los diversos bioensayos, así como del ensayo de desplazamiento de movilidad (Ejemplo 8), demostraron que la inhibición de la actividad de IL-18 es una propiedad intrínseca de la IL-18BP clonada y no de alguna impureza acompañante de la IL-18BP urinaria, tal como el fragmento co-eluyente de la defensiva.

20 Ejemplo 8

Ensayos de desplazamiento de la movilidad electroforética

25

También se estudió el efecto de la IL-18BP urinaria y recombinante sobre la activación inducida por IL-18 de NF- κ B en células humanas KG-1. Se estimularon células humanas KG-1 (4×10^6 en 1 mL de RPMI) con huIL-18 (10 ng/mL) o con huIL-18 premezclada con una IL-18BP (20 minutos, temperatura ambiente). Después de 20 minutos a 37°C, las células fueron lavadas tres veces con PBS enfriado en hielo y fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido. Las partículas de células fueron resuspendidas en tres veces el volumen de células empaquetadas de tampón A (Tris 20 mM pH 7,6, NaCl 0,4 M, EDTA 0,2 mM, glicerol (20% en volumen), MgCl₂ 1,5 mM, ditioneitol 2 mM (DDT), PMSF 0,4 mM, Na₃VO₄, 2 μ g/mL de leupeptina, pepstatina y aprotinina). Los restos celulares fueron eliminados mediante centrifugación (15.000 x g, 15 minutos), se congelaron alícuotas del sobrenadante en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. Se determinó la concentración de proteínas mediante un ensayo de Bradford (Bio-Rad) usando albúmina de suero bovino como patrón. Se marcó un oligonucleótido de doble cadena correspondiente al elemento de unión NF- κ B (10 pmol, Promega) con [³²P]dCTP (300 Ci/mmol) y T4 polinucleótido quinasa (New England Biolabs). Los nucleótidos libres fueron eliminados mediante una columna de giro. Los extractos (10 μ g de proteína) de las células tratadas con IL-18 o con IL-18 más IL-18BP fueron incubados (15 minutos, temperatura ambiente) con la sonda marcada (3×10^4 cpm) junto con polydI.dC (500 ng, Pharmacia) y ADN de esperma de salmón desnaturalizado (100 ng, Sigma) en 20 μ L de un tampón que consistía en HEPES (pH 7,5, 10 mM), KCl 60 mM, MgCl₂ 1 mM, EDTA 2 mM, DTT 1 mM y glicerol (5% en volumen). A continuación las mezclas fueron cargadas en geles de poliacrilamida no desnaturalizante al 5%. Se llevó a cabo la electroforesis a 185 V en 0,5xTBE (Tris HCl 40 mM, ácido bórico 45 mM y EDTA 2,5 mM). Los geles fueron secados a vacío y autorradiografiados durante una noche a -80°C. Se descubrió que la IL-18 induce la formación del homodímero p50 de NF- κ B y del heterodímero p65/p50 de NF- κ B. La IL-18BP, tanto urinaria como recombinante, inhibió la activación de NF- κ B por la IL-18, según se determinó mediante un ensayo de desplazamiento de movilidad electroforética con extractos de células KG-1 ligadas a un oligonucleótido radiomarcado que corresponde con la secuencia de consenso de NF- κ B.

45

Ejemplo 9

50 *Expresión de IL-18BP en células de E. coli, levadura e insecto*

55

La IL-18BP también puede ser producida por otras células recombinantes tales como células procarióticas, por ejemplo, *E. coli*, u otras células eucarióticas, tales como células de levadura e insecto. Se dispone de métodos bien conocidos para construir vectores apropiados, que portan ADN que codifica para IL-18BP y adecuados para transformar células de *E. coli* y de levadura, o infectar células de insecto con el fin de producir IL-18BP recombinante. Para la expresión en células de levadura, el ADN que codifica para IL-18BP (Ejemplo 6) se corta y se inserta en los vectores de expresión adecuados para la transfección de células de levadura. Para la expresión en células de insecto, se inserta un ADN que codifica para IL-18BP en baculovirus y las células de insecto son infectadas con dicho baculovirus recombinante. Para la expresión en *E. coli*, el ADN que codifica para IL-18BP es sometido a mutagénesis dirigida a posición con los oligonucleótidos apropiados, de tal modo que se inserta un codón ATG justo antes del primer codón de la IL-18BP madura. Alternativamente, dicho ADN puede prepararse mediante PCR con cebadores sentido y anti-sentido adecuados. Las construcciones de ADNc resultantes son insertadas a continuación en vectores de expresión procarióticos construidos de forma apropiada empleando técnicas bien conocidas en la técnica (23).

65

ES 2 149 149 T3

Ejemplo 10

Construcción de vector de expresión adeno-asociado para la expresión in vivo de IL-18BP_a

5 Se construye un gen funcional que codifica para IL-18BP_a en base al plásmido pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA). El ADNc de IL-18BP con una secuencia de consenso Kodak en el extremo 5' es ligado en la posición Xba I de pcDNA3 de un modo que destruye la posición de restricción. Se insertan nuevas posiciones Xba I mediante mutagénesis dirigida a posición antes de la casete de neomicina (base 2151 de la secuencia pcDNA3 original). A continuación esta construcción es cortada con Xba I y el minigen de 4,7 kb resultante es insertado en la posición Xba I del plásmido psub201 tal como se ha descrito previamente (Snyder y col., 1996, Current Protocols in Human Genetics, Capítulos 12.1.1-12.1.17, John Wiley & Sons). El plásmido recombinante resultante es cotransfectado con el plásmido AAV colaborador pAAV/Ad en células T293 humanas. A continuación los cultivos son infectados con adenovirus como virus colaborador y las células son cosechadas después de 48-60 horas de incubación. Las células son sometidas a 3 ciclos de congelación-descongelación, los residuos celulares son eliminados por centrifugación y el sobrenadante se lleva a una saturación del 33% con sulfato de amonio. La mezcla es centrifugada a continuación y se precipita rAVV del sobrenadante llevando el sulfato de amonio al 50% de saturación. El virus es purificado con CsCl, dializado y finalmente calentado durante 15 minutos a 56°C para destruir cualquier adenovirus.

20 Ejemplo 11

Construcción de proteínas de fusión recombinantes de IL-18BP

25 La producción de proteínas que comprende IL-18BP fusionada a la región constante de cadena pesada de IgG2 puede llevarse a cabo como se indica a continuación: el ADN de IL-18BP es sometido a mutagénesis dirigida a posición con los oligonucleótidos apropiados de tal modo que se introduce una posición de restricción única inmediatamente antes y después de las secuencias codificadoras. Se somete a un plásmido que porta la región constante de cadena pesada de IgG2, por ejemplo pRKCO42Fc1(6), a una mutagénesis dirigida a posición similar para introducir la misma posición de restricción única tan cerca como sea posible de la Asp 216 de la cadena pesada de IgG1 de un modo que permita la traducción en fase de la proteína fusionada. Se prepara un fragmento de ADNds, que consiste en secuencias 5' no traducidas y que codifica para IL-18BP, mediante digestión en las posiciones de restricción únicas o 30 alternativamente mediante PCR con los cebadores diseñados apropiadamente. El pRKCD42Fc1 es digerido de forma similar para generar un fragmento grande que contenga el plásmido y las secuencias de IgG1. Los dos fragmentos son ligados a continuación para generar un nuevo plásmido, que codifica para un precursor de polipéptido que consiste en 35 IL-18BP y aproximadamente 227 aminoácidos C-terminales de la cadena pesada de IgG1 (región bisagra y dominios CH2 y CH3). El ADN que codifica las proteínas fusionadas puede ser aislado del plásmido mediante digestión con enzimas de restricción apropiadas y a continuación ser insertado en vectores de expresión procarióticos o eucarióticos eficaces.

40 Ejemplo 12

Producción de IL-18BPs modificadas químicamente

45 Con el fin de aumentar la vida media de las IL-18BPs en plasma, se pueden fabricar IL-18BPs modificadas químicamente con polietilenglicol (PEG). La modificación puede hacerse por reticulado del PEG con un residuo de cisteína de las moléculas de IL-18BP. Se pueden construir IL-18BPs mutantes que contengan un residuo de cisteína extra en el extremo amino, posiciones de glicosilación y el extremo carboxilo de cada IL-18BP. La mutagénesis puede llevarse a cabo mediante PCR usando oligonucleótidos que contengan la mutación deseada. Estas proteínas mutantes son expresadas del modo habitual conocido en la técnica. Se llevará a cabo la PEG-lación de estas proteínas y se determinará la actividad.

55 Ejemplo 13

Preparación de anticuerpos policlonales de IL-18BP

Se inyectó inicialmente a conejos subcutáneamente con 5 µg de una preparación pura de la IL-18BP urinaria, emulsificada en adyuvante completo de Freund. Tres semanas después, fueron inyectados de nuevo subcutáneamente con 5 µg de la preparación de IL-18BP en adyuvante de Freund incompleto. Se administraron otras dos inyecciones adicionales de IL-18BP como disolución en PBS en intervalos de 10 días. Los conejos fueron desangrados 10 días después de la última inmunización. Se siguió el desarrollo del nivel de anticuerpos mediante un radioinmunoensayo. Se mezcló IL-18BP marcada con ¹²⁵I (166.000 cpm) con varias disoluciones (1:50, 1:500, 1:5.000 y 1:50.000) del suero de conejo. Se añadió una suspensión de perlas de proteína-G agarosa (20 µL, Pharmacia) en un volumen total de 200 µL. Se dejó la mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente, a continuación las perlas fueron lavadas 3 veces y se contabilizó la radioactividad ligada. Se usó anticuerpo de conejo para leptina humana como control negativo. El título del antisuero de IL-18R estaba entre 1:500 y 1:5.000, mientras que el del control negativo era inferior a 1:50.

ES 2 149 149 T3

Ejemplo 14

Preparación de anticuerpos monoclonales de IL-18BP

5 Se inyecta en primer lugar a ratones Balb/C femeninos (de 3 meses de edad) 2 μg de IL-18BP purificada en una emulsión de adyuvante completo de Freund, y tres semanas después, subcutáneamente en adyuvante incompleto de Freund. Se administran tres inyecciones adicionales en intervalos de 10 días, subcutáneamente en PBS. Las últimas inyecciones se administran intraperitonealmente 4 y 3 días antes de la fusión al ratón que muestra el mayor título de unión determinado mediante IRIA (véase más adelante). La fusión se lleva a cabo usando la línea celular de mieloma
10 NSO/1 y linfocitos preparados a partir de nodos de bazo y linfáticos del animal como parejas de fusión. Las células fusionadas se distribuyen en placas de microcultivo y los hibridomas son seleccionados en DMEM suplementado con HAT y un suero de caballo al 15%. Los hibridomas que producen anticuerpos de IL-18BP son subclonados mediante el método de dilución limitante y son inyectados en ratones Balb/C que habían sido imprimados con pristano para la producción de ascites. Los isótopos de los anticuerpos son definidos con el uso de un kit ELISA comercialmente
15 disponible (Amersham, R.U.).

El escrutinio de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales anti-IL-18BP se lleva a cabo como se indica a continuación: se evalúan sobrenadantes de hibridoma para determinar la presencia de anticuerpos anti-IL-18BP mediante un radioinmunoensayo en fase sólida invertido (IRIA). Se recubren las placas ELISA (Dynatech Laboratories, Alexandria, VA) con IL-18BP_a-His₆ purificada con Talon (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$). Después de una incubación durante una noche a 4°C, las placas fueron lavadas dos veces con PBS que contenía BSA (0,5%) y Tween 20 (0,05%) y bloqueadas en disolución de lavado durante al menos 2 horas a 37°C. Se añaden los sobrenadantes de cultivo de hibridoma (100 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$) y las placas se incuban durante 4 horas a 37°C. Las placas son lavadas 3 veces y se añade un conjugado de peroxidasa de rábano de cabra-anti-ratón (HRP, Jackson Labs, 1:10.000, 100 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$) durante 2
25 horas a temperatura ambiente. Las placas son lavadas 4 veces y el color es desarrollado mediante ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenziazolin-6-sulfónico), Sigma) con H₂O₂ como sustrato. Las placas son leídas mediante un lector de ELISA automático. Las muestras que proporcionan una DO que es al menos 5 veces superior al valor del control negativo son consideradas positivas.

Ejemplo 15

Cromatografía de afinidad de IL-18BP con anticuerpos monoclonales

35 Los anticuerpos contra IL-18BP son utilizados para la purificación de IL-18BP mediante cromatografía de afinidad. El fluido ascítico que contiene el anticuerpo monoclonal secretado por el hibridoma se purifica mediante precipitación en sulfato amónico al 50% seguido de una diálisis intensiva contra PBS. Se ligan aproximadamente 10 mg de inmunoglobulinas a 1 mL de Affigel 10 (BioRad USA), tal como ha especificado el fabricante. Se cargan 250 mL de proteínas urinarias humanas (equivalentes a 250 L de orina sin purificar) en 0,5 mL de la columna de anticuerpos IL-18BP a 4°C con un caudal de 0,25 mL/minuto. La columna se lava con PBS hasta que no se detecta proteína en las aguas de lavado. La IL-18BP es eluida con tampón de ácido cítrico 25 mM, pH 2,2 (8 x 1 fracciones de volumen de columna) y es neutralizada inmediatamente mediante Na₂CO₃ 1 M. Se consigue una mayor purificación de esta preparación mediante cromatografía de exclusión de tamaño.

Ejemplo 16

Ensayo ELISA

50 Se recubren placas de microtitulación (Dynatech o Maxisorb, de Nunc) con anticuerpo monoclonal anti-IL-18BP (sobrenadante de hibridoma libre de suero o inmunoglobulinas de fluido ascítico) durante una noche a 4°C. Las placas son lavadas con PBS que contiene BSA (0,5%) y Tween 20 (0,05%) y se bloquean con la misma disolución durante al menos 2 horas a 37°C. Las muestras evaluadas son diluidas en la disolución de bloqueo y añadidas a los pocillos (100 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$) durante 4 horas a 37°C. A continuación las placas son lavadas 3 veces con PBS que contiene Tween
55 20 (0,05%) seguido de la adición de suero de conejo anti-IL-18BP (1:1000, 100 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$) para continuar con la incubación durante la noche a 4°C. Las placas son lavadas 3 veces y se añade un conjugado de peroxidasa de rábano de cabra-anti-conejo (HRP, Jackson Labs, 1:10.000, 100 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$) durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas 4 veces y el color se desarrolla mediante ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenziazolina-6-sulfónico), Sigma) con H₂O₂ como sustrato. Las placas son leídas mediante un lector ELISA automático.

Ejemplo 17

La IL-18BP humana no glicosilada es biológicamente activa

65 Se evaluó la IL-18BP_a recombinante purificada para determinar su capacidad para inhibir la actividad biológica de la IL-18. La IL-18BP_a inhibió de un modo dependiente de la dosis la actividad inductora de IFN- γ de la IL-18 humana y de ratón en esplenocitos humanos, PBMC y la línea celular KG-1 humana (Figura 9).

ES 2 149 149 T3

La IL-18BP_a que tiene un etiqueta de His₆ en el extremo C (1,5 µg, 50 µL) fue ajustada a pH 7,5 y mezclada con N-glicosidasa F (3 µL, 500.000 U/mL, PNGase F, New England Biolabs). La mezcla se incubó durante 24 horas a 37°C en condiciones no desnaturizantes. Se analizaron alícuotas de la muestra y de IL-18BP-His₆ mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras seguido de inmunotinción con anticuerpos de IL-18PB. Se descubrió que la banda de ~40 kD de la IL-18BP-His₆ desapareció en la fracción tratada con PNGase y se obtuvo una nueva banda de ~20 kD. La masa molecular del producto y la especificidad de la PNGase F indicó que la IL-18BP-His₆ quedó completamente desglucosilada.

La fracción tratada con PNGase, la IL-18BP-His₆ no digerida y la muestra de control que contenía PNGase en tampón fueron absorbidas por separado en perlas de Talon, fueron lavadas con tampón de fosfato y eluidas con imidazol (100 mM). Las fracciones eluidas fueron sometidas a bioensayo usando IL-18 humana (20 ng/mL), LPS (2 µg/mL) y esplenocitos murinos. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Muestra	IFN-γ (ng/mL)
Control	7,5
IL-18BP-His ₆ no digerida	0
IL-18BP-His ₆ tratada con PNGase	0

Por lo tanto, se concluye que la IL-18BP desglucosilada es biológicamente activa como modulador de la actividad de IL-18.

La anterior descripción de las realizaciones específicas revela la naturaleza general de la invención de tal modo que otros pueden, aplicando el conocimiento actual, modificar y/o adaptar fácilmente para diversas aplicaciones de dichas realizaciones específicas sin alejarse del concepto genérico, y, por tanto, dichas adaptaciones y modificaciones deberían, y así se pretende, englobarse dentro del significado y del alcance de equivalente de las realizaciones descritas. Debe entenderse que las expresiones y la terminología empleadas en la presente memoria se usan con propósitos descriptivos, y no limitativos.

Referencias

1. **Anderson**, D.M., y col., *A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. Nature*, 1997. **390** (6656): p. 175-179.
2. **Bollon**, D.P., y col. (1980) *J. Clin. Hematol. Oncol.* **10**: 39-48.
3. **Bolstein**, D., y col. (1982) *Miami Wint. Symp.* 19: 265-274.
4. **Broach**, J. R., en "The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Life Cycle and Inheritance", Cold Spring Harbor Laboratory, *Cold Spring Harbor, NY*, páginas 445-470 (1981).
5. **Broach**, J. R., (1982) *Cell* **28**: 203-204.
6. **Byrn** R. A. y col., 1990, *Nature* (Londres) **344**: 667-670.
7. **Car**, B. D., **V. M. Eng**, **B. Schnyder**, **L. Ozmen**, **S. Huang**, **P. Gallay**, **D. Heumann**, **M. Aguet** y **B. Ryffel**. 1994. Interferon gamma receptor deficient mice are resistant to endotoxic shock. *J. Exp. Med.* **179**: 1437-44. ISSN: 0022-1007.
8. **Chater**, K. F. y col., en "Sixth International Symposium on Actinomycetales Biology", *Akademiai Kaido*, Budapest, Hungría (1986), páginas 45-54.
9. **Conti**, B., **J. W. Jahng**, **C. Tinti**, **J. H. Son** y **T. H. Joh**. 1997. Induction of interferon-gamma inducing factor in the adrenal cortex. *J. Biol. Chem.* **272**: 2035-2037.
10. **Dao**, T., **K. Ohashi**, **T. Kayano**, **M. Kurimoto** y **H. Okamura**. 1996. Interferon-gamma-inducing factor, a novel cytokine, enhances Fas ligand-mediated cytotoxicity of murine T helper 1 cells. *Cell-Immunol.* **173**: 230-5. ISSN: 0008-8749.
11. **Engelmann**, H., **D. Aderka**, **M. Rubinstein**, **D. Rotman** y **D. Wallach**. 1989. A tumor necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity. *J. Biol. Chem.* **264**: 11974-11980.

ES 2 149 149 T3

12. **Engelmann, H., D. Novick y D. Wallach.** 1990. Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors. *J. Biol. Chem.* **265**: 1531-1536.
- 5 13. **Fantuzzi, G., y col.,** *IL-18 regulation of IFN-g production and cell proliferation as revealed in interleukin-1b converting enzyme-deficient mice.* *Blood*, 1998. **91**: páginas 2118-2125.
14. **Gryczan, T.,** "The Molecular Biology of the Bacilli", *Academic Press*, NY (1982), páginas 307-329.
- 10 15. **Gutkind, J. S., y col.,** *A novel c-fgr exon utilized in Epstein-Barr virus-infected B lymphocytes but not in normal monocytes.* *Molec. Cell. Biol.*, 1991. **11**: páginas 1500-1507.
- 15 16. **Heremans, H., J. Van Damme, C. Dillen, R. Dijkmans y A. Billiau.** 1990. Interferon gamma, a mediator of lethal lipopolysaccharide-induced Schwartzman-like shock reactions in mice. *J. Exp. Med.* **171**: 1853-69. ISSN: 0022-1007.
17. **Izaki, K.** (1978) *Jpn. J. Bacteriol.* **33**: 729-742.
18. **John, J. F., y col.** (1986) *Rev. Infect. Dis.* **8**: 693-704.
- 20 19. **Kendall, K. J. y col.** (1987) *J. Bacteriol.* 169: 4177-4183.
- 20 **Kohno, K., J. Kataoka, T. Ohtsuki, Y. Suemoto, I. Okamoto, M. Usui, M. Ikeda y M. Kurimoto.** 1997. IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. *J. Immunol.* **158**: 1541-1550.
- 25 21. **Maliszewski, C.R., T. A. Sato, T. Vanden Bos, S. Waugh, S. K. Dower, J. Slack, M. P. Beckmann y K. H. Grabstein.** 1990. Cytokine receptors and B cell functions. I. Recombinant soluble receptors specifically inhibit IL-1- and IL-4-induced B cell activities *in vitro*. *J. Immunol.* **144**: 3028-3033.
- 30 22. **Maniatis, T.,** en "Cell Biology: A Comprehensive Treatise, Vol. 3: Gene Expression", *Academic Press*, NY, páginas 563-608 (1980).
- 35 23. **Maniatis y col.,** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, *Cold Spring Harbor Laboratory*, Nueva York, 1982.
- 40 24. **Micallef, M. J., T. Ohtsuki, K. Kohno, F. Tanabe, S. Ushio, M. Namba, T. Tanimoto, K. Torigoe, M. Fujii, M. Ikeda, S. Fukuda y M. Kurimoto.** 1996. Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production. *Eur-J-Immunol* **26**: 1647-51. ISSN: 0014-2980.
- 45 25. **Mizushima, S. y Nagata, S.** (1990) pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acid Res.* **18**: 5322-5328.
- 45 26. **Nakamura, K., H. Okamura, K. Nagata, T. Komatsu y T. Tamura.** 1993. Purification of a factor which provides a costimulatory signal for gamma interferon production. *Infect-Immun* **61**: 64-70. ISSN: 0019-9567.
- 50 27. **Nakamura, K., H. Okamura, M. Wada, K. Nagata y T. Tamura.** 1989. Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production. *Infect-Immun* **57**: 590-5. ISSN: 0019-9567.
- 50 28. **Novick, D., B. Cohen y M. Rubinstein.** 1994. The Human Interferon alpha/beta Receptor - Characterization and Molecular Cloning. *Cell* **77**: 391-400.
- 55 29. **Novick, D., B. Cohen y M. Rubinstein.** 1992. Soluble Interferon-alpha Receptor Molecules Are Present in Body Fluids. *FEBS Lett* **314**: 445-448.
- 30 **Novick, D., H. Engelmann, D. Wallach y M. Rubinstein.** 1989. Soluble cytokine receptors are present in normal human urine. *J. Exp. Med.* **170**: 1409-1414.
- 60 31. **Okamura, H., H. Tsutsui, T. Komatsu, M. Yutsudo, A. Hakura, T. Tanimoto, K. Torigoe, T. Okura, Y. Nukada, K. Hattori, K. Akita, M. Namba, F. Tanabe, K. Konishi, S. Fukuda y M. Kurimoto.** 1995. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* **378**: 88-91.
- 65 32. **Rothe, H., N. A. Jenkins, N. G. Copeland y H. Kolb.** 1997. Active stage of autoimmune diabetes is associated with the expression of a novel cytokine, IGIF, which is located near Idd2. *J-Clin-Invest.* **99**: 469-74. ISSN: 0021-9738.
33. **Sambrook, J., E.F. Fritsch y M. T.,** *Molecular Cloning: A laboratory manual.* 2ª edición. 1989, Cold Spring Harbor, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory.

ES 2 149 149 T3

34. **Simonet, W.S.**, y col., *Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density*. *Cell*, 1997. **89**(2): páginas 309-319.
35. **Sompayrac, L.H.** y **K.L. Danna**, *Efficient infection of monkey cells with DNA of simian virus 40*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981. **78**: páginas 7575-7578.
36. **Sparks, C.A.**, y col., *Assignment of the nuclear mitotic apparatus protein NuMA gene to human chromosome 11q13*. *Genomics*, 1993. **17**: páginas 222-224.
37. **Tsutsui, H.**, **K. Nakanishi**, **K. Matsui**, **K. Higashino**, **H. Okamura**, **Y. Miyazawa** y **K. Kaneda**. 1996. IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cells clones. *J. Immunol.* 157: 3967-73. ISSN: 0022-1767.
38. **Ushio, S.**, **M. Namba**, **T. Okura**, **K. Hattori**, **Y. Nukada**, **K. Akita**, **F. Tanabe**, **K. Konishi**, **M. Micallef**, **M. Fujii**, **K. Torigoe**, **T. Tanimoto**, **S. Fukuda**, **M. Ikeda**, **H. Okamura** y **M. Kurimoto**. 1996. Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *J. Immunol.* **156**: 4274-4279. 34. **Okayama, H.** y **Berg, P.** (1983) A cDNA cloning vector that permits expression of cDNA inserts in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 3: 280-289.
39. **Yasuda, H.**, y col., *Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro*. *Endocrinology*, 1998. **139**: páginas 1329-1337.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 149 149 T3

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de unión a IL-18 (IL-18BP) seleccionada del grupo que consiste en:
 - (a) polipéptidos que comprenden las secuencias aminoacídicas de SEQ ID NO:2 o 6;
 - (b) polipéptidos tal como se definen en (a) sin una secuencia líder;
 - (c) muteínas que tienen al menos 80% de homología con IL-18BP tal como se define en (a) o (b), proteínas fusionadas, derivados químicamente modificados, derivados permutados de forma circular y mezclas de los mismos de los polipéptidos definidos en (a) o (b); y que se unen a IL-18 y bloquean la producción de IFN- γ inducida por IL-18.
2. IL-18BP según la reivindicación 1, siendo una proteína no viral.
3. IL-18BP según la reivindicación 2, siendo una proteína humana.
4. IL-18BP según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que tiene un peso molecular de aproximadamente 40 kD.
5. IL-18BP según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la proteína fusionada comprende una inmunoglobulina o fragmento de la misma.
6. IL-18BP según la reivindicación 5, siendo una proteína fusionada seleccionada de IL-18 fusionada a la región constante de la cadena pesada de IgG2.
7. IL-18BP según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde los derivados funcionales incluyen cadenas laterales de polietilenglicol.
8. IL-18BP según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en forma soluble.
9. IL-18BP según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que está glicosilada.
10. IL-18BP según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que no está glicosilada.
11. Una molécula de ADN que codifica una IL-18BP según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
12. Una molécula de ADN según la reivindicación 11, provista de un codón de parada en su extremo 3'.
13. Una molécula de ADN que comprende la secuencia de ADN en SEQ ID NO: 1 o 5, dicho ADN codifica una IL-18BP según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
14. Una molécula de ADN según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 unida operativamente a otras secuencias de ADN que facilitan la expresión, tal como promotores o potenciadores.
15. Una molécula de ADN según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, siendo un ADN genómico.
16. Una molécula de ADN según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, siendo un ADNc.
17. Una molécula de ADNc según la reivindicación 16, que comprende una secuencia de ADNc seleccionada del grupo de secuencias de ADN de SEQ ID NO:1 y 5.
18. Una molécula de ADNc según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 17, que está adaptada para la expresión en un hospedador bacteriano.
19. Un vector replicable que comprende una molécula de ADN según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 18.
20. Una célula hospedadora transformada que comprende un vector según la reivindicación 19.
21. Una célula hospedadora transformada según la reivindicación 20, siendo una célula eucariótica.
22. Una célula hospedadora transformada según la reivindicación 21, siendo una célula de mamífero.
23. Una célula hospedadora transformada según la reivindicación 22 siendo seleccionada de células de ser humano, de mono, de ratón y de Ovario de Hámster Chino (CHO).

ES 2 149 149 T3

24. Una célula hospedadora transformada según la reivindicación 20, siendo una célula procariótica.

25. Un proceso para la producción de IL-18BP según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende cultivar una célula hospedadora según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 24 bajo condiciones adecuadas para la expresión de dicha IL-18BP.

26. Un proceso para la producción de IL-18BP según la reivindicación 25, que además comprende aislar dicha IL-18BP.

27. Un anticuerpo que reacciona específicamente con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2 o 6.

28. Un anticuerpo según la reivindicación 27, siendo un anticuerpo policlonal.

29. Un anticuerpo según la reivindicación 28, siendo un anticuerpo monoclonal.

30. Un anticuerpo según la reivindicación 29, siendo un anticuerpo quimérico.

31. Un anticuerpo según la reivindicación 30, siendo un anticuerpo humanizado.

32. Un anticuerpo anti-idiotípico al anticuerpo según la reivindicación 27.

33. Un proceso para aislar IL-18BP según la reivindicación 1, que comprende:

(a) hacer pasar un fluido humano a través de una columna cromatográfica a la que está acoplada IL-18,

(b) eluir la unión proteica a IL-18, y

(c) purificar dicha proteína.

34. Una composición para uso farmacéutico que comprende IL-18BP según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o homólogo de IL-18BP codificado por un virus que se une a IL-18 y bloquea la producción de IFN- γ inducida por IL-18.

35. Una composición para uso farmacéutico que comprende un ADN que codifica IL-18BP según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

36. Uso de IL-18BP según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o un homólogo del mismo codificado por un virus tal como se define en la reivindicación 34 en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

37. Uso de IL-18BP según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o un homólogo del mismo codificado por un virus tal como se define en la reivindicación 34 en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de diabetes tipo I.

38. Uso de IL-18BP según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o un homólogo del mismo codificado por un virus tal como se define en la reivindicación 34 en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de sepsis.

39. Uso de IL-18BP según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o un homólogo del mismo codificado por un virus tal como se define en la reivindicación 34 en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de rechazo de injertos.

40. Uso de IL-18BP según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o un homólogo del mismo codificado por un virus tal como se define en la reivindicación 34 en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de artritis reumatoide.

41. Uso de IL-18BP según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o un homólogo del mismo codificado por un virus tal como se define en la reivindicación 34 en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria del intestino.

42. Uso de IL-18BP según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o un homólogo del mismo codificado por un virus tal como se define en la reivindicación 34 en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de esclerosis múltiple.

43. Uso de IL-18BP según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o un homólogo del mismo codificado por un virus tal como se define en la reivindicación 34 en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de la enfermedad isquémica del corazón incluyendo ataques cardiacos.

ES 2 149 149 T3

44. Uso de IL-18BP según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o un homólogo del mismo codificado por un virus tal como se define en la reivindicación 34 en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de daño por isquemia cerebral.

5 45. Uso de IL-18BP según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o un homólogo del mismo codificado por un virus tal como se define en la reivindicación 34 en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de psoriasis.

10 46. Uso de IL-18BP según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o un homólogo del mismo codificado por un virus tal como se define en la reivindicación 34 en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de hepatitis aguda o crónica.

15 47. Uso de IL-18BP según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o un homólogo del mismo codificado por un virus tal como se define en la reivindicación 34 en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de pancreatitis aguda o crónica.

48. Unos de IL-18BP según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la purificación de IL-18.

20 49. Uso de los anticuerpos según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 31 en un ensayo para la detección de IL-18BP.

25 50. Uso de una molécula de ADN que codifica IL-18BP según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o un homólogo de la misma codificada por un virus tal como se define en la reivindicación 34 en la preparación de una composición farmacéutica para terapia génica.

30

35

40

45

50

55

60

65

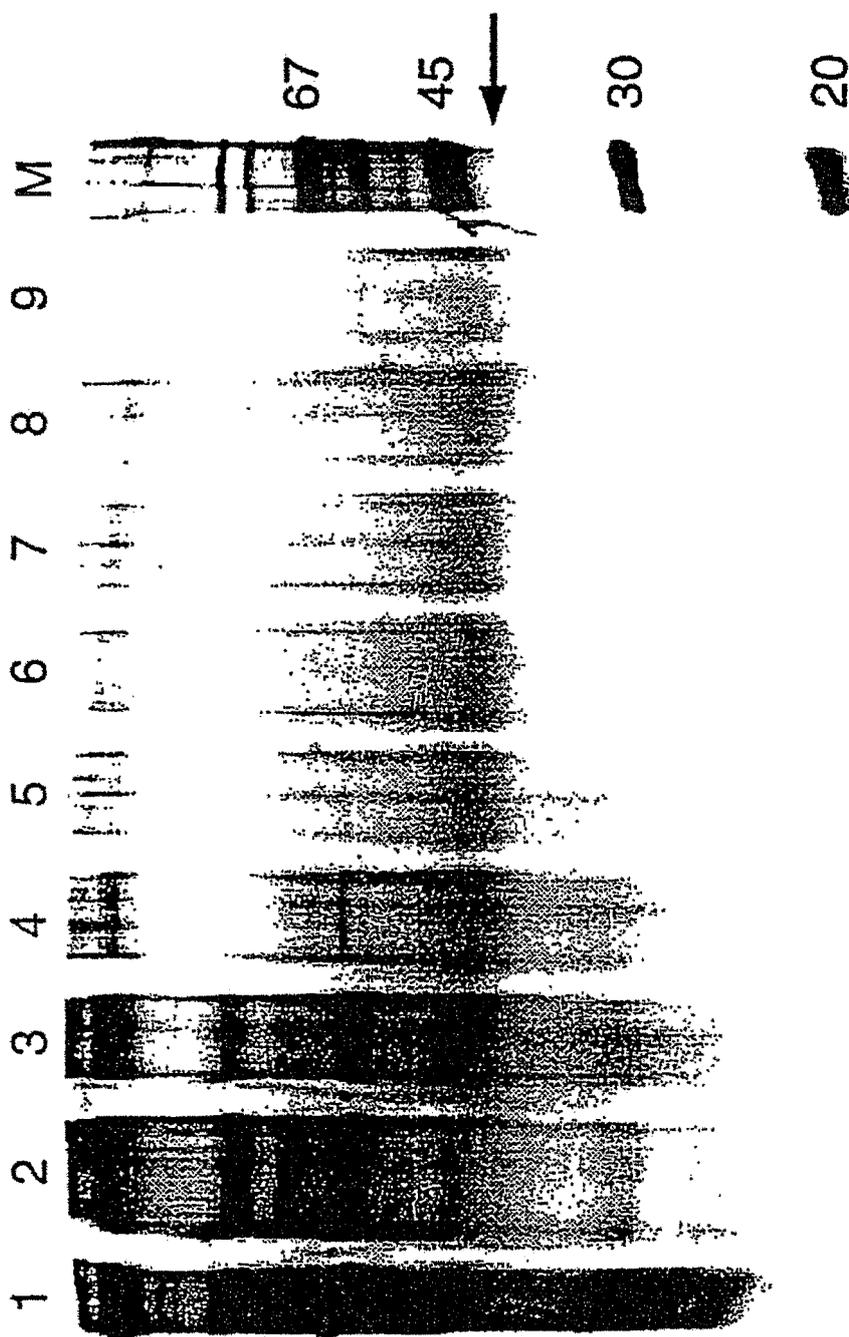


FIGURA 1

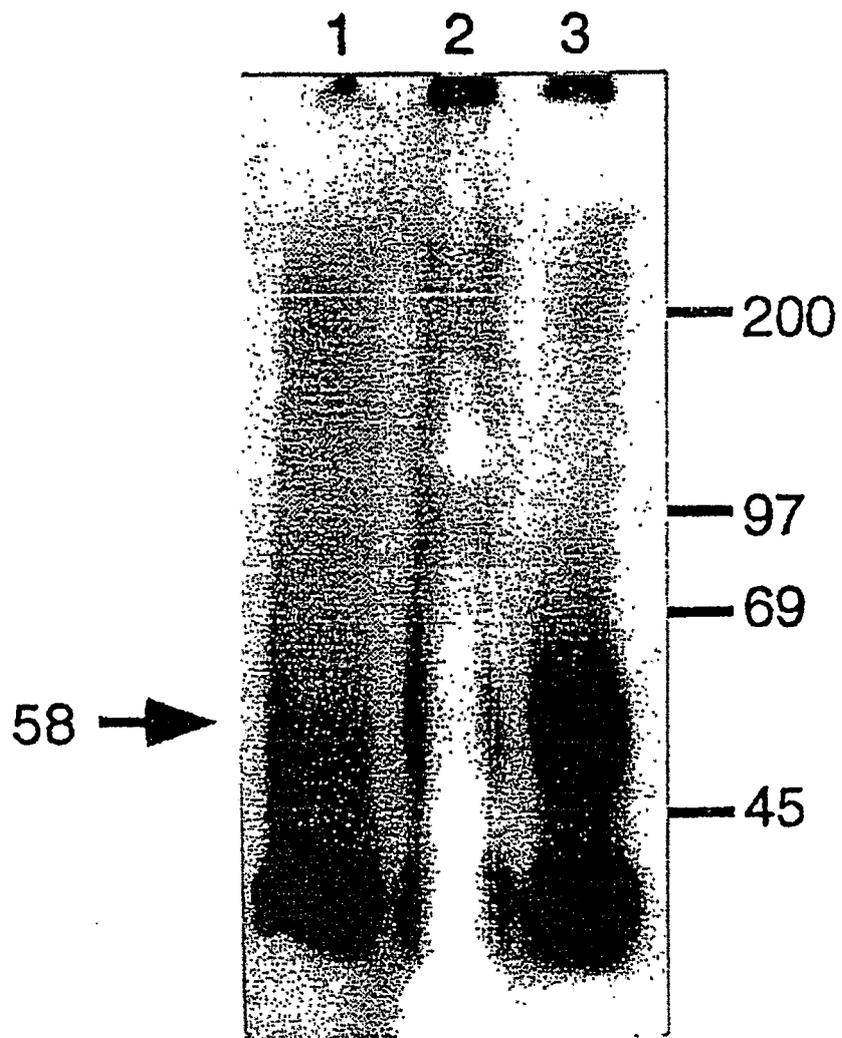


FIGURA 2

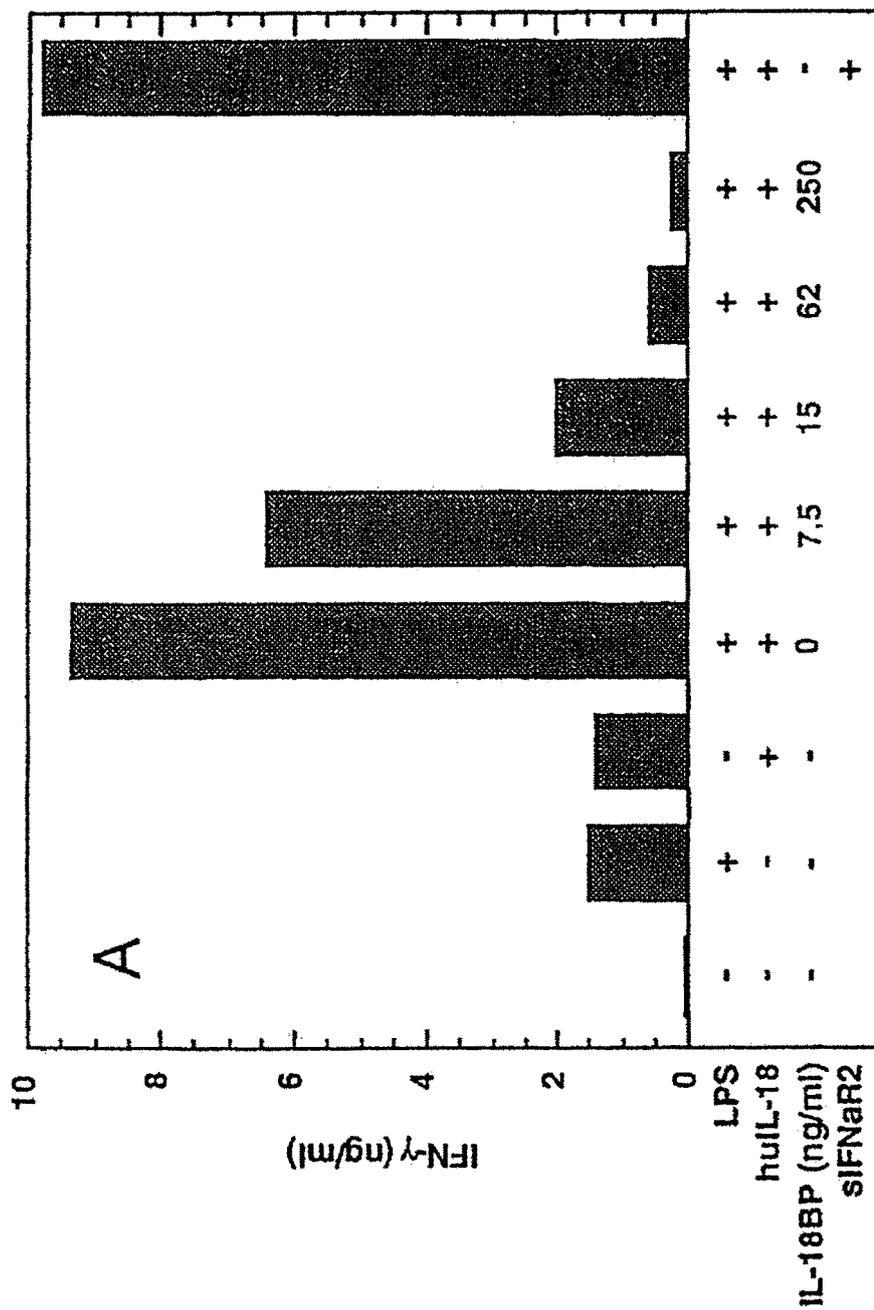


FIGURA 3a

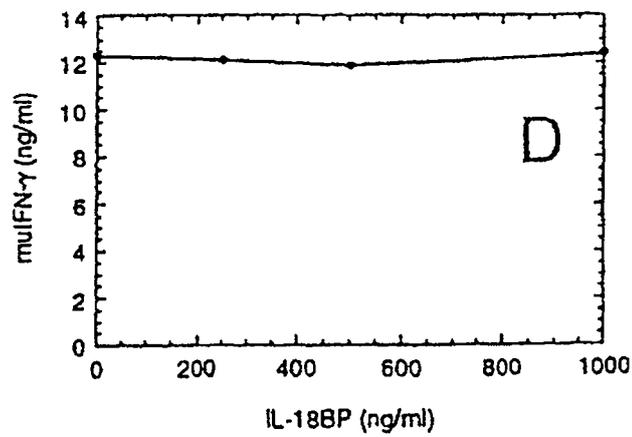
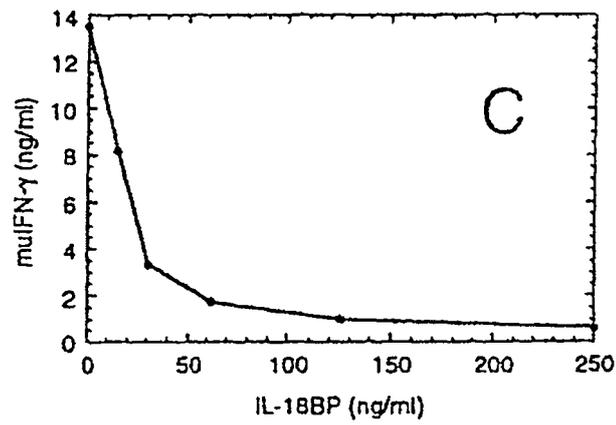
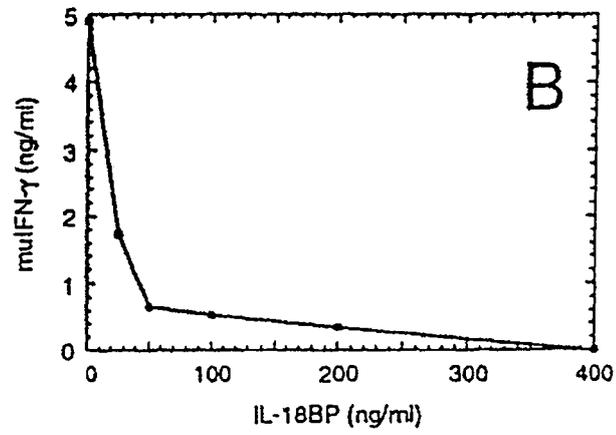


FIGURA 3 B-D

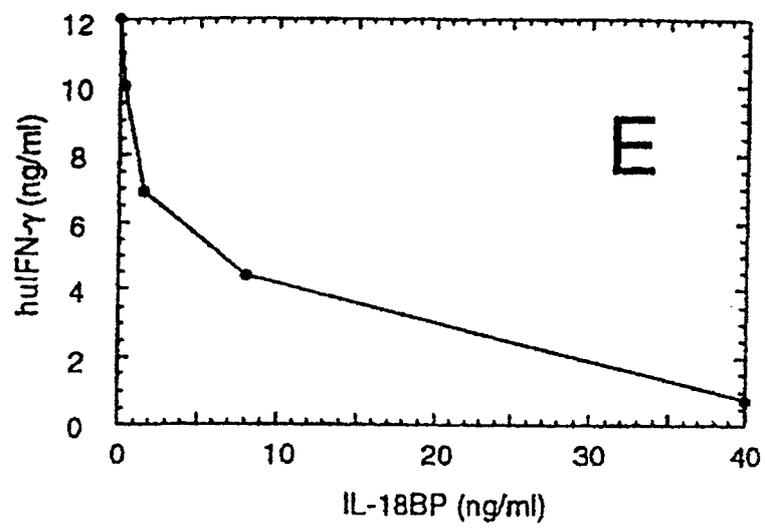


FIGURA 3E

ES 2 149 149 T3

IL-18BP_a; secuencia de ADN:

Longitud: 1348 14 Diciembre 1997 15:47 Tipo: N Comprobación: 2207 ..

```
1  GAGAAGAGGA CGTTGTCACA GATAAAGAGC CAGGCTCACC AGCTCCTGAC
51  GCATGCATCA TGACCATGAG ACACAACTGG ACACCAGACC TCAGCCCTTT
101 GTGGGTCTG CTCCTGTGTG CCCACGTCGT CACTCTCCTG GTCAGAGCCA
151 CACCTGTCTC GCAGACCACC ACAGCTGCCA CTGCCTCAGT TAGAAGCACA
201 AAGGACCCCT GCCCCTCCCA GCCCCCAGTG TTCCAGCAG CTAAGCAGTG
251 TCCAGCATTG GAAGTGACCT GGCCAGAGGT GGAAGTGCCA CTGAATGGAA
301 CGCTGAGCTT ATCCTGTGTG GCCTGCAGCC GCTTCCCCAA CTCAGCATC
351 CTCTACTGGC TGGGCAATGG TTCCTTCATT GAGCACCTCC CAGGCCGACT
401 GTGGGAGGGG AGCACCAGCC GGAACGTGG GAGCACAGGT ACGCAGCTGT
451 GCAAGGCCTT GGTGCTGGAG CAGCTGACCC CTGCCCTGCA CAGCACCAAC
501 TTCTCCTGTG TGCTCGTGGG CCCTGAACAG GTTGTCCAGC GTCACGTTCGT
551 CCTGGCCCAG CTCTGGGCTG GGCTGAGGGC AACCTTGCCC CCCACCCAAG
601 AAGCCCTGCC CTCCAGCCAC AGCAGTCCAC AGCAGCAGGG TTAAGACTCA
651 GCACAGGGCC AGCAGCAGCA CAACCTTGAC CAGAGCTTGG GTCCTACCTG
701 TCTACCTGGA GTGAACAGTC CCTGACTGCC TGTAGGCTGC GTGGATGCGC
751 AACACACCCC CTCCTTCTCT GCTTTGGGTC CTTTCTCTCA CCAAATTCAA
801 ACTCCATTCC CACCTACCTA GAAAATCACA GCCTCCTTAT AATGCCTCCT
851 CCTCCTGCCA TTCTCTCTCC ACCTATCCAT TAGCCTTCCT AACGTCCTAC
901 TCCTCACACT GCTCTACTGC TCAGAAACCA CCAAGACTGT TGATGCCTTA
951 GCCTTGCACT CCAGGGCCCT ACCTGCATTT CCCACATGAC TTTCTGGAAG
1001 CCTCCCAACT ATTCTTGCTT TTCCAGACA GCTCCCACTC CCATGTCTCT
1051 GCTCATTAG TCCCGTCTT CTCACCGCCC CAGCAGGGGA ACGCTCAAGC
1101 CTGGTTGAAA TGCTGCCTCT TCAGTGAAGT CATCCTCTTT CAGCTCTGGC
1151 CGCATTCTGC AGACTTCTA TCTTCGTGCT GTATGTTTTT TTTTCCCCC
1201 TTCACTCTAA TGGACTGTTT CAGGGAAGGG ATGGGGGCAC CAGCTGCTTC
```

FIGURA 4

ES 2 149 149 T3

1251 GGATCCACAC TGTATCTGTG TCATCCCCAC ATGGGTCCTC ATAAAGGATT

1301 ATTCAATGGA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

(SEC ID N°: 1)

IL-18BPα; Secuencia de proteína:

Longitud: 192 5 Junio 1998 13:39 Tipo: P Comprobación: 3073 ..

1 MRHNWTPDLS PLWVLLLCAH VVTLVLRATP VSQTTAATA SVRSTKDPCP

51 SQPPVFPAAK QCPALEVTWP EVEVPLNGL SLSCVACSRF PNFSILYWLG

101 NGSFIEHLPGLRLWEGSTSRE RGSTGTQLCK ALVLEQLTPA LHSTNFSCVL

151 VDPEQVVQRH VVLAQLWAGL RATLPPTQEA LPSSHSPQQ QG

(SEC ID N°: 2)

FIGURA 4A

ES 2 149 149 T3

IL-18BPb; Secuencia de ADN

Longitud: 1038 19 Junio 1998 14:10 Tipo: N Comprobación: 8005 ..

1 GAGAAGAGGA CGTTGTCACA GATAAAGAGC CAGGCTCACC AGCTCCTGAC
51 GCATGCATCA TGACCATGAG ACACAACCTGG ACACCAGACC TCAGCCCTTT
101 GTGGGTCCTG CTCCTGTGTG CCCACGTCGT CACTCTCCTG GTCAGAGCCA
151 CACCTGTCTC GCAGACCACC ACAGCTGCCA CTGCCTCAGT TAGAAGCACA
201 AAGGACCCCT GCCCCTCCCA GCCCCCAGTG TTCCCAGCAG CTAAGCAGTG
251 TCCAGCATTG GAAGTGACCT GGCCAGAGGT GGAAGTGCCA CTGAGCTGGG
301 CTGAGGGCAA CCTTGCCCC CACCCAAGAA GCCCTGCCCT CCAGCCACAG
351 CAGTCCACAG CAGCAGGGTT AAGACTCAGC ACAGGGCCAG CAGCAGCACA
401 ACCTTGACCA GAGCTTGGGT CCTACCTGTC TACCTGGAGT GAACAGTCCC
451 TGA CTGCCTG TAGGCTGCGT GGATGCGCAA CACACCCCT CCTTCTCTGC
501 TTTGGGTCCC TTCTCTCACC AAATTCAAAC TCCATTCCCA CCTACCTAGA
551 AAATCACAGC CTCCTTATAA TGCCTCCTCC TCCTGCCATT CTCTCTCCAC
601 CTATCCATTA GCCTTCCTAA CGTCCTACTC CTCACACTGC TCTACTGCTC
651 AGAAACCACC AAGACTGTTG ATGCCTTAGC CTTGCACTCC AGGGCCCTAC
701 CTGCATTTCC CACATGACTT TCTGGAAGCC TCCCAACTAT TCTTGCTTTT
751 CCCAGACAGC TCCCACTCCC ATGTCTCTGC TCATTTAGTC CCGTCTTCCT
801 CACCGCCCCA GCAGGGGAAC GCTCAAGCCT GGTTGAAATG CTGCCTCTTC
851 AGTGAAGTCA TCCTCTTTCA GCTCTGGCCG CATTCTGCAG ACTTCCTATC
901 TTCGTGCTGT ATGTTTTTTT TTTCCCCCTT CACTCTAATG GACTGTTC
951 GGGAAAGGGAT GGGGGCACCA GCTGCTTCGG ATCCACACTG TATCTGTGTC
1001 ATCCCCACAT GGGTCCTCAT AAAGGATTAT TCAATGGA

(SEC ID N°: 3)

FIGURA 5

ES 2 149 149 T3

hulL-18BPb
Clon-m7
péptido

1 MRHNWTPD LSPLWVLLC AHVVTLLVRA TPVSQTTTAA TASVRSTKDP
49 CPSQPPVFPA AKQCPALEVT WPEVEVPLSW AEGNLAPHPR SPALQPQST
99 AAGLRLSTGP AAAQP*

(SEC ID N°: 4)

FIGURA 5A

ES 2 149 149 T3

hulL18BPc.seq Longitud: 7063 16 Julio 1998 19:47 Tipo: N Comprobación: 9314 ..

1 GAATTCGCGG CCGCGTCGAC GCCAGAGGGG CTAGGATGAG AGACAGAGGG
51 TGTGATGGTG GGTGCTGGGA AATGTACCCG ACCTTGGGGC TGGTGGCTGG
101 GGGAGTGGGT AGCCTGGGAA AGGCCAGGAT GTGGACGGAC TGGTATGGCA
151 TTGAGCCTGA AGTGGTCCAA CTTGGGGTTC CCCAGTGCCT AGGAAAGTTG
201 TCCCCTTGAA TGTCAGTGTG AAGGTGAAGG AGGAAGCAGA TGCCTGTTC A
251 TATGGAAACA AAGACCTGGC TGTGAAGAGG GGAGGCGGAC ACCAAAGTCC
301 TGACACTTGG GCGGGACAGA ATTGATCTGT GAGAGACTCA TCTAGTTCAT
351 ACCCTAGGTG ACCCTGGGGG TGGCATGGGG GTAGATTAGA GATCCCAGTC
401 TGGTATCCTC TGGAGAGTAG GAGTCCCAGG AGCTGAAGGT TTCTGGCCAC
451 TGAAC TTTGG CTAAAGCAGA GGTGTCACAG CTGCTCAAGA TTCCCTGGTT
501 AAAAAGTGAA AGTGAAATAG AGGGTCGGGG CAGTGCTTTC CCAGAAGGAT
551 TGCTCGGCAT CCTGCCCTTC CCAGAAGCAG CTCTGGTGCT GAAGAGAGCA
601 CTGCCTCCCT GTGTGACTGG GTGAGTCCAT ATTCTCTCTT TGGGTCTCAA
651 TTTTGCCTTC CCTAATGAAG GGGTAAGATT GGACTAGGTA AGCATCTTAC
701 AACCATTTGT GGTCATGAGA GCTGGGGTGG GGAAGGATTG TCACTTGACC
751 CCCCAGCTC TGTTTCTAAG TGCTGAAAGA GCTCCAGGCT ATGCTACGGG
801 AGGAGAAGCC AGCTACTGAG GAAAAGCCAG CTA CTGAGAA AAAGCGGGAG
851 TGGTTTACCA TTCTCCTCCC CCACCTTTC A CCAGAGAAGA GGACGTTGTC
901 ACACATAAAG AGCCAGGCTC ACCAGCTCCT GACGCATGCA TCATGACCAT
951 GAGACACAAC TGGACACCAG ACCTCAGCCC TTTGTGGGTC CTGCTCCTGT
1001 GTGCCACGT CGTCACTCTC CTGGTCAGAG CCACACCTGT CTCGCAGACC
1051 ACCACAGCTG CCACTGCCTC AGTTAGAAGC ACAAAGGACC CCTGCCCTC
1101 CCAGCCCCCA GTGTCCCAG CAGCTAAGCA GTGTCCAGCA TTGGAAGTGA
1151 CCTGGCCAGA GGTGGAAGTG CCACTGAATG GAACGCTGAG CTTATCCTGT
1201 GTGGCCTGCA GCCGCTTCCC CAACTTCAGC ATCCTCTACT GGCTGGGCAA

FIGURA 6

ES 2 149 149 T3

1251 TGGTTCCTTC ATTGAGCACC TCCCAGGCCG ACTGTGGGAG GGGAGCACCA
1301 GCCGGGAACG TGGGAGCACA GGTACGCAGC TGTGCAAGGC CTTGGTGCTG
1351 GAGCAGCTGA CCCCTGCCCT GCACAGCACC AACTTCTCCT GTGTGCTCGT
1401 GGACCCTGAA CAGGTTGTCC AGCGTCACGT CGTCCTGGCC CAGCTCTGGG
1451 TGAGGAGCCC AAGGAGAGGC CTCCAGGAAC AGGAGGAGCT CTGCTTCCAT
1501 ATGTGGGGAG GAAAGGGTGG GCTCTGCCAG AGCAGCCTGT GAACTAATGC
1551 CCAGCATTCC TCAAGGTCAG CCAGACAAAA AGGAACTTAG GTCTTGGGCA
1601 GAGGAGGTGT AGCCTGGGGC AAAGTGATGA GATGTCCCTC CTTTCCTTGG
1651 CCTGATCCTT GTCTGCCTTC ACTTCCCTAG GCTGGGCTGA GGGCAACCTT
1701 GCCCCCCACC CAAGAAGCCC TGCCCTCCAG CCACAGCAGT CCACAGCAGC
1751 AGGGTTAAGA CTCAGCACAG GGCCAGCAGC AGCACAACCT TGACCAGAGC
1801 TTGGGTCTTA CCTGTCTACC TGGAGTGAAC AGTCCCTGAC TGCCTGTAGG
1851 CTGCGTGGAT GCGCAACACA CCCCTCCTT CTCTGCTTTG GGTCCCTTCT
1901 CTCACCAAAT TCAAACCTCA TTCCCACCTA CCTAGAAAAT CACAGCCTCC
1951 TTATAATGCC TCCTCCTCCT GCCATTCTCT CTCCACCTAT CCATTAGCCT
2001 TCCTAACGTC CTACTCCTCA CACTGCTCTA CTGCTCAGAA ACCACCAAGA
2051 CTGTTGATGC CTTAGCCTTG CACTCCAGGG CCCTACCTGC ATTTCCACA
2101 TGACTTTCTG GAAGCCTCCC AACTATTCTT GCTTTTCCCA GACAGCTCCC
2151 ACTCCCATGT CTCTGCTCAT TTAGTCCCGT CTTCTCACC GCCCCAGCAG
2201 GGGAACGCTC AAGCCTGGTT GAAATGCTGC CTCTTCAGTG AAGTCATCCT
2251 CTTTCAGCTC TGGCCGCATT CTGCAGACTT CCTATCTTCG TGCTGTATGT
2301 TTTTTTTTTT CCCCTTCACT CTAATGGACT GTTCCAGGGA AGGGATGGGG
2351 GCAGCAGCTG CTTGGATCC AACTGTATC TGTGTCATCC CCACATGGGT
2401 CCTCATAAAG GATTATTCAA TGGAGGCATC CTGACATCTG TTCATTTAGG
2451 CTTCAGTTCC ACTCCCAGGA ACTTTGCCTG TCCCACGAGG GAGTATGGGA
2501 GAGATGGACT GCCACACAGA AGCTGAAGAC AACACCTGCT TCAGGGGAAC

FIGURA 6A

ES 2 149 149 T3

2551 ACAGGCGCTT GAAAAAGAAA AGAGAGAACA GCCCATAATG CTCCCCGGA
2601 GCAGAGGCCA CTAATGGAGA GTGGGAAGAG CCTGGAAAGA TGTGGCCTCA
2651 GGAAAAGGGA TGAGAGAAAG GAGGTGGTAT GGAAGACTCA GCAGGAACAA
2701 GGTAGGCTTC AAAGAGCCTA TATTCTCTT TTTCCACAC CGATCAAGTC
2751 AACTCAGTAC TCACGGGAGA AAAATAGACT TTATTTACAA GTAATAACAT
2801 TTAGAAAAGA TCCATCCCCG GCCCTTAAAA ACCTTCCCAT CACTCCAAT
2851 CCCACCCAG TGCAAGTCTG GGAAGGTAG GGTGTGAGCT GCTGCTGAAG
2901 GCTGTCCCC AACCCTACTC CTGAGACACA GGGCCCATCC GTCCTGGGAA
2951 AGAGCATCCT CTGGCAGGTG CTCCCACCAG GTCAGACCCA GTCCTGGACT
3001 TCAAGAGTGA GGGCCCCTGC TGGGCCAGC CACCAGGACA GCAGGAACCA
3051 GGGCCTACTC CTCTTATGGT CCCTTCTAGA TCCAGAGGCT AAGAGGAAGA
3101 CTGGCCAGGC CCAAGGACCC AGCCATCAA ACCAGCCTCA AATCTGGTTG
3151 TGATGGAGAA GTGACTTTGC TTTAAGAAAA AAGGAGGCAA GGTAGGGAGA
3201 GCGCCACAC TGTCCATGCT CCAGGCCCCC TGGGCCAGCT CCGAGAAGGC
3251 GCCAGTGAAG GACCAGGGAC CAGGCCAGGG TGCGGGCAGG CATCACTGTC
3301 TCTAGGGTT TGGCTACTGT TGGCCTGGGA GCTGAGAGAA GGCCTGAGA
3351 GGGACAGTAG GCGGAGGACC AGGTGACGGC AGCATCGGGG ACACAGGTGG
3401 GGCCACTCAC TGGTACTGGC CCTTTAGTGC TTTGCCTGAA AGAGACACAG
3451 TCACATGGCC AGATGAGAAC TTGCGATACT AGCCTGCACC CACTGGCTGG
3501 GAAGATCTCT TCCTGCTCCC ACGCCCCTGT CTGGATCCCC TCCCTTGTA
3551 GCCCCAGGT TATCAGTTGC TGGCTGTGCC TGAGCAGCTC TGGGTGCTCT
3601 CCATGAGAAAT GGGCCATCT GTCTTCTCTC CTTGGAGAGG AGCTACCAGG
3651 ACAGGGACAC CTCTTACCC ACACCCTCCA GCAGCCTGGC GTGGCCCCAT
3701 CTTGGATGCT ACTTGGTGGG GCGGTCTGGG GGGTGCCAT GCTCTCATCG
3751 GGTTCCTC CCCATCCTG CCAGTGCCTC TACCTTGCC TTGGCTCGAG
3801 GGGTGGACC AATGGCGGCA GCAGTGGCGG CGCTGGCTGT GGTGGTGGCA

FIGURA 6B

ES 2 149 149 T3

3851 ATGCGCGGAG AACGGCGGGT TCCACTGCGA GTGTTGGGGG AAGCCTTGGA
3901 CAGGGCCTTC TTTGAGGCTC CCCGCCGAG AAGGCTGTTC CCTAGCTTCT
3951 TGGGTGTGTT GAGGATGCTG AAGGCCATCG ACTGGCGCCG GTCAGCCTGC
4001 AAGGAAGGGC TGTCAGACCG GGAGACCCAA TGCTGCCTTC CCAGGCCAGC
4051 GTGCTGTGCC ACGCTGTACC AGCAAGGTCC CGCCAGGGCG TCGCTTCATC
4101 CCCCTTCAGC CCCAGCCTCA CCTGTTTAGT AGAAGCTGGA GCTGCTTTCT
4151 TCTGGGCCTC AGTAGTGCTC TGTTTGCGCC CTTCATGTCG GTCTCGGGGA
4201 GTCATGGGGC GTGGGAAACA GCTGGTGGCC TTCTTAGACT ATGGAGAAGA
4251 GGACAGTTAG GCAGACAGTA GCAAGAGGAG TCACATCTGA AGCCAGGTGT
4301 CTTGTCTCT CAGAGCTGAG TGGACCTTGT AAGTCAACGT GCAACCTGCT
4351 CCCCTTCCA ACTCTGGGCC AGATCCTTCC CTCCCAACA GTTCCCATCC
4401 ATGGGTCAGG CCCTTGAGA GAGGGAAAGA GAGGGGGAAG TGAGGGAAGG
4451 AGAGAGAAGG CTCCCTTTAG TCCTTGGTGA GCTGGGCCTG ACCTGAGCAC
4501 AGTGCTGGAG TAACACCCAG GAGCCACCGC GCCTACCTCA GGAGTTCCAG
4551 GGCCCTGGTG GGGCTCTAGG GAGACCCGTT TGCCTGCTG CCGGGTGGTG
4601 ATGCCAGTGC CCTCGGCTAT CTGGATTGGC TGCATGCTGG CTCGGCGCAG
4651 GGTCTCTTGG GGGTCTCCAG TTTTCATCTC CTCATCTGTG ATGGTGCCCA
4701 GGCTCAGGGA AGGCTGCATG GGTGGAAGAG GTGGTCAGTG GACCATAGCT
4751 GTATGGAGAT GGAGGAGGAC CTGGGGCTGT TCCAGAACTC TACACTCGCC
4801 CGACACTTAT GGTCTGGACC CTTCTGCCT ACGAGGTAGA AAGACACAAG
4851 CCTCCTTCC TGTCTGCTT TCTACCTAAG CCCTGGGCAA ATGGCACAAG
4901 CAGTGCAGTC CTGACCAGAT TCCTCTCTGA GCTCCTGCCT ACCCCCAGGG
4951 ACTTCACCCC TGAGTGCCCT CCAGCTGTCT GTTCCACCTG GAACATGAGA
5001 AGGTCACCCC TTCCCCTCTT CGGCCAGTCA GTGATCCAGG GCCCTAGTGC
5051 TCAGGCTAGA TCAGCAGGTG GGATTCCAAG GAAGGGCAGG GATGGGAGGC
5101 CCTGCACAGT GACCCCAGGC CTCACCCTGG ACTCCAGGGA TAGCAGGTCT

FIGURA 6C

ES 2 149 149 T3

5151 TCAGATGTGG GGGGCACACT CGATTGCGCT GCTGCAGCTC TGCAATGCGG
5201 TTCCAGTCAT CCAGCTGCTC AGGCTCATCC TGGCAAGTGC CCATGTAGAA
5251 GCTGTTCCTT CCTGTGGAAG GCAGGGAAGT GGAACAAT GAGCCTGGAG
5301 TCGGCAGGTC ACCTCCTGGC CCTGGCATCT TGCCAGCCTT TGCTGCCACC
5351 TACCCATAA ACTTGAAGCC CGGCACACCA GTCTGATTCA GTGCCGCAGG
5401 TGCAGGAGTA CGGCACACAG ACTATTTCTA TCCTAGGGGC TTGCTACCA
5451 CCTTCTCCCT GGAGAGGGCA GAAGAGGTCA CACGCAGAGA CTGCTACTAC
5501 ATCTTATTCA CTGCCAAGG CTTGGTGGCC AACACCCAGA GGAACAAATT
5551 AAGGACCGGG AATTAATTCC CAGGGGCTCC CTGGTGCCCA AAGGACAAGA
5601 GCTTCCAAGA AGAGTCTGGC CAGCCTGGCC TTTCCAGCAG CCCATCACCG
5651 CCTGAGAAGG GCATGGAGGA CTCCCCACAG CTAAGTGTC CAATTGTGCT
5701 GGAATCCCG GGCCCTTAAC TCTGGCTAAG AGTGCCCCA ACACAGCCAG
5751 CCCCTAGATG GGCAGGTAAG GAAGGCCCTG AGGCTGCAGG AAGGAGGGGC
5801 AGGTGGAGCT GGATGGTAGC AAGGAGGCCA GCCTTGGATT TTTAAAAAGC
5851 TTTCTCTTT TCCCTGTGCC ACGATCCACC TTCCAGTCTA ATTTGGGGT
5901 ATAGTAAGTC CCTGTAGTCC CCTCACCTGG AGGGGCCCCA CTGGACACCC
5951 CGGCCTGGGA ACGACGAGCA GAACTGCGAG TGGTGGGGCG GTAGCCAGGC
6001 AAGCTGAGCA GGGCTGAGTT GCCATAATCG GGAGAACCCA GGCGAGCTAG
6051 ARACTGAGTA GAGGAGGTGG CTCGCAGGCT AGCCTGGGAA GCAGGAGCAG
6101 ACCGCGTGCT GTAGAACGAT GAGTTGGCGC TGTCTGGCTC TTCCACATCT
6151 AGCTTCTGGA AGACAGAGTG AATCTGTTGC AGTGTACAGT CCCTGGCACT
6201 GTACAGAAGC TTCCCATTC CTTCCGAAGC CCTCAGATCC CACGGCACAT
6251 CCATGTATTC CCAACTGCTT TGCAAAGGTC CTAAAGTGT GTGTCTGCAA
6301 GAAATGGGCC TTGTCGACAG AAGCCCTCAC AAGGTGGTGC TGATGTTGTC
6351 AAGACTCTC TACGCATTTT TTTCATGGAG TCTATTCATA ATGCTTTGAG
6401 GTAGGGAATG CAGAGTGTTC ATCGGCCCAT TTTGGAGATG AAGTGCAAAG

FIGURA 6D

ES 2 149 149 T3

6451 AAATAAAGTG ACTAGCCCCA AATCACACTG CTAGGAAGTA TCAGAGCTGG
6501 GGCTAGGCCCC CATGTCTCCT GACTAGTCAG GCTCATCCCA CAGCCTCTGC
6551 TGTCCCTCAG TCCAAACTTC CAGGGCCCTT ACCATGTTCC AGAACTTCCC
6601 CCAACTTCTT GGTAGCAGGG GGCACCCTAA ACACACAGGT CCCCCCTGCT
6651 GTACCAGGGG CCCCCTCTCC CCTCCTCCCA AACCTCCCCT TCAAGATGTG
6701 GAAACAAAGG CAAGGGCCTG CAGCCTGTCA GGCAGTCCAC TGGGCAGCAA
6751 CAATGCCTCT CAGCTGCATG GGGCATGCTG GGAGGCACAG GATGGGCTGC
6801 AGCTTCGCCA CGTTCTCTCC CTTACCCTG CACAGGCTCA GTGCTACGCA
6851 TGGAGAGAAT GCTAGCCTTA GTCAGGAGGC AGGGATCTAA TCCTAGCCCT
6901 GCCTTTTTTCT TCAGAAGTGC CCTTAACCAA GTCACTGCC TTTTAAAGAC
6951 CTCTCAGCTT TCCCCTGTA ACATGGACTG GCTGCTCATC CCTCCCTGCT
7001 CCTGACTGAG TGCCCAGTGC AAAGATGCC TTAGAGAGGAA GTGGGAATTG
7051 CTGACCTGTC GAC

(SEC ID Nº: 5)

IL-18BPc; Proteina

Longitud: 197 5 Junio 1998 13:41 Tipo: P Comprobación: 3353 ..

1 MRHNWTPDLS PLWVLLCAH VYTLVLRATP VSQTTTAATA SVRSTKDPCP
51 SQPPVFPAAK QCPALEVTWP EVEVPLNGTL SLSCVACSRF PNFSILYWLG
101 NGSFIEHLPG RLWEGSTSRE RGSTGTQLCK ALVLEQLTPA LHSTNFSCVL
151 VDPEQVVQRH VVLAQLWVRS PRRGLQEQUEE LCFHMWGGKG GLCQSSL

(SEC ID Nº: 6)

FIGURA 6E

ES 2 149 149 T3

IL-18BPd; ADN

Longitud: 1360 19 Junio 1998 14:55 Tipo: N Comprobación: 8757 ..

1 GCGGCCGCGT CGACCACGCA GCTAAACACA GCTAACTTGA GTCTTGGAGC
51 TCCTAAAGGG AAGCTTCTGG AAAGGAAGGC TCTTCAGGAC CTCTTAGGAG
101 CCAAAGAAGA GGACGTTGTC ACAGATAAAG AGCCAGGCTC ACCAGCTCCT
151 GACGCATGCA TCATGACCAT GAGACACAAC TGGACACCAG ACCTCAGCCC
201 TTTGTGGGTC CTGCTCCTGT GTGCCACGT CGTCACTCTC CTGGTCAGAG
251 CCACACCTGT CTCGCAGACC ACCACAGCTG CCACTGCCTC AGTTAGAAGC
301 ACAAAGGACC CCTGCCCCC CCAGCCCCCA GTGTTCCAG CAGCTAAGCA
351 GTGTCCAGCA TTGGAAGTGA CCTGGCCAGA GGTGGAAGTG CCACTGAATG
401 GAACGCTGAG CTTATCCTGT GTGGCCTGCA GCCGCTTCCC CAACTTCAGC
451 ATCCTCTACT GGCTGGGCAA TGGTTCCTTC ATTGAGCACC TCCCAGGCCG
501 ACTGTGGGAG GGGAGCACCA GCCGGGAACG TGGGAGCACA GGCTGGGCTG
551 AGGGCAACCT TGCCCCCAC CCAAGAAGCC cTGCCCTCCA GCCACAGCAG
601 TCCACAGCAG CAGGGTTAAG ACTCAGCACA GGGCCAGCAG CAGCACAACC
651 TTGACCAGAG CTTGGGTCTT ACCTGTCTAC CTGGAGTGAA CAGTCCCTGA
701 CTGCCTGTAG GCTGCGTGGA TCGCAACAC ACCCCCTCCT TCTCTGCTTT
751 GGGTCCCTTC TCTACCAAA TTCAAaCTCC ATTCCCACCT ACCTAGAAAA
801 TCACAGCTC CTTATaATGC CTCCTCCTCC TGCCATTCTC TCTCCACCTA
851 TCCATTAGCC TTCCTAACGT CCTACTCCTC ACACTGCTCT ACTGCTCAGA
901 AACCACCAAG ACTGTTGATG CCTTAGCCTT GCACTCCAGG GCCCTACCTG
951 CATTTCACAC ATGACTTTCT GGAAGCCTCC CAACTATTCT TGCTTTTCCC
1001 AGACAGCTCC CACTCCCATG TCTCTGCTCA TTTAGTCCCG TCTTCTCAC
1051 CGCCCCAGCA GGGGAACGCT CAAGCCTGGT TGAAATGCTG CCTCTTCAGT
1101 GAAGTCATCC TCTTTCAGCT CTGGCCGCAT TCTGCAGACT TCCTATCTTC
1151 GTGCTGTATG TTTTTTTTTT CCCCCTTCAC TCTAATGGAC TGTCCAGGG

FIGURA 7

ES 2 149 149 T3

1201 AAGGGATGGG GGCAGCAGCT GCTTCGGATC CACACTGTAT CTGTGTCATC
1251 CCCACATGGG TCCTCATAAA GGATTATTCA ATGGAGGCAT CCTGACATCT
1301 GTCCATTTAG GCTTCAGTTC CACTCCCAGG AACTTTGCCT GTCCCACGAG
1351 GGAGTATGGG

(SEC ID N°: 7)

IL-18BPd; proteína

Longitud: 161 5 Junio 1998 13:40 Tipo: P Comprobación: 2239 ..

1 MRHNWTPDLS PLWVLLLCAH VVTLLVRATP VSQTTTAATA SVRSTKDPCP
51 SQPPVFPAAK QCPALEVTWP EVEVPLNGTL SLSCVACSRF PNFSILYWLG
101 NGSFIEHLPG RLWEGSTSRE RGSTGWAEGN LAPHPRSPAL QPQQSTAAGL
151 RLSTGPAAAQ P

(SEC ID N°: 8)

FIGURA 7A

ES 2 149 149 T3

Gen Hull-18BP

Longitud: 7812 15 Julio 1998 11:55 Tipo: N Comprobación: 7058 ..

1 GTCGACGGTA CCCCCGGGAA AGATTTAATA CGACTCACTA TAGGGCGGGA
51 CAGAATTGAT CTGTGAGAGA CTCATCTAGT TCATACCCTA GGTGACCCTG
101 GGGGTGGCAT GGGGGTAGAT TAGAGATCCC AGTCTGGTAT CCTCTGGAGA
151 GTAGGAGTCC CAGGAGCTGA AGGTTTCTGG CCACTGAACT TTGGCTAAAG
201 CAGAGGTGTC ACAGCTGCTC AAGATTCCCT GGTAAAAAAG TGAAAGTGAA
251 ATAGAGGGTC GGGGCAGTGC TTTCCAGAA GGATTGCTCG GCATCCTGCC
301 CTTCCAGAA GCAGCTCTGG TGCTGAAGAG AGCACTGCCT CCCTGTGTGA
351 CTGGGTGAGT CCATATTCTC TCTTTGGGTC TCAATTTTGC CTTCCCTAAT
401 GAAGGGGTAA GATTGGACTA GGTAAGCATC TTACAACCAT TTGTGGTCAT
451 GAGAGCTGGG GTGGGGAAGG ATTGTCACTT GACCCCCCA GCTCTGTTTC
501 TAAGTGCTGA AAGAGCTCCA GGCTATGCTA CGGGAGGAGA AGCCAGCTAC
551 TGAGGAAAAG CCAGCTACTG AGAAAAAGCG GGAGTGGTTT ACCATTCTCC
601 TCCCCACCT TTCACCAGAG AAGAGGACGT TGTCACACAT AAAGAGCCAG
651 GCTCACCAGC TCCTGACGCA TGCATCATGA CCATGAGACA CAACTGGACA
701 CCAGGTAGGC CTTGGGGCTA CGCATGGGCA GCGGGGGTAG GGTGAGGTCT
751 ATGAACAGAA TGGAGCAATG GGCTAACCCG GAGCCTTAC TCCAAGGCAA
801 ACCACCCAGC GCACCTGGTG CTGTTGCTTT AAGAACCTGG GCAGATATTG
851 TAGCTCTGGC TCCAGTCTAA AGCTTCTCTG TACTCTGTTC AATAAAGGGC
901 TAAGGGGTGG GTGCTGAGGG GTCCCTCTTC CCGCTCTGAT TCCCTGGCTA
951 GAACCCAGAC ATCTCTGGGC TGGAGTTACA TCCTTACCCG GGCAGCCCAC
1001 TCTGTCTCCA GAGCCGCTGA CCTGTAACTG TCCTTTCCTC AGACCTCAGC
1051 CCTTTGTGGG TCCTGCTCCT GTGTGCCAC GTCGTCACTC TCCTGGTCAG
1101 AGCCACACCT GTCTCGCAGA CCACCACAGC TGCCACTGCC TCAGTTAGAA
1151 GCACAAAGGA CCCCTGCCCC TCCCAGCCCC CAGTGTTCCC AGCAGCTAAG

FIGURA 8

ES 2 149 149 T3

1201 CAGTGTCCAG CATTGGAAGT GACCTGGCCA GAGGTGGAAG TGCCACTGAG
1251 TAAGAAGCAC AGTGGTGGAG GGTGGGCTAT GGGCACAGAG GTTCCCAGGG
1301 TCGGGTTGAC TCCTGAGCGC CAGTCCCCTT CTGCCCATGT ACCACCAGCT
1351 GAGCCAGCTG GGCTGAGCAC GCACCATTCT CCCTCCCCAA CCCAGTGTCA
1401 TGGGTGCAGG CTTGGCGCAG CTCCCAAGAT GCTCCCTATC AAATAGGACA
1451 GAGAACTCAA GACATAAGTA ATGGTCACAG GACCTCCCAG AGCCTTGTT
1501 GCAGTGGACC CCAAGGCCAG CCCCTCCACC CAGAGCCTGC TGGCCTCTGG
1551 CCATCTCAGA GGAGCAGCAG CCATCCAGCA CTGCCTCTGT CACCTGGGCT
1601 CCCAAGTCAC CGAGGCTGGG CACTAGAAAA GGTCATCCTG AGGAGACAGG
1651 TTCAGAAGAG GATTCATCAC GTGAACCAAG GACCAATTCCT CACATTCCCC
1701 GTGTTTAGGG CTAGGGCCTC TCGGAGACAA CTGCACTTCT GTAACGGACG
1751 TTCCCACCTA GGTGGTGTGC AGAGCAGTTC TCTAGGTTCC AGATGCATGG
1801 GGACTGGGGG GAGCTGGCAG AGAGGGCACA GCAGAGCAGG GTAGGGGAAG
1851 GGCCTGCTCT TCTGAAGAGC TAACTGCTGC CTGTGTCCCT AGATGGAACG
1901 CTGAGCTTAT CCTGTGTGGC CTGCAGCCGC TTCCCCAACT TCAGCATCCT
1951 CTA CTGACTGGCTG GGCAATGGTT CCTTCATTGA GCACCTCCA GCGCCACTGT
2001 GGGAGGGGAG CACCAGGTGA GGGTCGCAGC AGCCAGGTGG GTGGGAAGGA
2051 AGCCTTCTGC GGCCTTCTCA TGACCTTTCC TTCCCTTCCG CTCCAGCCGG
2101 GAACGTGGGA GCACAGGTAC GCAGCTGTGC AAGGCCTTGG TGCTGGAGCA
2151 GCTGACCCCT GCCCTGCACA GCACCAACTT CTCCTGTGTG CTCGTGGACC
2201 CTGAACAGGT TGTCCAGCGT CACGTCGTCC TGGCCCAGCT CTGGGTGAGG
2251 AGCCCAAGGA GAGGCCTCCA GGAACAGGAG GAGCTCTGCT TCCATATGTG
2301 GGGAGGAAAG GGTGGGCTCT GCCAGAGCAG CCTGTGAACT AATGCCCAGC
2351 ATTCCTCAAG GTCAGCCAGA CAAAAAGGAA CTTAGGTCTT GGGCAGAGGA
2401 GGTGTAGCCT GGGCAAAGT GATGAGATGT CCCTCCTTTC CTTGGCCTGA
2451 TCCTTGTCTG CCTTCACTTC CCTAGGCTGG GCTGAGGGCA ACCTTGCCCC

FIGURA 8A

ES 2 149 149 T3

2501 CCACCCAAGA AGCCCTGCCC TCCAGCCACA GCAGTCCACA GCAGCAGGGT
2551 TAAGACTCAG CACAGGGCCA GCAGCAGCAC AACCTTGACC AGAGCTTGGG
2601 TCCTACCTGT CTACCTGGAG TGAACAGTCC CTGACTGCCT GTAGGCTGCG
2651 TGGATGCGCA ACACACCCCC TCCTTCTCTG CTTTGGGTCC CTTCTCTCAC
2701 CAAATTCAAA CTCCATTCCC ACCTACCTAG AAAATCACAG CCTCCTTATA
2751 ATGCCTCCTC CTCCTGCCAT TCTCTCTCCA CCTATCCATT AGCCTTCCTA
2801 ACGTCCTACT CCTCACACTG CTCTACTGCT CAGAAACCAC CAAGACTGTT
2851 GATGCCTTAG CTTTGCCTC CAGGGCCCTA CCTGCATTTC CCACATGACT
2901 TTCTGGAAGC CTCCCAACTA TTCTTGCTTT TCCCAGACAG CTCCCCTCC
2951 CATGTCTCTG CTCATTTAGT CCCGTCTTCC TCACCGCCCC AGCAGGGGAA
3001 CGCTCAAGCC TGGTTGAAAT GCTGCCTCTT CAGTGAAGTC ATCCTCTTTC
3051 AGCTCTGGCC GCATTCTGCA GACTTCCTAT CTTCGTGCTG TATGTTTTTT
3101 TTTTCCCCCT TCACTCTAAT GGACTGTTCC AGGGAAGGGA TGGGGGCAGC
3151 AGCTGCTTCG GATCCACACT GTATCTGTGT CATCCCCACA TGGGTCTCA
3201 TAAAGGATTA TTCAATGGAG GCATCCTGAC ATCTGTTCAT TTAGGCTTCA
3251 GTTCCACTCC CAGGAACTTT GCCTGTCCCA CGAGGGAGTA TGGGAGAGAT
3301 GGACTGCCAC ACAGAAGCTG AAGACAACAC CTGCTTCAGG GGAACACAGG
3351 CGCTTGAAAA AGAAAAGAGA GAACAGCCCA TAATGCTCCC CGGGAGCAGA
3401 GGCCACTAAT GGAGAGTGGG AAGAGCCTGG AAAGATGTGG CCTCAGGAAA
3451 AGGGATGAGA GAAAGGAGGT GGTATGGAAG ACTCAGCAGG AACAAGGTAG
3501 GCTTCAAAGA GCCTATATTC CTCTTTTTCC CACACCGATC AAGTCAACTC
3551 AGTACTCACG GGAGAAAAAT AGACTTTATT TACAAGTAAT AACATTTAGA
3601 AAAGATCCAT CCCC GGCCCT TAAAAACCTT CCCATCACTC CAAATCCCAC
3651 CCCAGTGCAA GTCTGGGGAA GGTAGGGTGT GAGCTGCTGC TGAAGGCTGT
3701 CCCCCAACCC CACTCCTGAG ACACAGGGCC CATCCGTCCT GGGAAAGAGC
3751 ATCCTCTGGC AGGTGCTCCC ACCAGGTCAG ACCCAGTCCT GGACTTCAAG

FIGURA 8B

ES 2 149 149 T3

3801 AGTGAGGGCC CCTGCTGGGC CCAGCCACCA GGACAGCAGG AACCAGGGCC
3851 TACTCCTCTT ATGGTCCCTT CTAGATCCAG AGGCTAAGAG GAAGACTGGC
3901 CAGGCCCAAG GACCCAGCCA TCAAAACCAG CCTCAAATCT GGTTGTGATG
3951 GAGAAGTGAC TTTGCTTTAA GAAAAAAGGA GGCAAGGTAG GGAGAGCGCC
4001 CACACTGTCC ATGCTCCAGG CCCCTGGGC CAGCTCCGAG AAGGCGCCAG
4051 TGAAGGACCA GGGACCAGGC CAGGGTGCGG GCAGGCATCA CTGTCTCTAG
4101 GGGTTTGGCT ACTGTTGGCC TGGGAGCTGA GAGAAGGCAC TGAGAGGGAC
4151 AGTAGGCGGA GGACCAGGTG ACGGCAGCAT CGGGGACACA GGTGGGGCCA
4201 CTCACTGGTA CTGGCCCTTT AGTGCTTTGC CTGAAAGAGA CACAGTCACA
4251 TGGCCAGATG AGAACTTGCG AACTAGCCT GCACCCACTG GCTGGGAAGA
4301 TCTCTTCTG CTCCCACGCC CCTGTCTGGA TCCCCTCCCT TGTGAGCCCC
4351 AGGGTTATCA GTTGCTGGCT GTGCCTGAGC AGCTCTGGGT GCTCTCCATG
4401 AGAATGGGGC CATCTGTCTT CTCTCCTTGG AGAGGAGCTA CCAGGACAGG
4451 GACACCTCTT ACCCCACACC CTCCAGCAGC CTGGCGTGGC CCCATCTTGG
4501 ATGCTACTTG GTGGGGCGGT CTGGGGGGTG CCCATGCTCT CATCGGGTTT
4551 CCCTCCCCCA TCCTGCCAGT GCCTCTACCT TGCCCTTGGC TCGAGGGGTG
4601 GCACCAATGG CGGCAGCAGT GGCGGCGCTG GCTGTGGTGG TGGCAATGCG
4651 CGGAGAACGG CGGGTTCCAC TGCAGTGTT GGGGGAAGCC TTGGACAGGG
4701 CCTTCTTTGA GGCTCCCCGC CGCAGAAGGC TGTCCCTAG CTTCTTGGGT
4751 GTGTTGAGGA TGCTGAAGGC CATCGACTGG CGCCGGTCAG CCTGCAAGGA
4801 AGGGCTGTCA GACCGGGAGA CCAATGCTG CCTTCCCAGG CCAGCGTGCT
4851 GTGCCACGCT GTACCAGCAA GGTCCCAGCA GGGCGTCGCT TCATCCCCCT
4901 TCAGCCCCAG CCTCACCTGT TTAGTAGAAG CTGGAGCTGC TTTCTTCTGG
4951 GCCTCAGTAG TGCTCTGTTT GCGCCCTTCA TGTCGGTCTC GGGGAGTCAT
5001 GGGGCGTGGG AAACAGCTGG TGGCCTTCTT AACTATGGA GAAGAGGACA
5051 GTTAGGCAGA CAGTAGCAAG AGGAGTCACA TCTGAAGCCA GGTGTCTTGT

FIGURA 8C

ES 2 149 149 T3

5101 CCTCTCAGAG CTGAGTGGAC CTTGTAAGTC AACGTGCAAC CTGCTCCCCT
5151 TCCCAACTCT GGGCCAGATC CTTCCCTTCC CAACAGTTCC CATCCATGGG
5201 TCAGGCCCTT GGAGAGAGGG AAAGAGAGGG GGAAGTGAGG GAAGGAGAGA
5251 GAAGGCTCCC TTTAGTCCTT GGTGAGCTGG GCCTGACCTG AGCACAGTGC
5301 TGGAGTAACA CCCAGGAGCC ACCGCGCCTA CCTCAGGAGT TCCAGGGCCC
5351 TGGTGGGGCT CTAGGGAGAC CCGTTTGCGC TGCTGCCGGG TGGTGATGCC
5401 AGTGCCCTCG GCTATCTGGA TTGGCTGCAT GCTGGCTCGG CGCAGGGTCT
5451 CTTGGGGGTC TCCAGTTTTT ATCTCCTCAT CTGTGATGGT GCCCAGGCTC
5501 AGGGAAGGCT GCATGGGTGG AAGAGGTGGT CAGTGGACCA TAGCTGTATG
5551 GAGATGGAGG AGGACCTGGG GCTGTTCCAG AACTCTACAC TCGCCCGACA
5601 CTTATGGTCG GGACCCTTCC TGCCTACGAG GTAGAAAGAC ACAAGCCTCC
5651 TTTCTGTTC TGCTTTCTAC CTAAGCCCTG GGCAAATGGC ACAAGCAGTG
5701 CAGTCCTGAC CAGATTCTC TCTGAGCTCC TGCCTACCCC CAGGGACTTC
5751 ACCCCTGAGT GCCCTCCAGC TGTCTGTTCC ACCTGGAACA TGAGAAGGTG
5801 ACCCCTTCCC CTCTTCGGCC AGTCAGTGAT CCAGGGCCCT AGTGCTCAGG
5851 CTAGATCAGC AGGTGGGATT CCAAGGAAGG GCAGGGATGG GAGGCCCTGC
5901 ACAGTGACCC CAGGCCTCAC CCTGGACTCC AGGGATAGCA GGTCTTCAGA
5951 TGTGGGGGGC AACTCGATT GCGCTGCTGC AGCTCTGCAA TCGGTTCCA
6001 GTCATCCAGC TGCTCAGGCT CATCCTGGCA AGTGCCCATG TAGAAGCTGT
6051 TCCTTCCTGT GGAAGGCAGG GAAGTGGGAA CAAATGAGCC TGGAGTCGGC
6101 AGGTACCTC CTGGCCCTGG CATCTTGCCA GCCTTTGCTG CCACCTACCC
6151 CATAAACTTG AAGCCCGGCA CACCAGTCTG ATTCAGTGCC GCAGGTGCAG
6201 GAGTACGGCA CACAGACTAT TTCTATCCTA GGGGCTTGCT CACCACCTTC
6251 TCCCTGGAGA GGGCAGAAGA GGTACACACGC AGAGACTGCT ACTACATCTT
6301 ATTCACCTGC CAAGGCTTGG JGGCCAACAC CCAGAGGAAC AAATTAAGGA
6351 CCGGGAATTA ATTCCCAGGG GCTCCCTGGT GCCCAAAGGA CAAGAGCTTC

FIGURA 8D

ES 2 149 149 T3

6401 CAAGAAGAGT CTGGCCAGCC TGGCCTTTCC AGCAGCCCAT CACCGCCTGA
6451 GAAGGGCATG GAGGACTCCC CACAGCTAAG TGTCACAATT GTGCTGGGAA
6501 TCCCGGGCCC TTAACTCTGG CTAAGAGTGC CCCC AACACA GCCAGCCCCT
6551 AGATGGGCAG GTAAGGAAGG CCCTGAGGCT GCAGGAAGGA GGGGCAGGTG
6601 GAGCTGGATG GTAGCAAGGA GGCCAGCCTT GGATTTTTAA AAAGCTTTCC
6651 TCTTTTCCCT GTGCCACGAT CCACCTTCCA GTCTAATTTT GGGGTATAGT
6701 AAGTCCCTGT AGTCCCCTCA CCTGGAGGGG CCCCACTGGA CACCCCGGCC
6751 TGGGAACGAC GAGCAGAACT GCGAGTGGTG GGGCGGTAGC CAGGCAAGCT
6801 GAGCAGGGCT GAGTTGCCAT AATCGGGAGA ACCCAGGCGA GCTAGAGACT
6851 GAGTAGAGGA GGTGGCTCGC AGGCTAGCCT GGAAGCAGG AGCAGACCGC
6901 GTGCTGTAGA ACGATGAGTT GGCCTGTCT GGCTCTTCCA CATCTAGCTT
6951 CTGGAAGACA GAGTGAATCT GTTGCAGTGT ACAGTCCCTG GCACTGTACA
7001 GAAGCTTCCC ATTCCCTTCC GAAGCCCTCA GATCCCACGG CACATCCATG
7051 TATTCCCAAC TGCTTTGCAA AGGTCCTTAA AGTGTGTGTC TGCAAGAAAT
7101 GGGCCTTGTC GACAGAAGCC CTCACAAGGT GGTGCTGATG TTGTCAAGAC
7151 TCTTCTACGC ATTTTTTTCA TGGAGTCTAT TCATAATGCT TTGAGGTAGG
7201 GAATGCAGAG TGTTTATCGG CCCATTTTGG AGATGAAGTG CAAAGAAATA
7251 AAGTGACTION CCCC AAATCA CACTGCTAGG AAGTATCAGA GCTGGGGCTA
7301 GGCCCCATGT CTCCTGACTA GTCAGGCTCA TCCCACAGCC TCTGCTGTCC
7351 CTCAGTCCAA ACTTCCAGGG CCCTTACCAT GTTCCAGAAC TTCCCCAAC
7401 TTCTTGGTAG CAGGGGGCAC CCTAAACACA CAGGTCCCCC CTGCTGTACC
7451 AGGGGCCCCC TCTCCCCTCC TCCCAAACCT CCCCTTCAAG ATGTGGAAAC
7501 AAAGGCAAGG GCCTGCAGCC TGTCAGGCAG TCCACTGGGC AGCAACAATG
7551 CCTCTCAGCT GCATGGGGCA TGCTGGGAGG CACAGGATGG GCTGCAGCTT
7601 CGCCACGTTT TCTCCCTTCA CCCTGCACAG GCTCAGTGCT ACGCATGGAG
7651 AGAATGCTAG CCTTAGTCAG GAGGCAGGGA TCTAATCCTA GCCCTGCCTT

FIGURA 8E

ES 2 149 149 T3

7701 TTTCTTCAGA AGTGCCCTTA ACCAAGTCAC TGCCCTTTTT AAGACCTCTC

7751 AGCTTTCCCA CTGTAACATG GACTGGCTGC TCATCCCTCC CTGCTCCTGA

7801 CTGAGTGCCC AG

(SEC ID N°: 9)

FIGURA 8F

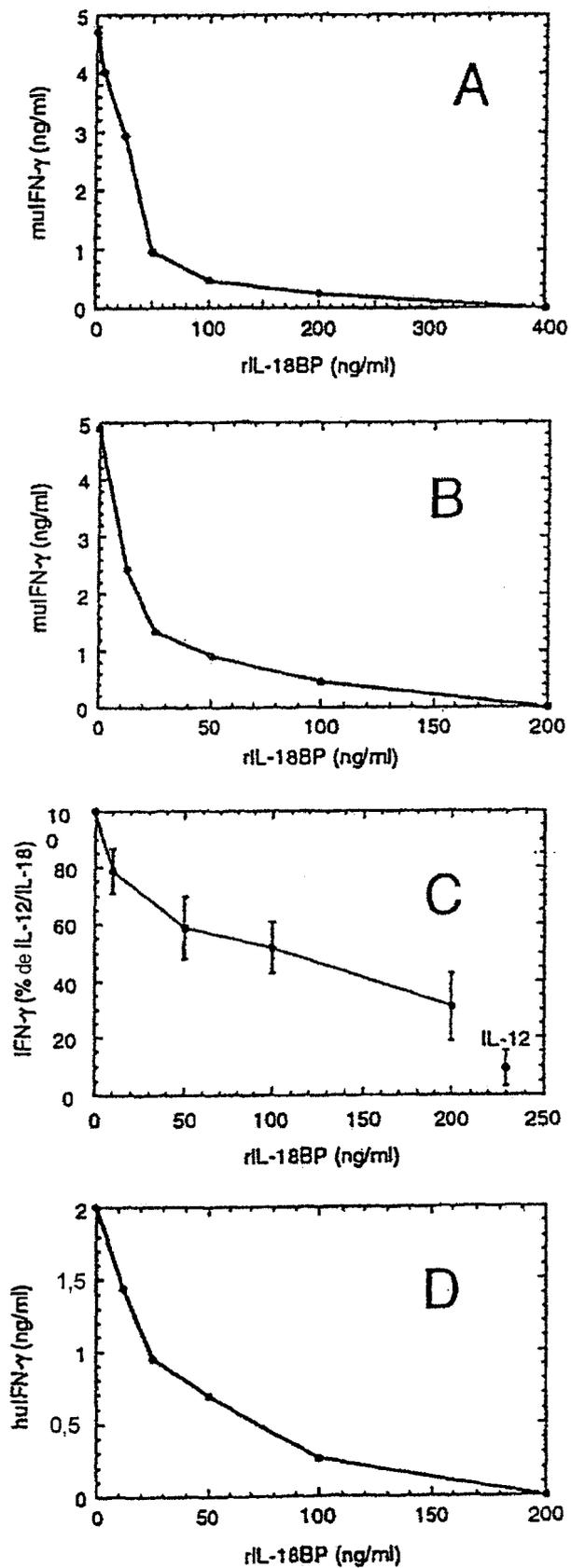


FIGURA 9 A-D

ES 2 149 149 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Novick, Daniela
Dinarello, Charles
5 Rubinstein, Menachem
Kim, Soo Hyun
Yeda Research and Development Co. Ltd.

10 <120> Proteínas de union a Interieuquin-18, su preparación y uso

<130> Rubinsteína IL-18

15 <140>
<141>

<150> 125463
20 <151> 1998-07-22

<150> 122134
<151> 1997-11-06

25 <150> 121869
<151> 1997-09-29

30 <150> 121639
<151> 1997-08-27

<150> 121554
35 <151> 1997-08-14

<160> 10

40 <170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 1348
<212> DNA
45 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

50 gagaagagga cgttgtcaca gataaagagc caggctcacc agctcctgac gcatgcatca 60
tgaccatgag acacaactgg acaccagacc tcagcccttt gtgggtcctg ctccctgtgtg 120
cccacgtcgt cactctcctg gtcagagcca cacctgtctc gcagaccacc acagctgcca 180
55 ctgcctcagt tagaagcaca aaggaccctt gccctccca gcccccagtg ttcccagcag 240
ctaagcagtg tccagcattg gaagtgacct ggccagaggc ggaagtgcca ctgaatggaa 300
cgctgagctt atcctgtgtg gcctgcagcc gcttccccaa cttcagcatc ctctactggc 360
tgggcaactgt tcccttcatt gagcacctcc caggccgacc gtgggagggg agcaccagcc 420

60

65

ES 2 149 149 T3

5 gggAACgtgg gagcacaggt acgCagctgt gcaaggcctt ggtgctggag Cagctgaccc 480
 ctgCccTgca CagcaccAAC ttctCctgtg tgctCgtgga ccctgaacag gttgtccagc 540
 gtcacgtcgt cctggcccag ctctgggctg ggctgagggc aacCttgccc cccacccaag 600
 aagccctgcc ctccagccac agcagTccac agcagCaggg ttaagactca gcacagggcc 660
 agcagcagca caacCttgac Cagagcttgg gtcctacctg tctacCtggA gtgaacagtc 720
 cctgactgcc tGtaggctgc gtggatgCgc aacacacccc ctCcttctct gctttgggtc 780
 ctttctctca ccaaattcaA actccattcc cacctaccta gaaaatcaca gcctccctat 840
 10 aatgCctcct cctCctgcca ttctctctcc acctatccat tagccttCct aacgtcctac 900
 tcctcacact gctctactgc tcagaaacca ccaagactgt tgatgcctta gccttgCact 960
 ccagggccct acctgCattt cccacatgac tttctggaag cctcccaact attcttgctt 1020
 ttccagaca gctcccaCtc ccatgtctct gctcatttag tcccgctctc ctCaccgccc 1080
 Cagcagggga acgctcaagc ctggttgaaa tgctgcctct tcagtgaagt catCctctt 1140
 15 Cagctctggc cgcattctgc agacttCcta tcttCgtgct gTatgtttt tttttcccc 1200
 ttCactctaa tggactgttc Cagggaggg atgggggcac Cagctgcttc ggatccacac 1260
 tGtatctgtg tCAtccccac atgggtcctc ataaaggatt attcaatgga aaaaaaaaaa 1320
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1348

<210> 2
 <211> 192
 <212> PRT
 25 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> SEÑAL
 30 <222> (1)..(28)

<400> 2

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

65

ES 2 149 149 T3

	Trp	Glu	Gly	Ser	Thr	Ser	Arg	Glu	Arg	Gly	Ser	Thr	Gly	Thr	Gln	Leu
			115				120						125			
5	Cys	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Glu	Gln	Leu	Thr	Pro	Ala	Leu	His	Ser	Thr
		130					135					140				
10	Asn	Phe	Ser	Cys	Val	Leu	Val	Asp	Pro	Glu	Gln	Val	Val	Gln	Arg	His
	145					150					155				160	
15	Val	Val	Leu	Ala	Gln	Leu	Trp	Ala	Gly	Leu	Arg	Ala	Thr	Leu	Pro	Pro
				165					170					175		
20	Thr	Gln	Glu	Ala	Leu	Pro	Ser	Ser	His	Ser	Ser	Pro	Gln	Gln	Gln	Gly
			180						185					190		

<210> 3

20 <211> 1038

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 3

		gagaagagga	cgttgtcaca	gataaagagc	caggctcacc	agctcctgac	gcatgcatca		60
30		tgaccatgag	acacaactgg	acaccagacc	tcageccttt	gtgggtcctg	ctcctgtgtg		120
		cccacgtcgt	cactctcctg	gtcagagcca	cacctgtctc	gcagaccacc	acagctgcca		180
		ctgcctcagt	tagaagcaca	aaggaccctt	gcccctccca	gccccagtg	ttcccagcag		240
		ctaagcagtg	tccagcattg	gaagtgacct	ggccagaggt	ggaagtgcc	ctgagctggg		300
		ctgagggcaa	ccttgcccc	cacccaagaa	gcctgcctt	ccagccacag	cagtccacag		360
35		cagcaggggt	aagactcagc	acagggccag	cagcagcaca	accttgacca	gagcttgggt		420
		cctacctgtc	tacctggagt	gaacagtcct	tgactgcctg	taggctgcgt	ggatgcgcaa		480
		cacacccctt	ccttctctgc	tttgggtccc	ttctctcacc	aaattcaaac	tccattccca		540
		cctacctaga	aaatcacagc	ctccttataa	tgctctctcc	tcttgccatt	ctctctccac		600
40		ctatccatta	gccttcttaa	cgctctactc	ctcacactgc	tctactgtct	agaaccacc		660
		aagactgttg	atgccttagc	cttgcactcc	agggccctac	ctgcatttcc	cacatgactt		720
		tctggaagcc	tccaacttat	tcttgctttt	cccagacagc	tcccactccc	atgtctctgc		780
		tcatttagtc	ccgtcttcc	caccgcccc	gcaggggaac	gctcaagcct	ggttgaaatg		840
		ctgcctcttc	agtgaagtea	tcctctttca	gctctggccg	cattctgcag	acttcctatc		900
45		ttcgtgctgt	atgtttttt	tttccccctt	cactctaatg	gactgttcca	gggaagggat		960
		gggggcacca	gctgcttcgg	atccacactg	tatctgtgtc	atccccacat	gggtcctcat		1020
		aaaggattat	tcaatgga						1038

50 <210> 4

<211> 113

<212> PRT

55 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> SEÑAL

60 <222> (1)..(28)

65

ES 2 149 149 T3

<400> 4

5 Met Arg His Asn Trp Thr Pro Asp Leu Ser Pro Leu Trp Val Leu Leu
 1 5 10 15

10 Leu Cys Ala His Val Val Thr Leu Leu Val Arg Ala Thr Pro Val Ser
 20 25 30

15 Gln Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ser Val Arg Ser Thr Lys Asp Pro
 35 40 45

20 Cys Pro Ser Gln Pro Pro Val Phe Pro Ala Ala Lys Gln Cys Pro Ala
 50 55 60

25 Leu Glu Val Thr Trp Pro Glu Val Glu Val Pro Leu Ser Trp Ala Glu
 65 70 75 80

30 Gly Asn Leu Ala Pro His Pro Arg Ser Pro Ala Leu Gln Pro Gln Gln
 85 90 95

35 Ser Thr Ala Ala Gly Leu Arg Leu Ser Thr Gly Pro Ala Ala Ala Gln
 100 105 110

40 Pro

<210> 5

35 <211> 7063

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

40 <400> 5

gaattcggcg ccgcgctcgac gccagagggg ctaggatgag agacagaggg tgtgatgggtg 60
 ggtgctggga aatgtacccg accttggggc tggtagctgg gggagtgggt agcctgggaa 120
 45 aggccaggat gtggacggac tggtaggca ttgagcctga agtgggtcaa cttgggggtc 180
 cccagtgcct aggaaagtgt tccccttgaa tgtcagtgtg aaggtgaagg aggaagcaga 240
 tgcctgttca ratggaaca aagacctggc tgtgaagagg ggaggcggac accaaagtcc 300
 tgacacttgg gcgggacaga attgatctgt gagagactca tctagtcat accctagggtg 360
 50 accctggggg tggcatgggg gtagattaga gatcccagtc tggtagcttc tggagagtag 420
 gagtcccagg agctgaaggt ttctggccac tgaactttgg ctaaagcaga ggtgtcacag 480
 ctgctcaaga tccctgggtt aaaaagtgaa agtgaaatag agggtcgggg cagtgtcttc 540
 ccagaaggat tgctcggcat cctgcccttc ccagaagcag ctctgggtgct gaagagagca 600
 55 ctgcctccct gtgtgactgg gtgagtccat attctctctt tgggtctcaa ttttgccttc 660

60

65

ES 2 149 149 T3

cctaataag ggtaagatt ggactaggta agcatcttac aaccatttgt ggtcatgaga 720
 gctgggggtg ggaaggattg tcacttgacc cccccagctc tgtttctaag tgctgaaga 780
 gctccaggct atgctacggg aggagaagcc agctactgag gaaaagccag ctactgagaa 840
 5 aaagcgggag tggtttacca ttctctccc ccaccttca ccagagaaga ggacgttctc 900
 acacataaag agccaggctc accagctccc gacgcatgca tcatgaccat gagacacaac 960
 tggacaccag acctcagccc tttgtgggtc ctgctcctgt gtgcccacgt cgtcacctc 1020
 ctggtcagag ccacacctgt ctgcagacc accacagctg cactgcctc agttagaagc 1080
 10 acaaaggacc cctgccccct ccagccccca gtgttcccag cagctaagca gtgtccagca 1140
 ttggaagtga cctggccaga ggtggaagtg cactgaatg gaacgctgag cttatcctgt 1200
 gtggcctgca gccgcttccc caacttcagc atcctctact ggctgggcaa tggttcctc 1260
 attgagcacc tcccaggccg actgtgggag gggagcacca gccgggaacg tgggacaca 1320
 ggtgacgagc tgtgcaaggc cttggtgctg gagcagctga cccctgccct gcacagcacc 1380
 15 aacttctccc tggtagctgt ggacctgaa caggtgtcc agcgtcacgt cgtccctggc 1440
 cagctctggg tggagagccc aaggagaggc ctccaggaac aggaggagct ctgctccat 1500
 atgtcgggag gaaagggtgg gctctgccag agcagcctgt gaactaatgc ccagcaacc 1560
 tcaaggctcag ccagacaaaa aggaacttag gtcttgggca gaggaggtgt agcctggggc 1620
 20 aaagtgatga gatgtcccct cttctcttgg cctgatcctt gtctgcctc acttcccctag 1680
 gctgggctga gggcaacctt gccccacc caagaagccc tgcctccag ccacagcagc 1740
 ccacagcagc agggttaaga ctcagcacag ggccagcagc agcaaacct tgaccagagc 1800
 ttgggtctca cctgtctacc tggagtgaac agtccctgac tgctgtagg ctgctggat 1860
 25 gcgcaacaca cccccctt ctctgcttgg ggtccctct ctcaaccaat tcaaaccca 1920
 tccccacctc cctagaaaat cacagcctcc ttataatgcc tcctcctcct gccattctct 1980
 ctccacctat ccattagcct tctaactgtc ctactcctca cactgctcta ctgctcagaa 2040
 accaccaaga ctgttgatgc cttagccttg cactccaggg cctacctgc attcccaca 2100
 tgacttctct gaagcctccc aactattctt gcttttccc gacagctccc actcccatgt 2160
 30 ctctgctcat ttagtccctt cttcctcacc gccccagcag ggaacgctc aagcctgggt 2220
 gaaatgctgc ctcttcagtg aagtcatcct ctttcagctc tggccgcatt ctgcagactt 2280
 cctatctctg tgcctgatgt ttttttttc cccctcact ctaatggact gttccaggga 2340
 agggatgggg gcagcagctg cttcggatcc aactgtatc tgtgtcatcc ccacatgggt 2400
 35 cctcataaag gattattcaa tggaggcatc ctgacatctg ttcatattag cttcagctcc 2460
 actcccagga actttgctc tcccacgagg gagtatggga gagatggact gccacacaga 2520
 agctgaagac aacacctgct tcaggggaac acaggcgctt gaaaaagaaa agagagaaca 2580
 gcccaataag ctccccggga gcagaggcca ctaatggaga gtgggaagag cctggaaaqa 2640
 tgtggcctca ggaaaaggga tgagagaaa gagggtggtat ggaagactca gcaggaaca 2700
 40 ggtaggcttc aaagagccta tttctctct tttcccacac cgatcaagtc aactcagrac 2760
 tcacgggaga aaaatagact ttatttaca gtaataacat ttagaaaaga tccatccccg 2820
 gccctaaaa accttcccat cactccaaat cccaccccag tgcaagtctg ggaaggtag 2880
 ggtgtcagct gctgctgaag gctgtcccc aaccacctc ctgagacaca gggcccatcc 2940
 45 gtccctggaa agagcatcct ctggcaggtg ctcccaccag gtcagacca gtctggact 3000
 tcaagagtga gggccctgc tggcccagc caccaggaca gcaggaacca gggcctactc 3060
 ctcttatggt ccttctaga tccagaggct aagaggaaga ctggccaggc ccaaggacc 3120
 agccatcaaa accagcctca aatctggtt tgatggagaa gtgactttgc ttaagaaaa 3180
 aaggaggcaa ggtagggaga gcgcccacac tgtccatgct ccaggcccc tggccagct 3240
 50 ccgagaaggc gccagtgaag gaccaggac caggccaggg tgcgggcagg catcactgtc 3300
 tetagggtt tggctactgt tggcctggga gctgagagaa ggcactgaga gggacagtag 3360
 gcggaggacc aggtgacggc agcatcgggg acacaggtgg ggcactcac tggctactgc 3420
 cctttagtgc tttgctgaa agagacacag tcacatggcc agatgagaac ttgcgatact 3480
 55 agcctgcacc cactggctgg gaagatctct tcctgctccc acgcccctgt ctggatcccc 3540

60

65

ES 2 149 149 T3

1 ccccttgtga gccccagggg taccagttgc tggctgtgcc tgagcagctc tgggtgctct 3600
 2 ccatgagaat ggggccatct gtcttctctc cttggagagg agctaccagg acagggacac 3660
 3 ctcttaccac acaccctcca gcagcctggc gtggcccat cttggatgct acttgggtggg 3720
 5 gcggctctggg gggtgcccat gctctcatcg ggtttccctc cccatcctg ccagtgcctc 3780
 6 taccttgccc ttggctcgag gggtgccacc aatggcggca gcagtggcgg cgctggctgt 3840
 7 ggtggtggca atgcgaggag aacggcgggt tccactgcga gtgttggggg aagccttga 3900
 8 cagggccttc ttgaggctc cccgcccag aaggctgttc cctagcttct tgggtgtgtt 3960
 9 gaggtctctg aagccatcg actggcggc gtccagcctgc aaggaagggc tgtcagaccg 4020
 10 ggagacccaa tgcctcctc ccaggccagc gtgctgtgcc acgctgtacc agcaaggctc 4080
 11 cgccaggcgg tcgcttcatc ccccttcagc cccagcctca cctgtttagt agaagctgga 4140
 12 gctgcttctc tctgggctc agtagtgctc tgtttgcgcc cttcatgtcg gtctcgggga 4200
 13 gtcattgggg gtgggaaaca gctggtggcc ttcttagact atggagaaga ggacagttag 4260
 15 gcagacagta gcaaggagg tcacatctga agccagggtg cttgtcctct cagagctgag 4320
 16 tggacctgtt aagtcaact gcaacctgct ccccttccca actctggggc agatccttcc 4380
 17 ctccccaaac gttcccatcc atgggtcagg ccttgggaga gagggaaaga gagggggaag 4440
 18 tgagggaaag agagagaagg ctccctttag tcttgggtga gctgggctg acctgagcac 4500
 20 agtgcctggg taacaccag gagccaccgc gcctacctca ggagttccag ggccttgggt 4560
 21 gggctctagg gagaccctt tgcgctgctg ccgggtgggt atgccagtgc cctcgctat 4620
 22 ctggattggc tgcattgctg ctgcgagcag ggtctcttgg gggcttccag tttcatctc 4680
 23 ctcatctgtg atggtgcca ggctcaggga aggctgcatg ggtggaagag gtggtcagtg 4740
 24 gaccatagct gataggagat ggaggaggac ctggggctgt tccagaactc taccctcggc 4800
 25 cgacacttat ggtcgggacc cttcctgctc acgaggtaga aagacacaag cctccttcc 4860
 26 tgttctgctt ttaccctaag ccttgggcaa atggcacaag cagtgcagtc ctgaccagat 4920
 27 tccctctctg gttcctgctc acccccaggg acttcacccc tgagtgcctc ccagctgtct 4980
 28 gttccacctg gaacatgaga aggtcaccctc ttcccctctt cggccagtca gtgatccagg 5040
 30 gccctagtgc tcaggctaga tcagcagggt ggattccaag gaagggcagg gatgggaggc 5100
 31 cctgcacagt gaccccaggc ctaccctgg actccaggga tagcaggctc tcagatgtgg 5160
 32 ggggacacact cgattgcgct gctgcagctc tgcaatgagg ttccagtcac ccagctgtct 5220
 33 aggetcatcc tggcaagtgc ccatgtagaa gctgttctt cctgtggaag gcaggggaagt 5280
 34 gggaaacaaat gagcctggag tggcagggtc acctcctggc cctggcatct tgccagcct 5340
 35 tgctgcacc taccataaa actgaagcc cggcacacca gctgattca gtgcccagc 5400
 36 tgcaggagta cggcacacag actatttcta tccatggggc ttgctacca ccttctcct 5460
 37 gtagagggca gaagaggta cacgcagaga ctgctactac atcttattca cctgccaagg 5520
 38 cttggtggcc aacaccaga ggaacaaat aaggaccggg aattaattcc caggggctcc 5580
 40 ctggtgcca aaggacaaga gctccaaga agagtctggc cagcctggcc ttccagcag 5640
 41 cccatcaccg cctgagaagg gcatggagga ctccccacag ctaagtgtca caattgtgct 5700
 42 gggaaatccg gcccctaac tctggctaag agtgcacca acacagccag cccctagatg 5760
 43 ggcaggtaag gaaggccctg aggctgcagg aaggagggc aggtggagct gcatggtagc 5820
 44 aaggaggcca gccttgatt ttaaaaagc tttcctctt tccctgtgcc acgatccacc 5880
 45 ttccagtcta attttgggt atagtaagtc cctgtagtcc cctcacctgg aggggcccc 5940
 46 ctggacaccc cggcctggga acgacgagca gaactgagag tgggtggggc gtagccaggc 6000
 47 aagctgagca gggctgagtt gccataatcg ggagaacca ggcgagctag agactgagta 6060
 48 gaggggtgg ctgcaggct agcctgggaa gcaggagcag accgctgct gtagaacgat 6120
 50 gatttggcgc tgtctgctc ttccatctc agcttctgga agacagagtg aatctgttc 6180
 49 agtgtacagt cctggcact gtacagaagc ttcccattcc cttccgaagc cctcagatcc 6240
 51 cacggcacat ccatgtattc ccaactgctt tgcaaaggtc cttaaagtgt gtgtctgcaa 6300
 52 gaaatgggcc ttgtcgacag aagccctcac aagggtgtgc tgatgtgtc aagactctc 6360
 55 tacgcatttt tttcatggag tctattcata atgctttgag gtagggaatg cagagtgtt 6420

ES 2 149 149 T3

```

atcggcccat tttggagatg aagtgcaaag aaataaagtg actagcccca aatcacactg 6480
ctaggaagta tcagagctgg ggctaggccc catgtctcct gactagtcag gctcatccca 6540
cagcctctgc tgtccctcag tccaaacttc cagggccctt accatgttcc agaacttccc 6600
5 ccaacttctt ggtagcaggg ggcaccctaa acacacaggt ccccctgct gtaccagggg 6660
ccccctctcc cctctccca aacctcccct tcaagatgtg gaaacaaagg caagggcctg 6720
cagcctgtca ggcagtccac tgggcagcaa caatgcctct cagctgcatg gggcatgctg 6780
ggaggcacag gatgggctgc agcttcgcca cgttctctcc cttcaccctg cacaggtca 6840
10 gtgctacgca tggagagaat gctagcctta gtcaggaggc agggatctaa tcctagccct 6900
gcctttttct tcagaagtgc ccttaaccaa gtcactgcc tttttaagac ctctcagctt 6960
tcccactgta acatggactg gctgctcadc cctccctgct cctgactgag tgcccagtgc 7020
aaagatgccc ttgagaggaa gtgggaattg ctgacctgac gac 7063

```

```

15 <210> 6
    <211> 197
    <212> PRT
20 <213> Homo sapiens

    <220>
    <221> SEÑAL
25 <222> (1)..(28)

    <400> 6

```

```

30 Met Arg His Asn Trp Thr Pro Asp Leu Ser Pro Leu Trp Val Leu Leu
    1 5 10 15

    Leu Cys Ala His Val Val Thr Leu Leu Val Arg Ala Thr Pro Val Ser
35 20 25 30

    Gln Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ser Val Arg Ser Thr Lys Asp Pro
40 35 40 45

    Cys Pro Ser Gln Pro Pro Val Phe Pro Ala Ala Lys Gln Cys Pro Ala
45 50 55 60

    Leu Glu Val Thr Trp Pro Glu Val Glu Val Pro Leu Asn Gly Thr Leu
50 65 70 75 80

    Ser Leu Ser Cys Val Ala Cys Ser Arg Phe Pro Asn Phe Ser Ile Leu
55 85 90 95

    Tyr Trp Leu Gly Asn Gly Ser Phe Ile Glu His Leu Pro Gly Arg Leu
60 100 105 110

    Trp Glu Gly Ser Thr Ser Arg Glu Arg Gly Ser Thr Gly Thr Gln Leu
65 115 120 125

    Cys Lys Ala Leu Val Leu Glu Gln Leu Thr Pro Ala Leu His Ser Thr
70 130 135 140

```

65

ES 2 149 149 T3

<400> 8

5 Met Arg His Asn Trp Thr Pro Asp Leu Ser Pro Leu Trp Val Leu Leu
1 5 10 15

10 Leu Cys Ala His Val Val Thr Leu Leu Val Arg Ala Thr Pro Val Ser
20 25 30

15 Gln Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ser Val Arg Ser Thr Lys Asp Pro
35 40 45

20 Cys Pro Ser Gln Pro Pro Val Phe Pro Ala Ala Lys Gln Cys Pro Ala
50 55 60

25 Leu Glu Val Thr Trp Pro Glu Val Glu Val Pro Leu Asn Gly Thr Leu
65 70 75 80

30 Ser Leu Ser Cys Val Ala Cys Ser Arg Phe Pro Asn Phe Ser Ile Leu
85 90 95

35 Tyr Trp Leu Gly Asn Gly Ser Phe Ile Glu His Leu Pro Gly Arg Leu
100 105 110

40 Trp Glu Gly Ser Thr Ser Arg Glu Arg Gly Ser Thr Gly Trp Ala Glu
115 120 125

45 Gly Asn Leu Ala Pro His Pro Arg Ser Pro Ala Leu Gln Pro Gln Gln
130 135 140

50 Ser Thr Ala Ala Gly Leu Arg Leu Ser Thr Gly Pro Ala Ala Ala Gln
145 150 155 160

55 Pro

<210> 9

45 <211> 7812

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

50

55

60

65

ES 2 149 149 T3

<400> 9

	gtcgcgsgta	ccccgggaa	agatttaata	cgactcacta	tagggcggga	cagaattgat	60
5	ctgtgagaga	ctcatctagt	tcatacccta	ggtgaccctg	ggggggcat	gggggtagat	120
	tagagatccc	agtctggtat	cctctggaga	gtaggagtcc	caggagctga	aggtttctgg	180
	ccactgaact	ctggctaaaag	cagaggtgtc	acagctgctc	aagattccct	ggttaaaaag	240
	tgaaaagtga	atagaggttc	ggggcagtgc	tttcccagaa	ggattgctcg	gcatcctgcc	300
	cttcccagaa	gcagctctgg	tgctgaagag	agcactgcct	ccctgtgtga	ctgggtgagt	360
10	ccatattctc	tctttgggtc	tcaattttgc	cttcccta	gaaggggtaa	gattggacta	420
	ggtaagcacc	ttacaacat	ttgtggtcat	gagagctggg	gtggggaagg	attgtcactt	480
	gacccccca	gctctgtttc	taagtgtgta	aagagctcca	ggctatgcta	cgggaggaga	540
	agccagctac	tgaggaaaag	ccagctactg	agaaaaagcg	ggagtgggtt	accattctcc	600
15	tccccacct	ttcaccagag	aagaggactg	tgtcacacat	aaagagccag	gctcaccagc	660
	tcctgacgca	tgcatcatga	ccatgagaca	caactggaca	ccaggtaggc	cttggggcta	720
	cgcctgggca	ggcggggtag	ggtaggtct	atgaacagaa	tgagcaatg	ggctaaccgg	780
	gagccttcc	tccaaggcaa	accaccagc	gcacctggtg	ctgttgcttt	aagaacctgg	840
20	gcagataatg	tagctctggc	tccagtctaa	agcttctctg	tactctgttc	aataaagggc	900
	taaggggtgg	gtgctgaggg	gtccctcttc	ccgctctgat	tccctggcta	gaaccagac	960
	atctctgggc	tgaggttaca	tccttaccgg	ggcagcccac	tctgtctcca	gagccctgta	1020
	cctgtaactg	tcctttcctc	agaccctcagc	cctttgtggg	tccctgtcct	gtgtgcccac	1080
	gtcgtcactc	tcctggtcag	agccacacct	gtctcgcaga	ccaccacagc	tgccactgcc	1140
25	tcagttagaa	gcacaaagga	cccctgcccc	tcccagcccc	cagtgttccc	agcagctaag	1200
	cagtgtccag	cattggaagt	gacctggcca	gaggtggaag	tgccactgag	taagaagcac	1260
	agtgtgggag	ggtgggctat	gggcacagag	gttcccaggg	tcgggttgac	tcctgagcgc	1320
	cagtccccct	ctgcccctgt	accaccagct	gagccagctg	ggctgagcac	gcaccattct	1380
30	ccctcccaaa	ccagtgctca	tgggtgcagg	cttgggcgag	ctccaagat	gtccctatc	1440
	aaataggaca	gagaactcaa	gacataagta	atggtcacag	gacctcccag	agccttgggt	1500
	gcagtgagcc	ccaaggccag	cccctccacc	cagagcctgc	tgccctctgg	ccatctcaga	1560
	ggagcagcag	ccatccagca	ctgcctctgt	cacctgggct	ccaagtccac	cgaggctggg	1620
35	cactagaaaa	ggtcatcctg	aggagacagg	ttcagaagag	gattcatcac	gtgaaccaag	1680
	gaccattcct	caatttccc	gtgtttaggg	ctagggcctc	tcggagacaa	ctgcacttct	1740
	gtaacggacg	ttcccaccta	ggtggtgtgc	agagcagttc	tctaggttcc	agatgcatgg	1800
	gttagggggg	taactgctgc	ctgtgtccct	agatggaacg	ctgagcttat	cctgtgtggc	1860
40	ctgcagccgc	ttcccact	tcagcatcct	ctactggctg	ggcaatggtt	ccttcattga	1920
	gcacctccca	ggccgactgt	gggaggggag	caccaggtga	gggtcgcagc	agccaggtgg	2040
	gtgggaagga	agccttctgc	ggccttctca	tgaccttccc	tcccctccg	ctccagccgg	2100
	gaacgtggga	gcacaggtac	gcagctgtgc	aaggccttgg	tgetggagca	gctgacctct	2160
45	gccctgcaca	gcaccaactt	ctcctgtgtg	ctcgtggacc	ctgaacaggt	tgtccagcgt	2220
	cacgtcgtcc	tgcccagct	ctgggtgagg	agcccaagga	gaggcctcca	ggaacaggag	2280
	gagctctgct	tccatagtgt	gggaggaaag	ggtgggctct	gccagagcag	cctgtgaact	2340
	aatgcccagc	attcctcaag	gtcagccaga	caaaaagga	cttaggtctt	gggcagagga	2400
	ggtgtagcct	ggggcaaagt	gatgagatgt	ccctccttcc	cttggcctga	tccttctctg	2460
50	ccttcacttc	cctaggctgg	gctgagggca	accttgcccc	ccaccaaga	agccctgccc	2520
	tccagccaca	gcagtcaca	gcagcagggt	taagactcag	cacagggcca	gcagcagcac	2580
	aaccttgacc	agagcttggg	tcctacctgt	ctacctggag	tgaacagtcc	ctgactgctt	2640
	gtaggctgcg	tgatgctgca	acacaccccc	tccttctctg	ctttgggtcc	cttctctcac	2700
55	caaattcaaa	ctccattccc	acctacctag	aaaatcacag	cctccttata	atgcctcctc	2760
	ctcctgccat	tctctctcca	cctatccatt	agccttccca	acgtcctact	cctcacactg	2820
	ctctactgct	cagaaaccac	caagactggt	gatgccttag	ccttgactctc	cagggcccta	2880
	cctgcatttc	ccacatgact	ttctggaagc	ctcccacta	ttcttgcttt	tcccagacag	2940
60	ctcccactcc	catgtctctg	ctcatttagt	cccgtcttcc	tcaccgcccc	agcaggggaa	3000

65

ES 2 149 149 T3

cgctcaagcc tggttgaaat gctgcctctt cagtgaagtc atcctctttc agctctggcc 3060
 gcattctgca gacttcctat ctctgtgctg tatgtttttt ttttccccct tcaacttaat 3120
 ggactgttcc agggaaagga tgggggcagc agctgcttcg gatccacact gtatctgtgt 3180
 5 catccccaca tgggtcctca taaaggatta ttcaatggag gcatcctgac atctgttcat 3240
 ttaggcttca gttccactcc caggaacttt gcctgtccca cgagggagta tgggagagat 3300
 ggactgccac acagaagctg aagacaacac ctgcttcagg ggaacacagg cgcttgaana 3360
 agaaaagaga gaacagccca taatgctccc cgggagcaga ggccactaat ggagagtggg 3420
 10 aagagcctgg aaagatgtgg cctcaggaaa agggatgaga gaaaggaggt ggtatggaag 3480
 actcagcagg aacaaggtag gcttcaaaga gcctatattc ctctttttcc cacaccgatc 3540
 aagtcaactc agtactcacg ggagaaaaat agactttatt tacaagtaat aacattttaga 3600
 aaagatccat ccccgccct taaaaacctt cccatcactc caaatcccac cccagtgcaa 3660
 15 gctcggggaa ggtagggtgt gactgtctgc tgaaggctgt cccccaaccc cactcctgag 3720
 acacagggcc catccgtcct gggaaagagc atcctctggc aggtgctccc accaggtcag 3780
 acccagtcct ggacttcaag agtgagggcc cctgctgggc ccagccacca ggagactggc 3840
 aaccagggcc tactcctctt atggtccctt ctatgaccag aggtcaagag gaagactggc 3900
 caggcccaag gaccagcca tcaaaaccag cctcaaactt ggttgtgatg gagaagtgc 3960
 20 tttgtttta gaaaaagga ggcaaggtag ggagagcc cactgtcc atgtccagg 4020
 cccctgggc cagctccgag aaggcccaag tgaaggacca gggaccaggc cagggtgagg 4080
 gcaggcatca ctgtctcag ggtctggct actgttggcc tgggagctga gagaaggcac 4140
 tgagagggac agtagccga ggaccagtg acggcagcat cggggacaca ggtggggcca 4200
 25 ctcaactgga ctggccctt agtgccttgc ctgaaagaga cacagtcaca tggccagatg 4260
 agaacttgag atactagcct gacccactg gctggaaga tctcttctg ctcccagcc 4320
 cctgtctgga tcccctccct tgtgagccc aggttatca gttgctggct gtgctgagc 4380
 agctctgggt gctctccatg agaatggggc catctgtctt ctctccttg agaggagta 4440
 ccaggacagg gacacctctt accccacacc ctccagcagc ctggcgtggc cccatcttg 4500
 30 atgctacttg gtggggcggg ctgggggggt cccatgctct catcgggttt ccctcccca 4560
 tctgcccagt gcctctacct tgccttggc tcgaggggtg gcaccaatgg cggcagcag 4620
 ggcggcgtg gctgtggtgg tggcaatgag cggagaacgg cgggttccac tgcgagtgt 4680
 gggggaagcc ttggacagg ccttcttga ggctccccgc cgcagaaggc tgtcccctag 4740
 35 cctcttgggt gtgtgagga tgcgaaggc catcagctgg cgcgggtcag cctgcaagga 4800
 agggctgtca gaccgggaga cccaatgctg ccttcccagg ccagcgtgct gtgccacgct 4860
 gtaccagcaa ggtcccgcc gggcgtcgt tcatccccct tcagccccag cctcacctgt 4920
 ttagtagaag ctggagctgc tttctctgg gcctcagtag tgcctgttt gcgccctca 4980
 40 tgtcggctct ggggagctat gggcgtggg aaacagctgg tggccttctt agactatgga 5040
 gaagaggaca gttaggcaga cagtagcaag aggatcaca tctgaagcca ggtgtctgt 5100
 cctctcagag ctgagtggac cttgtaagtc aacgtgcaac ctgctcccct tcccactct 5160
 gggccagatc ctccccctcc caacagttcc catccatggg tcaggccctt ggagagagg 5220
 aaagagagg ggaagtgagg gaaggagaga gaaggctccc tttagtctt ggtgagctgg 5280
 45 gcctgacctg agcacagtgc tggagtaaca cccaggagcc accgcgccta cctcaggagt 5340
 tccagggccc tgggtgggct ctaggagagc cgtttgccc tgcctccggg tggtagtgc 5400
 agtgccctcg gctatctgga ttggtgcat gctggctcgg cgcagggtct cttgggggtc 5460
 tccagttttc atctcctcat ctgtgatggt gccaggctc agggaaaggct gcatgggtg 5520
 50 aagaggtggt cagtggacca tagctgtatg gagatggagg aggacctggg gctgttccag 5580
 aactctacac tcgccogaca cttatggtcg ggacccttcc tgcctacgag gtgaaagac 5640
 acaagcctcc tttcctgttc tgctttctac ctaagccctg ggcaaatggc acaagcagt 5700
 cagtcctgac cagattcctc tctgagctcc tgcctacccc cagggacttc acccctgagt 5760
 gccctccagc tgtctgttcc acctggaaca tgagaaggc accccttccc ctcttggcc 5820
 55 agtcagtgat ccaggccct agtgcctcag ctatgacagc aggtgggatt ccaaggaag 5880

60

65

ES 2 149 149 T3

gcagggatgg gaggccctgc acagtgaccc caggcctcac cctggactcc agggatagca 5940
 ggtcctcaga tgtggggggc aactctgatt gcgctgctgc agctctgcaa tgcgggtcca 6000
 gtcattccagc tgctcaggct catcctggca agtgcccatg tagaagctgt tccttcctgt 6060
 5 ggaaggcagg gaagtgggaa caaatgagcc tggagtccgc aggtcacctc ctggccctgg 6120
 catcctgcca gcctttgctg ccacctaccc cataaacttg aagcccggca caccagctctg 6180
 attcagtgcc gcaggtgcag gagtacggca cacagactat ttctatccta ggggcttget 6240
 caccaccttc tccctggaga gggcagaaga ggtcacacgc agagactgct actacatctt 6300
 10 attcacctgc caaggettg tggccaacac ccagaggaac aaattaagga ccgggaatta 6360
 attcccaggg gctccctggt gcccaaagga caagagcttc caagaagagt ctggccagcc 6420
 tggcctttcc agcagccat caccgcctga gaagggcatg gaggactccc cacagctaa 6480
 tgtcacaatt gtgctgggaa tcccgggcc ttaactctgg ctaagagtgc cccaacaca 6540
 gccagcccct agatgggag gtaaggaagg ccctgaggct gcaggaagga ggggcagggt 6600
 15 gagctggatg gtagcaagga gcccagcctt ggatttttaa aaagctttcc tcttttccct 6660
 gtgccacgat ccacctcca gtctaatttt ggggtatagt aagtccctgt agtcccctca 6720
 cctggagggg ccccactgga cccccggcc tgggaacgac gagcagaact gcgagtgggt 6780
 gggcggtagc caggcaagct gagcagggt gagttgccat aatcgggaga acccaggcga 6840
 20 gctagagact gagtagagga ggtggctcgc aggctagcct gggaaagcagg agcagaccgc 6900
 gtgctgtaga acgatgagtt ggcgctgtct ggctcttcca catctagctt ctggaagaca 6960
 gagtgaatcc gttgcagtgt acagtccctg gcaactgtaca gaagcttccc attcccttcc 7020
 gaagccctca gatcccacgg cacatccatg tattcccaac tgctttgcaa aggtccttaa 7080
 25 agtgctgtgc tgcaagaaat gggcctgtgc gacagaagcc ctcaacaagt ggtgctgatg 7140
 ttgtcaagac tcttctacgc attttttcca tggagtctat tcataatgct ttgaggtagg 7200
 gaatgcagag tgtttatcgg cccattttgg agatgaagtg caaagaaata aagtgactag 7260
 ccccaaatca cactgctagg aagtatcaga gctggggcta ggccccatgt ctctgacta 7320
 gtcaggctca tcccacagcc tctgctgtcc ctcagtccaa acttccaggg cccttaccat 7380
 30 gttccagaac ttccccaac ttcttggtag cagggggcac cctaaacaca cagggtcccc 7440
 ctgctgtacc aggggcccc tctcccctcc tcccacact ccccttcaag atgtggaaac 7500
 aaaggcaagg gcctgcagcc tgctcaggag tccactgggc agcaacaatg cctctcagct 7560
 gcatggggca tgctgggagg cacaggatgg gctgcagctt cgccacgttc tctcccttca 7620
 35 ccctgcacag gctcagtgct acgcatggag agaatgctag ccttagtcag gaggcagga 7680
 tctaatecta gccctgcctt tttcttcaga agtgccctta accaagtcac tgcccttttt 7740
 aagacctctc agctttccca ctgtaacatg gactggctgc tcateccctc ctgctcctga 7800
 ctgagtgccc ag 7812

40 <210> 10

<211> 40

<212> PRT

45 <213> *Homo sapiens*

<400> 10

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

60

65