

# PATENTOVÝ SPIS

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2000-490**  
(22) Přihlášeno: **13.08.1998**  
(30) Právo přednosti: **14.08.1997** IL 1997/121554  
**27.08.1997** IL 1997/121639  
**29.09.1997** IL 1997/121860  
**06.11.1997** IL 1997/122134  
**22.07.1998** IL 1998/125463  
(40) Zveřejněno: **16.08.2000**  
**(Věstník č. 8/2000)**  
(47) Uděleno: **08.07.2009**  
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **19.08.2009**  
**(Věstník č. 33/2009)**  
(86) PCT číslo: **PCT/IL1998/000379**  
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1999/009063**

(11) Číslo dokumentu:

## 300 818

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

*C07K 14/715* (2006.01)  
*C07K 14/435* (2006.01)  
*C07K 14/54* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*C12N 15/12* (2006.01)  
*A61K 31/711* (2006.01)  
*A61K 38/00* (2006.01)  
*A61K 38/17* (2006.01)  
*A61K 48/00* (2006.01)  
*A61P 3/10* (2006.01)  
*A61P 9/10* (2006.01)  
*A61P 17/06* (2006.01)  
*A61P 19/02* (2006.01)  
*A61P 25/00* (2006.01)  
*A61P 43/00* (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

EP 1003781.

databáze EMBL, accession number AA311795, 18.4.1997; databáze EMBL, accession number AA010059, 2.8.1996; databáze EMBL, accession number AA297872, 18.4.1997.

(73) Majitel patentů:

YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT  
COMPANY LTD., Rehovot, IL

(72) Původce:

Novick Daniela, Rehovot, IL  
Dinarello Charles, Boulder, CO, US  
Rubinstein Menachem, Givat Shmuel, IL  
Kim Soo Hyun, Rehovot, IL

(74) Zástupce:

JUDr. Zdeňka Korejzová, Spálená 29, Praha 1, 11000

(54) Název vynálezu:

**Interleukin-18-vazebné proteiny, příprava a použití**

(57) Anotace:

Interleukin-18-vazebné proteiny, které jsou schopné vázat IL-18 a/nebo modulovat a/nebo blokovat aktivitu IL-18. Způsoby pro jejich izolaci a rekombinantní produkci, molekuly DNA, jež je kódují, DNA vektory, jež je exprimují, vektory použitelné pro jejich expresi v lidech a jiných savcích a protilátky protinim namířené. Farmaceutické prostředky s jejich obsahem.

**CZ 300818 B6**

## Interleukin-18 – vazebné proteiny, příprava a použití

### Oblast techniky

5 Předkládaný vynález se týká proteinu vázajícího interleukin-18 (IL-18), dále zde označovaného IL-18BP, který je schopen vázat s IL-18. Tento vynález se zejména týká solubilního IL-18BP, který lze získat z tělesných tekutin, solubilních IL-18BP, které lze získat expresí vhodných DNA vektorů v hostitelských buňkách, virem kódovaných homologů IL-18BP, které lze získat expresí vhodných DNA vektorů v hostitelských buňkách, vektorů exprimujících různé IL-18BP, vektorů využitelných k expresi IL-18BP u lidí a jiných savců, protilátek proti proteinům IL-18BP, terapeutického použití řečených IL-18BP spočívajícího v modulaci a/nebo blokování aktivity IL-18, terapeutického použití řečených expresních vektorů při modulaci a/nebo blokování aktivity IL-18 a použití protilátek.

### Dosavadní stav techniky

15 V r. 1989 byla v séru myši popsána aktivita, indukovaná endotoxinem, která byla schopná indukovat interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) v kulturách myších slezinných buněk (Nakamura et al., 1989, *Infect-Immun.* 57:590-595). Tato sérová aktivita působila nikoli jako přímý induktor interferonu IFN- $\gamma$ , ale spíše jako kostimulátor, společně s IL-2 nebo s mitogeny. Purifikací aktivity ze séra myši vystavené šoku endotoxinem byl nalezen zdánlivě homogenní protein o velikosti 50-55 kDa (Nakamura et al., 1993, *Infect-Immun.* 61:64-70). Jako kostimulátory tvorby IFN- $\gamma$  mohou působit i jiné cytokiny, avšak skutečnost, že působením neutralizujících protilátek proti IL-1, IL-4, IL-5, IL-6 nebo TNF nedošlo k neutralizaci této sérové aktivity naznačuje, že se jedná o odlišný faktor. V r. 1995 prokázali stejní badatelé, že endotoxinem indukovaný kostimulátor tvorby IFN- $\gamma$  je přítomen v extraktech jater myši, které byly předtím inokulovány bakterií *P. acnes* (31). V tomto modelu dochází k expanzi populace jaterních makrofágů (Kupfferových buněk) a malá dávka bakteriálního lipopolysacharidu (LPS), jež u myši, které neobdrželi injekci *P. acnes* není letální, se u těchto myši stává letální. Faktor, nazvaný IFN- $\gamma$ -indukující faktor (IGIF) a později označený jako interleukin-18 (IL-18), byl vyčištěn do homogenity z 1200 g jater myši inokulovaných *P. acnes*. Z částečných aminokyselinových sekvencí purifikovaného IL-18 byly odvozeny degenerované oligonukleotidy a ty byly použity ke klonování myši IL-18 cDNA (Okamura et al., 1995, *Nature* 378:88-91). IL-18 je 18-19 kDa protein obsahující 157 aminokyselin, který nevykazuje žádnou zjevnou podobnost s žádným proteinem v databázích. Molekuly mRNA kódující IL-18 a interleukin-12 (IL-12) jsou snadno detegovatelné v Kupfferových buňkách a aktivovaných makrofágách. Rekombinantní IL-18 indukuje IFN- $\gamma$  účinněji než IL-12, zřejmě prostřednictvím samostatné dráhy (Okamura et al., 1995, *Nature* 378:88-91). IL-18, podobně jako aktivita indukovaná v séru endotoxinem, sám o sobě neindukuje IFN- $\gamma$ , nýbrž působí primárně jako kostimulátor společně s mitogeny nebo IL-2. IL-18 zvyšuje proliferaci buněk T, zřejmě prostřednictvím signální dráhy závislé na IL-2, zvyšuje *in vitro* tvorbu Th1 cytokinů a vykazuje synergismus v kombinaci s IL-12 při stimulaci tvorby IFN- $\gamma$  (Micallef et al., 1996, *Eur. J. Immunol.* 26:1647-1651).

45 Neutralizující protilátky proti myšimu IL-18 byly schopné zabránit letálnímu účinku nízkých dávek LPS u myši, jež byly předtím inokulovány *P. acnes*. Jiní autoři popsali významnou roli IFN- $\gamma$  ve zprostředkování letálního účinku LPS u takto inokulovaných myši. Například neutralizující anti-IFN- $\gamma$  protilátky chránily myši proti šoku podobnému Shwartzmanovu šoku (Heremans et al., 1990, *J. Exp. Med.* 30 171:1853-1869) a myši postrádající IFN- $\gamma$  receptor, na které bylo působeno galaktosaminem, byly resistantní vůči smrti indukované účinkem LPS (Car et al., 1994, *J. Exp. Med.* 179:1437-1444). Nebylo tudíž neočekávané, že neutralizující protilátky proti myšimu IL-18 chránily myši naočkované *P. acnes* před letálním účinkem LPS (Okamura et al., 1995, *Nature* 378:88-91). Zásah proti myšimu IL-18 též chránil přežívající myši před těžkou jaterní cytotoxicitou.

Poté, co byla naklonována myší forma, byla popsána v r. 1996 lidská cDNA sekvence pro IL-18 (Ushio et al., 1996, *J. Immunol.* 156:4274-4279). Rekombinantní lidský IL-18 vykazuje stejnou aktivitu jako přirozený IL-18 (Ushio et al., 1996, *J. Immunol.* 156:4274-4279). Lidský rekombinantní IL-18 nemá přímý IFN- $\gamma$ -indukující účinek na lidské buňky T, působí ale jako kostimulátor tvorby IFN- $\gamma$  a dalších cytokinů charakteristických pro Th1 subpopulaci buněk T (Ushio et al., 1996, *J. Immunol.* 156:4274-4279). Dosud se má zato, že IL-18 primárně působí jako kostimulátor tvorby Th1 cytokinů (IFN- $\gamma$ , IL-2 a faktoru stimulujícího tvorbu kolonií granulocytů a makrofágů) (Kohno et al., 1997, *J. Immunol.* 158:1541-1550) a rovněž jako kostimulátor cytotoxicity klonů myších NK buněk (přirozených zabijců) zprostředkované FAS ligandem.

Naklonováním IL-18 z postižených tkání a sledováním genové exprese IL-18 byla zjištěna úzká souvislost mezi tímto cytokinem a autoimunitními chorobami. U neobézních diabetických (NOD) myší se spontánně vytváří autoimunitní insulitida a diabetes, které mohou být urychleny a synchronizovány jedinou injekcí cyklofosfamidu. V pankreatu NOD myší byla pomocí RT-PCR prokázána IL-18 mRNA v prvních fázích insulitidy. Hladiny IL-18 mRNA se působením cyklofosfamidu rychle zvyšovaly a předcházely vzestupu hladiny IFN- $\gamma$  mRNA a následnému diabetu. Je zajímavé, že tyto kinetiky sledují profil IL-12-p40 mRNA, takže dochází k těsné korelaci hladin jednotlivých mRNA. Naklonování IL-18 cDNA z pankreatické RNA a následné určení sekvence ukázalo, že tato sekvence je identická s IL-18 sekvencí naklonovanou z Kupfferových buněk a z *in vivo* aktivovaných makrofágů. Dále, makrofágy NOD myší reagovaly na cyklofosfamid expresí IL-18, zatímco makrofágy Balb/c myší s v paralelním pokuse nikoli. Exprese IL-18 je tedy u autoimunních NOD myší regulována abnormálně a úzce souvisí s rozvojem diabetu (Rothe et al., 1997, *J. Clin. Invest.* 99:469-474).

IL-18 může hrát roli v imunoregulaci nebo v procesu zánětu tím, že zesiluje funkční aktivitu Fas ligandu na Th1 buňkách (Dao et al., 10 1996, *Cell-Immunol.* 173:230-235). IL-18 je rovněž exprimován v kůře nadledvin a mohl by proto být secernovaným neuroimunomodulátorem s důležitou funkcí v koordinaci imunitního systému následně po vystavení účinkům stresu (Conti et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272:2035-2037).

*In vivo* je IL-18 produkován štěpením prekurzoru pro-IL-18 a jeho endogenní aktivita zřejmě zodpovídá za tvorbu IFN- $\gamma$  při letalitě zprostředkované P.acnes a LPS. S ohledem na tuto aktivitu, představuje blokování biologické aktivity IL-18 při chorobných stavech terapeutickou strategií pro mnoho lidských chorob. K tomuto účelu lze použít solubilních receptorů nebo protilátek blokujících IL-18 receptory vázané na buňkách.

Proteiny vázající cytokiny (solubilní receptory cytokinů) odpovídají extracelulárním, ligand vázajícím doménám buněčných povrchových receptorů pro tyto cytokiny. Vznikají buď alternativním sestřihem pre-mRNA, společně pro receptor na buněčném povrchu, nebo proteolytickým štěpením povrchového receptoru. Takoveto solubilní receptory byly již popsány, mezi jinými pro IL-6 a IFN- $\gamma$  (Novick et al., 1989, *J. Exp. Med.* 170:1409-1414), TNF (Engelmann et al., 1989, *J. Biol. Chem.* 264:11974-11980; Engelmann et al., 1990, *J. Biol. Chem.* 265:1531-1536), IL-1 a IL-4 (Maliszewski et al., 1990, *J. Immunol.* 144:3028-3033), IFN- $\alpha/\beta$  (Novick et al., 1994, *Cell* 77:391-400; Novick et al., 1992, *FEBS Lett.* 314:445-448) a další. Jeden cytokin-vazebný protein, osteoprotegerin (OPG, též známý jako OCIF, tj. faktor inhibující osteoklasty), který je členem receptorové rodiny TNFR/Fas, je zřejmě prvním příkladem solubilního receptoru, který existuje pouze ve formě secernovaného proteinu (Anderson et al., 1997, *Nature* 390:175-179; Simonet et al., 1997, *Cell* 89:309-319; Yasuda et al., 1998, *Endocrinology* 139:1329-1337).

#### Podstata vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje IL-18-vazebné proteiny, IL-18BP, vybraný ze skupiny sestávající z: (a) polypeptidů obsahujících aminokyselinové sekvence ze SEQ ID NO: 2 nebo 6; (b)

polypeptidů definovaných v (a) bez zaváděcí sekvence; (c) muteinů s alespoň 80% homologií s IL-18BP jak definováno v (a) nebo (b), fúzaných proteinů, chemicky modifikovaných derivátů, cirkulárně permutovaných derivátů a jejich směsí polypeptidů definovaných v (a) nebo (b); a které se vážou k IL-18 a blokují produkci IFN- $\gamma$  indukovanou IL-18. Vynález rovněž poskytuje způsob izolace proteinů IL-18BP z lidských tekutin a postup na jejich získání rekombinantními technikami. Vynález také poskytuje expresní vektory pro IL-18BP, vhodné k expresi IL-18BP v lidech a jiných savcích. Specifické IL-18BP, virově kódované homology IL-18BP, jejich fúzané proteiny, muteiny, chemicky modifikované deriváty a cirkulárně permutované deriváty podle vynálezu jsou využitelné při modulaci a/nebo blokování biologických aktivit IL-18.

Vynález dále poskytuje replikovatelné expresní vektory obsahující DNA úseky vhodné pro expresi různých IL-18BP v hostitelských buňkách, hostitelské buňky takto transformované a proteiny a polypeptidy vytvořené expresí v takovýchto hostitelích.

Dále vynález poskytuje farmaceutické prostředky obsahující vhodná vehikula a proteiny IL-18BP, nebo virové IL-18BP, nebo vektory k jejich expresi v lidech a jiných savcích, pro léčbu chorob nebo stavů, jež vyžadují modulaci nebo blokování aktivity IL-18.

Vynález dále poskytuje protilátky namířené proti proteinům IL-18BP a virovým IL-18BP, vhodné pro jejich afinitní purifikaci a imunostanovení.

#### Podrobný popis vynálezu

Předkládaný vynález se týká různých IL-18BP a virových IL-18BP, které se vážou k IL-18. Takovéto IL-18BP proteiny mohou mít schopnost modulovat a/nebo blokovat biologické aktivity IL-18. Termín „proteiny IL-18BP a virové IL-18-BP“ zahrnuje maturní protein (bez signální sekvence), protein obsahující signální sekvence, muteiny IL-18BP a virových IL-18-BP, deriváty IL-18BP a virových IL-18-BP, zkrácené formy IL-18BP a virových IL-18-BP, a jejich sole.

Vynález se dále týká replikovatelných vektorů vhodných pro expresi různých IL-18BP v hostitelských buňkách a hostitelských bakteriích. Vynález se dále týká expresních vektorů vhodných pro expresi různých IL-18BP v lidech a jiných savcích.

Vynález se dále týká DNA molekul kódujících různé IL-18BP, muteiny, chemicky modifikované proteiny, funkční deriváty a jejich směsi. Tato DNA může být genomovou DNA, cDNA, syntetickou DNA, produktem PCR reakce nebo jejich kombinacemi. Tyto DNA mohou být vneseny do replikovatelných vektorů pro expresi různých IL-18BP v hostitelských buňkách podle vynálezu.

Jedna takováto DNA kóduje IL-18BP zahrnující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:10, opatřenou na 3' konci stop kodonem.

Expresní vektory vhodné pro expresi různých IL-18BP a virových IL-18BP v lidech a jiných savcích, tj. pro genovou terapii, mohou být virové vektory nebo jiné typy vektorů, do kterých jsou vneseny IL-18BP gen nebo IL-18BP cDNA takovým způsobem, který v lidech a jiných savcích umožňuje účinnou expresi IL-18BP.

Izolaci IL-18BP lze podle vynálezu provést např. tak, že lidská tekutina jako moč nebo sérum, se nechá protéci chromatografickým sloupcem, ke kterému je navázán IL-18, a následně se eluuje zachycený IL-18BP.

Různé IL-18BP mohou být rovněž připraveny rekombinantními technikami, tj. exprimováním IL-18BP ve vhodném hostiteli, přičemž se použije funkčního připojení promotorů, enhancerů exprese, regulačních sekvencí atd. vhodných pro konkrétního hostitele, které např. umožní expresi genu ve správné orientaci.

5

Různé IL-18BP a virové IL-18BP a vektory pro expresi IL-18BP v lidech a jiných savcích mohou být použity při léčbě nebo zmírňování stavů, při kterých se účastní IL-18 nebo které jsou působeny nadbytkem zevně dodávaného nebo vnitřně vytvářeného IL-18. Mezi takovéto stavy patří např. autoimunitní choroby, diabetes I. typu, revmatoidní artritida, odhojování transplantovaného štěpu, zánětlivé choroby střeva, sepse, roztroušená sklerosa, ischemická choroba srdeční (včetně srdečních infarktů), ischemické poškození mozku, chronická hepatitida, lupénka, chronická pankreatitida, akutní pankreatitida a podobně.

Podle vynálezu byl IL-18BP izolován z normální lidské moči v jednom chromatografickém kroku. Preparát hrubé frakce lidských proteinů moči, koncentrovaný z 500 litrů normální lidské moči, byl nanesen na sloupec agarózy, k níž byl navázán lidský IL-18. Kolona byla promyta a zachycené proteiny eluovány při nízkém pH. Eluované frakce byly neutralizovány a alikvoty byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (10% akrylamid) za neredukujících podmínek a s barvením stříbrem. V eluovaných frakcích byl obsažen specifický proteinový pruh o velikosti přibližně 40 kDa (Obr. 1).

Tento ~40 kDa protein byl identifikován jako protein vázající IL-18 podle své schopnosti specificky se kovalentně provázat s <sup>125</sup>I-IL-18 (Obr. 2). Pro další charakterizaci ~40 kDa proteinu byla stanovena N-koncová proteinová sekvence. Alikvoty eluovaného proteinu byly po SDS-PAGE elektroforeticky přeneseny na PVDF membránu a podrobeny mikrosekvenační analýze. Alikvoty eluovaného proteinu byly podrobeny i přímé mikrosekvenační analýze. V obou případech byly získány dvě polypeptidové sekvence. Hlavní sekvence a minoritní sekvence, která odpovídala fragmentu lidského defensinu (přírůstkové číslo databáze p11398), počínaje aminokyselinovým zbytkem 65. Po odečtení známé sekvence defensinu zůstala následující sekvence:

30

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

1 . . . . 5 . . . . 10 . . .

kde x představuje dosud neurčený aminokyselinový zbytek.

Pro získání delší a přesnější sekvence a pro identifikaci případných cysteinových zbytků bylo postupováno takto: alikvot eluované frakce byl redukován DTT za denaturujících podmínek, poté byl reagován s 4-vinylpyridinem, odsolen na mikroultrafiltračním zařízení (Ultrafree, mezní velikost 10,000 Da, Millipore) a podroben proteinové mikrosekvenační analýze. Po 1. sekvenačním cyklu byl zbývající protein reagován s o-ftalaldehydem, aby se blokovaly všechny N-koncové aminokyseliny kromě Pro, a pokračovalo se pak v sekvenaci. Tímto způsobem byla získána následující jediná proteinová sekvence:

40

TPVSQXXXAA XASVRSTKDP CPSQPPVFPA AKQCPALEVT

1

10

20

30

40

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

45

Výsledná sekvence se významně liší od sekvencí všech známých proteinů v proteinových databázích. Avšak prohledání databáze při The Institute of Genomic Research (TIGR)



Výraz „blokování aktivity IL-18“, jak se zde užívá, se týká schopnosti IL-18BP blokovat alespoň jednu ze shora uvedených biologických aktivit IL-18. Příkladem této blokující aktivity IL-18BP je schopnost IL-18BP blokovat v myších splenocytech expresi IFN- $\gamma$  související s IL-18.

5 Jak bude podrobněji ukázáno níže, modulační nebo blokující aktivita IL-18BP je částečně způsobena tím, že IL-18BP inhibuje aktivaci NF- $\kappa$ B cytokinem IL-18. Dále ještě IL-18BP blokuje alespoň jednu z následujících aktivit IL-18, jmenovitě indukci IFN- $\gamma$  v lidských a myších buňkách, indukci IL-8 a aktivaci NF- $\kappa$ B.

10 DNA sonda pro screening (prohledávání) cDNA knihoven byla připravena z RNA lidských Jurkat T-buněk pomocí RT-PCR a specifických sense a antisense primerů navržených podle TIGR sekvence. Identita výsledného PCR produktu byla potvrzena sekvenční analýzou DNA. Tento PCR produkt byl označen radioaktivním  $^{32}$ P a použit jako sonda při screeningu čtyř lidských cDNA knihoven odvozených z monocytů periferní krve, Jurkat T-buněk, PBMC (mononukleárních buněk periferní krve) a lidské sleziny. Různé s nezávislé cDNA klony odpovídaly

15 čtyřem sestříhovým variantám IL-18BP (SEQ ID NO:1, 3, 5 a 7). Všechny sestříhové varianty kodovaly předpokládané solubilní secernované proteiny. Nejhojněji zastoupený protein (IL-18BPa) měl otevřený čtecí rámec pro 192 kodonů, přičemž kodoval signální peptid, zde někdy též nazývaný „zaváděcí sekvence“, dlouhý 28 aminokyselinových zbytků, následovaný maturním předpokládaným IL-18BPa, jehož prvních 40 zbytků se dokonale shodovalo s N-koncovou proteinovou sekvencí močového IL-18BP (SEQ ID NO:2). Umístění cysteinových zbytků naznačovalo, že tento polypeptid patří do imunoglobulinové (Ig) nadrodiny. Je zajímavé, že každý ze čtyř Gln zbytků maturního IL-18BPa představoval potenciální N-glykosylační místo. Tři další sestříhové varianty IL-18BP byly méně zastoupené než IL-18BPa. Kratší, 1 kb dlouhá IL-18BPb

20 cDNA kodovala 28 aminokyselinových zbytků signálního peptidu, po kterých následoval maturní protein o 85 aminokyselinových zbytcích (SEQ ID NO:4). Třetí variantu, IL-18BPc, představovala 2,3 kb cDNA, kódující signální peptid 28 aminokyselinových zbytků dlouhý, po kterém následovalo 169 aminokyselinových zbytků maturního IL-18BP (SEQ ID NO:6). Čtvrtá varianta, IL-18BPd, kodovala 28 aminokyselinových zbytků signálního peptidu, následovaných maturním

25 IL-18BP o 133 aminokyselinových zbytcích (SEQ ID NO:8).

Pro nalezení případných dalších sestříhových variant IL-18BP byla lidská genomová knihovna screenována sondou odpovídající plné délce IL-18BP cDNA. V knihovně bylo nalezeno pět

35 genomových klonů různé délky. U všech těchto klonů byla provedena sekvenace s použitím vnějších a vnitřních primerů. Dohromady byla z těchto klonů sestavena 7,8 kb dlouhá sekvence (SEQ ID NO:9). V rámci této 7,8 kb genomové sekvence nebyl nalezen žádný exon, který by kodoval transmembránový (TM) receptorový úsek. Všechny varianty sdílejí společný začátek translace, kódují stejný 28 aminokyselinových zbytků dlouhý signální peptid a solubilní maturní proteiny o různých velikostech a s různými C-koncovými sekvencemi. IL-18BP lokus obsahuje na minus

40 řetězci další gen, jenž kóduje protein 1 jaderného mitotického aparátu (NUMA1, nuclear mitotic apparatus protein 1). Z tohoto zjištění vyplývá lokalizace IL-18BP genu na lidský chromosom 11q13 (Sparks et al., 1993, *Genomics* 17:222-224).

Pro kompletní proteinovou sekvenci IL-18BPa se hledaly homologie v GenPept databázi

45 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) s použitím Smith Watermannova algoritmu. Bylo zjištěno, že v několika Poxvirech se exprimují homology IL-18BP jako secernované proteiny s dosud neznámou funkcí. Dříve již bylo popsáno, že viry kódují různé receptory cytokinů a že takovéto virově kódované molekuly slouží jako „atrapy“ receptorů, které inhibují imunitní odpovědi tím, že neutralizují příslušný cytokin (přehled podává Spriggs, MK, 1994, *Curr. Opin. Immunol.*, 6:526-529). Vynález se proto dále týká farmaceutických prostředků obsahujících virově kódovaný

50 homolog IL-18BP, který se váže na IL-18 a blokuje produkci IFN- $\gamma$  indukovanou IL-18. Příklady virově kódovaných homologů IL-18BP jsou uvedeny v Tabulce 1.

Podle vynálezu může být virem kódovaný homolog IL-18BP exprimován v prokaryotickém nebo

55 eukaryotickém hostiteli. Výraz „virem kódovaný homolog IL-18BP“, jak se zde užívá, se týká

podobnosti alespoň z 50% u sekvence o délce alespoň 70 aminokyselinových zbytků. Výhodněji, má alespoň 50%, alespoň 60%, alespoň 70%, alespoň 80%, nebo nejvýhodněji, alespoň 90% podobnost v sekvenci o 100 aminokyselinových zbytcích.

5

Tabulka 1. Virově kódované proteiny vykazující vysokou homologii s lidským IL-18BP

GenPept sekvence	typ viru
MCU60315_54	U60315 virus Molluscum contagiosum subtyp 1
MCU60315_53	U60315 Molluscum contagiosum subtyp 1
SWPHLSB_12	L22013 virus prasečích neštovic
CV41KBPL_14	virus kravských neštovic
VVCGAA_5	virus černých neštovic
UO1161_3 174	Ectromelia (virus myších neštovic)
VVU18340_6	virus pravých neštovic
VVU18338_7	virus pravých neštovic
VVU18337_7	virus pravých neštovic
VARCG_7 173	virus pravých neštovic
MCU60315_51	virus Molluscum contagiosum
HNABV_1	nový virus asoc. s virem hepatitidy non-A, non-B

10 IL-18BP<sub>a</sub> byl exprimován v opičích COS7 buňkách. K tomuto účelu byla IL-18BP<sub>a</sub> cDNA vne-  
 sena do savčího expresního vektoru pEF-BOS. Aby se usnadnila purifikace rekombinantního  
 produktu, byla na 3'-konec otevřeného čtecího rámce IL-18BP přidána ve stejné fázi kazeta  
 15 kódující (His)<sub>6</sub> sekvenci. COS7 buňky byly transientně transfekovány expresním vektorem a  
 posléze bylo bezsérové médium těchto buněk (150 ml) zkoncentrováno a purifikováno chroma-  
 tografií na nosiči s chelátem kovu. Na SDS-PAGE (barvené stříbrem) migroval IL-18BP<sub>a</sub> jako  
 jeden pruh za redukcujících i neredukujících podmínek a měl stejnou zdánlivou molekulovou  
 hmotnost jako IL-18BP z moče. Analýza proteinové sekvence tohoto preparátu přinesla stejnou  
 N-koncovou sekvenci jako v původním močovém IL-18BP. Westernová analýza IL-18BP<sub>a</sub> s  
 20 použitím protilátek získaných proti močovému IL-18BP prokázala pruh o stejné molekulové  
 hmotnosti jako v případě proteinu z moče. Kromě toho, při analýze imunoprecipitací s následnou  
 SDS-PAGE a autoradiografií byl IL-18BP<sub>a</sub> schopen vytěsnit značený I-IL-18BP močového  
 původu z vazby k protilátce. IL-18BP<sub>a</sub> tedy strukturálně odpovídá IL-18BP izolovanému z moče.

25 U hrubého a purifikovaného IL-18BP<sub>a</sub> byla testována schopnost inhibovat biologickou aktivitu  
 IL-18. IL-18BP<sub>a</sub> inhiboval aktivitu lidského a myšího IL-18 v myších splenocytech, PBMC a  
 lidských KG-1 buňkách (Obr. 9). Tyto výsledky potvrzují identitu IL-18BP<sub>a</sub> cDNA jakožto  
 cDNA kódující biologicky aktivní IL-18BP.



Vynález se dále týká muteinů IL-18BP a virových IL-18BP, a fúzovaných proteinů sestávajících z IL-18BP proteinů standardního typu a virových IL-18BP, nebo jejich muteinů nebo jejich fragmentů, fúzovaných k jinému polypeptidů nebo proteinu, a schopných vázat IL-18BP a blokovat produkci IFN- $\gamma$  indukovanou IL-18.

5

Termín „muteiny“, jak se zde užívá, se týká analogů IL-18BP, nebo analogů virových IL-18BP, ve kterých je jeden nebo více aminokyselinových zbytků přirozeného IL-18BP nebo virového IL-18BP nahrazen jinými aminokyselinovými zbytky, nebo je deletován, nebo je jeden nebo více aminokyselinových zbytků přidán k přirozené sekvenci IL-18BP nebo virového IL-18BP, aniž by se schopnost výsledných produktů vázat IL-18 a blokovat produkci IFN- $\gamma$  indukovanou IL-18 výrazně změnila ve srovnání s IL-18BP standardního typu nebo virového IL-18BP divokého typu. Tyto muteiny se připravují známými technikami syntézy a/nebo místně cílené mutagenese, nebo jakýmkoli jinými známými technikami pro to vhodnými.

10

15

Jakýkoli takový mutein má s výhodou sekvenci aminokyselin dostatečně blízkou sekvenci IL-18BP nebo virového IL-18BP, aby měl v podstatě podobnou aktivitu jako IL-18BP. Jednou z aktivit IL-18BP je jeho schopnost vázat IL-18. Pokud má mutein podstatnou vazebnou aktivitu vůči IL-18, může být použit při purifikaci IL-18, například prostřednictvím afinitní chromatografie, a lze tedy říci, že má v podstatě podobnou aktivitu jako IL-18BP. Zda má daný mutein v podstatě stejnou aktivitu jako IL-18BP může tedy být určeno na základě běžných experimentů, při kterých je např. takovýto mutein podroben jednoduchému sendvičovému kompetičnímu testu, jako je radioimunoanalýza nebo ELISA stanovení, aby se zjistilo, zda se váže nebo neváže k vhodně značenému IL-18.

20

25

Ve výhodném provedení má jakýkoli takový mutein alespoň 40% identitu nebo homologii se sekvencí IL-18BP nebo virově kódovaného homologu IL-18BP. Výhodněji má s touto sekvencí alespoň 50%, alespoň 60%, alespoň 70%, alespoň 80%, nebo nejvýhodněji, alespoň 90% identitu nebo homologii.

30

Muteiny IL-18BP polypeptidů nebo muteiny virových IL-18BP, které mohou být použity podle vynálezu, nebo nukleové kyseliny, jež je kódují, zahrnují konečný soubor v podstatě odpovídajících sekvencí jako substitučních peptidů nebo polynukleotidů, jež mohou být normálně získány osobou běžně znalou oboru, bez nepřiměřeného experimentování, na základě poznatků a instrukcí zde prezentovaných. Pro podrobný popis proteinové chemie a struktury viz. Schulz, G.E. et al., *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag, New York, 1978; a Creighton, T.E., *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, které jsou zde tímto zahrnuty odkazem. Pro pojednání o substitucích v nukleotidových sekvencích, například o preferencích pro kodony, viz Ausubel et al., 1987–1995, *Current Protocols in Molecular Biology*, kap. A. 1.1–A. 1.24, Greene Publishing Associates, Inc. and Wiley & Sons, Inc., New York; a Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Dodatky C a D, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

35

40

45

Výhodné záměny pro muteiny podle vynálezu jsou tzv. „konzervativní“ substituce. Konzervativní aminokyselinové substituce v IL-18BP polypeptidech nebo proteinech nebo virových IL-18BP mohou zahrnovat synonymní aminokyseliny v rámci skupiny, jejíž členové mají dostatečně podobné fyzikálně-chemické vlastnosti, takže substice mezi členy skupiny zachová biologickou funkci molekuly, Grantham (1974), *Science* 185:862–864. Je jasné, že inserce a delece aminokyselin mohou být ve shora definovaných sekvencích prováděny bez změny jejich funkce, zejména pokud inserce nebo delece zahrnou pouze několik aminokyselin, např. méně než třicet a s výhodou méně než deset, a neodstraní se nebo se nepřesunou na jiné místo aminokyseliny, jež jsou důležité pro vytvoření funkční konformace, např. cysteinové zbytky (viz. Anfinsen, „Principles That Govern The Folding of Protein Chains“, *Science* (1973) 181:223–230). Proteiny a muteiny vytvořené takovými delecemi a/nebo insercemi spadají do rozsahu vynálezu.

50

Avšak cysteinové zbytky, které nejsou nezbytné pro biologickou aktivitu mohou být nahrazeny jinými zbytky, např. ve snaze vyhnout se tvorbě nežádoucích intramolekulárních nebo intermolekulárních disulfidových vazeb, které mohou působit snížení aktivity IL-18BP.

- 5 Výhodné skupiny synonymních aminokyselin jsou definovány v Tabulce I. Výhodnější skupiny synonymních aminokyselin jsou definovány v Tabulce II; a nejvýhodnější skupiny synonymních aminokyselin jsou definovány v Tabulce III.

Tabulka I

### Výhodné skupiny synonymních aminokyselin

Aminokyselina	Synonymní skupina
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
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
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys
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
Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

Tabulka II

**Výhodnější skupiny synonymních aminokyselin**

<b>Aminokyselina</b>	<b>Synonymní skupina</b>
Ser	Ser
Arg	His, Lys, Arg
Leu	Leu, Ile, Phe, Met
Pro	Ala, Pro
Thr	Thr
Ala	Pro, Ala
Val	Val, Met, Ile
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
Tyr	Phe, Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His, Gln, Arg
Gln	Glu, Gln, His
Asn	Asp, Asn
Lys	Lys, Arg
Asp	Asp, Asn,
Glu	Glu, Gln
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
Trp	Trp

Tabulka III

**Nejvýhodnější skupiny synonymních aminokyselin**

<b>Aminokyselina</b>	<b>Synonymní skupina</b>
Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Leu, Ile, Met
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala
Val	Val
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Trp

Příklady postupů pro zavádění aminokyselinových substitucí do proteinů, jež lze použít při přípravě muteinů IL-18BP polypeptidů nebo proteinů, nebo muteinů virových IL-18BP, zahrnují všechny známé metodické kroky, například postupy uvedené v patentech US RE 33 653, US 4 959 314, US 4 588 585 a US 4 737 462 autorů Mark et al.; US 5 116 943 autorů Koths et al., US 4 965 195 autorů Namen et al.; US 4 879 111 autorů Chong et al.; US 5 017 691 autorů Lee et al.; a patent US 4 904 584 pojednávající o proteinech substituovaných lysinem (Shaw et al.).

V jiném výhodném provedení vynálezu má jakýkoli mutein IL-18BP nebo virového IL-18BP aminokyselinovou sekvenci v podstatě odpovídající sekvenci IL-18BP, nebo virovému IL-18BP. Termínem „v podstatě odpovídající“ se rozumí proteiny s drobnými změnami v sekvenci přirozeného proteinu, které nemají vliv na základní vlastnosti přirozených proteinů, zejména co se týká jejich schopnosti vázat IL-18. Typy změn, které obecně vyhovují kategorii „v podstatě odpovídající“ jsou takové, jež jsou výsledkem konvenčních technik mutagenese DNA kódující tyto proteiny, vedoucích k několika drobným modifikacím, a následného vyšetření na požadovanou aktivitu způsobem diskutovaným shora. Vedle vazby k IL-18 mohou muteiny též modulovat a/nebo blokovat aktivitu IL-18.

Muteiny podle vynálezu zahrnují proteiny kódované nukleovou kyselinou, například DNA nebo RNA, která hybridizuje za stringentních podmínek k DNA nebo RNA kódující IL-18BP nebo virový IL-18BP podle vynálezu. Vynález rovněž zahrnuje takovouto nukleovou kyselinu, která je též využitelná jako sonda při identifikaci a purifikaci žádané nukleové kyseliny. Kromě toho, by taková nukleová kyselina byla prvním kandidátem na stanovení, zda kóduje polypeptid, u něž je zachována funkční aktivita IL-18BP podle vynálezu. Termín „stringentní podmínky“ se týká podmínek hybridizace a následného promývání, které jsou osobami znalými oboru konvenčně označovány jako „stringentní“. Viz Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, *supra*, kap. 6.3 a 6.4 (1987, 1992), a Sambrook et al., *supra*. Příklady stringentních podmínek zahrnují, bez omezení, promývání v podmínkách 12 až 20 °C pod vypočtenou  $T_m$  studovaného hybridu v např. 2 x SSC a 0,5% SDS po dobu 5 min, 2 x SSC a 0,1% SDS po dobu 15 min; 0,1 x SSC a 0,5% SDS při 37 °C po dobu 30 až 60 min a nakonec 0,1 x SSC a 0,5% SDS při 68 °C podobu 30 až 60 min. Osoby zběhlé v oboru jsou si vědomi, že podmínky stringence též závisí na délce DNA sekvencí, oligonukleotidových sond (např. 10 až 40 bází) nebo smíšených oligonukleotidových sond. Používají-li se smíšené sondy, je výhodnější použít tetramethylamonium chlorid (TMAC) místo SSC. Viz Ausubel, *supra*.

Vynález dále zahrnuje nukleové kyseliny, které kódují IL-18BP podle vynálezu, jež však mají vzhledem k degeneraci genetického kódu odlišnou nukleotidovou sekvenci. Takováto DNA, která případně nehybridizuje za stringentních podmínek k DNA sekvencím uvedeným v Obr. 4 až 7, je však nicméně schopná kódovat IL-18BP podle vynálezu, je rovněž součástí vynálezu.

Termín „fúzovaný protein“ se týká polypeptidu obsahujícího IL-18BP nebo jeho mutein, ve fúzi s jiným proteinem, který má například prodloužený poločas přítomnosti v tělesných tekutinách. IL-18BP tak může být fúzován k jinému proteinu, polypeptidu ap., např. k imunoglobulinu nebo jeho fragmentu. Může být také fúzován k polyethylenglykolu (PEG), aby se prodloužil jeho poločas.

Termín „soli“ se zde týká solí karboxylových skupin a solí vzniklých adicí protonu na aminoskupiny IL-18BP, jeho muteiny nebo fúzované proteiny. Soli karboxylové skupiny se mohou tvořit způsoby známými v oboru a zahrnují anorganické soli, např. sodné, vápenaté, amonné, železité nebo zinečnaté soli ap., a soli s organickými bázemi jako např. soli tvořené s aminy, jako je triethanolamin, s argininem nebo lysinem, piperidinem, prokainem, apod. Soli vzniklé adicí protonu k aminoskupinám zahrnují např. soli s minerálními kyselinami jako je např. kyselina chlorovodí-

ková nebo sírová, a soli s organickými kyselinami jako je např. kyselina octová nebo šťavelová. Takovéto soli musí samozřejmě mít v podstatě podobnou aktivitu jako IL-18BP.

Termín „chemicky modifikované deriváty“, jak se zde užívá, zahrnuje deriváty IL-18BP a jeho muteinů a fúzovaných proteinů, které lze připravit např. derivatizací funkčních skupin postranních řetězců aminokyselinových zbytků nebo N- nebo C-koncových skupin s použitím metod známých v oboru; tyto deriváty jsou zahrnuty do vynálezu, je-li zachována jejich farmaceutická přijatelnost, tj., nedochází k zničení aktivity proteinu, která je v podstatě podobná aktivitě IL-18BP a deriváty nedodávají toxické vlastnosti prostředkům, které je obsahují. Tyto deriváty mohou například zahrnovat polyethylenglykolové postranní řetězce, jež mohou maskovat antigenní místa a prodlužovat poločas IL-18BP v tělesných tekutinách. Další deriváty zahrnují alifatické estery karboxylových skupin, amidy karboxylových skupin vzniklé reakcí s amoniakem nebo s primárními nebo sekundárními aminy, N-acyl deriváty volných aminoskupin aminokyselinových zbytků vytvořené s acylovými zbytky (např. alkanoylovými nebo karbocyklickými aroylovými skupinami) nebo O-acyl deriváty volných hydroxylových skupin (např. serinových nebo threoninových zbytků) vytvořené s acylovými zbytky.

Termín „cirkulárně permutované deriváty“, jak se zde užívá, se týká lineární molekuly, jejíž konce byly navzájem spojeny, buď přímo, nebo prostřednictvím linkeru, za vzniku kruhové molekuly, která je potom otevřena na jiném místě za vzniku nové lineární molekuly s jinými konci než má původní molekula. Cirkulární permutace zahrnují molekuly, jejichž struktura je shodná s molekulou, jež byla cirkularizována a poté otevřena. Cirkulárně permutovanou molekulu tedy lze syntetizovat *de novo* jako lineární molekulu, aniž by se uplatnil cirkularizační a štěpicí krok. Příprava cirkulárně permutovaných derivátů je popsána v WO 95/27732.

Proteiny IL-18BP mohou být produkovány různými rekombinantními buňkami, prokaryotickými jako např. *E. coli*, nebo eukaryotickými jako kvasinkami nebo hmyzími buňkami. Způsoby konstrukce vhodných vektorů nesoucích DNA, jež kóduje IL-18BP, a vhodných k transformaci např. *E. coli*, savčích buněk a kvasinek, nebo k infekci hmyzích buněk, s cílem produkovat rekombinantní IL-18BP jsou v oboru dobře známy. Viz například Ausubel et al., „Current Protocols in Molecular Biology“ Current Protocols, 1993; Sambrook et al., „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“, 2. vydání, Cold Spring Harbor Press, 1989.

Pro potřeby exprese proteinů IL-18BP je DNA kódující IL-18BP, jejich fragmenty, muteiny nebo fúzované proteiny, s funkčně připojenými transkripčními a translačními regulačními sekvencemi, vnesena do vektorů, jež jsou schopné integrovat požadované genové sekvence do chromosomu hostitelské buňky. K selekci buněk, jež do svých chromosomu stabilně integrovaly vnesenou DNA, se používá jeden nebo více markerů, které umožňují selekci hostitelských buněk obsahujících expresní vektor. Marker může udělovat prototrofii auxotrofnímu hostiteli, resistenci vůči biocidním látkám, např. antibiotikům, nebo resistenci vůči těžkým kovům jako např. mědi apod. Gen selektovatelného markerů může být připojen přímo k DNA sekvencím, jež mají být exprimovány, nebo může být vnesen do stejné buňky pomocí kotransfekce. Pro optimalizaci syntézy mohou být potřebné i další regulační elementy; ty zahrnují signály pro sestřih, transkripční promotory, enhancery a terminační signály.

DNA molekula, jež má být vpravena do zvolených buněk je s výhodou součástí plasmidového nebo virového vektoru, schopného autonomní replikace v hostitelské buňce. Výhodné prokaryotické plasmidy jsou deriváty plasmidu pBR322. Výhodné eukaryotické vektory zahrnují BPV, vakuinii, SV40, 2- $\mu$ m plasmid atd., nebo jejich deriváty. Takovéto plasmidy a vektory jsou dobře známy v oboru (Bollon et al., 1980, *J. Clin. Hematol. Oncol.* 10:39-48; Botstein et al., 1982, *Miami Wint. Symp.* 19:265-274; Broach. J.R., v *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance*“, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, str. 445-470 (1981); Broach, 1982, *Cell* 28:203-204; Maniatis, T., v „*Cell Biology: A Comprehensive Treatise*, Vol.3: Gene Expression“, Academic Press, NY, str. 563-608 (1980)). Po konstrukci vektoru obsahujícího DNA sekvenci pro expresi, může být expresní vektor vnesen

do buňky vhodného hostitele s použitím kterékoli z řady vhodných metod, jako je transformace, transfekce, lipofekce, konjugace, fúze protoplastů, elektroporace, použití kalcium fosfátového koprecipitátu, přímá mikroinjikace atd.

- 5 Hostitelské buňky používané ve vynálezu mohou být s prokaryotické nebo eukaryotické. Výhodní prokaryotičtí hostitelé zahrnují bakterie jako jsou *E. coli*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia* atd. Nejvýhodnějším prokaryotickým hostitelem je *E. coli*. Mezi zvláště zajímavé bakteriální hostitele patří *E. coli* K12 kmen 294 (ATCC 31446), *E. coli* X1776  
10 10 (ATCC 31537), *E. coli* W3110 (F<sup>-</sup>, lambda<sup>-</sup>, prototrofní) (ATCC 27325). V těchto hostitelích nebude protein glykosylován. Prokaryotický hostitel musí být kompatibilní s replikonem a s regulačními sekvencemi v expresním plasmidu.

Jelikož však jsou přirozené IL-18BP glykosylovány, dává se přednost eukaryotickým hostitelům před prokaryotickými. Výhodnými eukaryotickými hostiteli jsou savčí buňky, například lidské,  
15 opičí, myši, a CHO (Chinese hamster ovary tj. ovariární buňky čínské křečka) buňky, neboť zajišťují posttranslační modifikace proteinů, včetně složení do správné konformace, správné tvorby disulfidových vazeb, jakož i glykosylaci ve správných místech proteinové molekuly. K posttranslační modifikaci peptidů, včetně glykosylace s vysokým zastoupením mannosy, dochází rovněž v kvasinkách a hmyzích buňkách.

20 Při produkci heterologních proteinů v kvasinkách a hmyzích buňkách se uplatňují různé strategie rekombinantní DNA využívající silné promotory a plasmidy o vysokém počtu kopií. Kvasinky a hmyzí buňky rozeznávají zaváděcí sekvence na produktech klonovaných savčích genů a secernují maturní IL-18BP. Po zavedení vektoru se hostitelské buňky pěstují na selektivním médiu, ve kterém rostou pouze buňky obsahující vektor. Expres klonovaných genů vede k tvorbě IL-18BP  
25 fúzovaných proteinů, nebo jejich muteinů. Shora zmíněné klonování, izolace a identifikace klonu, charakterizace a postupy při sekvenaci jsou podrobněji popsány níže v textu v Příkladech.

30 Exprimované proteiny se pak izolují a purifikují konvenčními postupy zahrnujícími extrakci, srážení, chromatografii, elektroforesu apod., nebo afinitní chromatografii například s použitím anti-IL-18BP monoklonálních protilátek imobilizovaných na gelovém nosiči v chromatografické koloně. Hrubé preparáty obsahující rekombinantní IL-18BP se nanosou na kolonu, přičemž IL-18BP se naváže k specifické protilátce na sloupci, zatímco nečistoty projdou kolonou. Po promytí se protein z gelu eluuje za podmínek obvykle užívaných k tomuto účelu, tj. při vysokém nebo  
35 nízkém pH, například pH 11 nebo pH 2.

Vynález se dále týká vektorů využitelných pro expresi IL-18BP nebo jeho derivátů v savcích a konkrétně v lidech. Vektory pro krátkodobou a dlouhodobou expresi genů v savcích jsou dobře  
40 známy z literatury. Z různých studií vyplynulo, že vnesení genu např. do kosterního svalu, hladkého svalu cévní stěny a do jater má za následek systémové hladiny terapeutických proteinů. Kosterní sval je výhodný terč, protože má velkou masu, je vaskularizován a je snadno přístupný. S úspěchem se však použily i jiné cílové buňky, zejména prekursorů imunitních buněk z kostní dřeně. V současnosti dostupné vektory pro expresi proteinů, například ve svalu, zahrnují plasmidovou DNA, liposomy, konjugáty DNA s proteiny, a vektory na bázi adenoviru, adeno-asociovaného viru a herpesviru. Nejúspěšnější z nich, co se týká délky působení a hladiny genové  
45 exprese, jakož i bezpečnostního hlediska, byly vektory na bázi adeno-asociovaného viru (AAV) (Kessier, P.D. 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14082-14087).

Postupy pro konstrukci AAV-odvozeného vektoru byly podrobně popsány (Snyder et al., 1996, *Current Protocols in Human Genetics*, 6 kapitoly 12.1.1-12.1.17, John Wiley & Sons) a jsou  
50 zahrnuty do vynálezu. Ve stručnosti, plasmid psub201, obsahující genom AAV divokého typu, se štěpí restričním enzymem XbaI a liguje s DNA fragmentem obsahujícím účinný eukaryotický promotor, např. promotor cytomegaloviru, konsensní sekvenci Kozakové, DNA sekvenci kódující IL-18BP, nebo jejich muteiny nebo fúzované proteiny, dále vhodnou 3' nepřekládanou oblast a polyadenylační signál, například polyadenylační signál z opičího viru SV40. Výsledným  
55

rekombinantním plasmidem, spolu s pomocným AAV plasmidem, např. pAAV/Ad, se kotransfekují savčí buňky, např. lidské T293 buňky. Kultury se pak infikují adenovirem jakožto pomocným virem, a po 48 až 60 hodinách se sklídí supernatanty kultur. Supernatanty se frakcionují srážením síranem amonným, purifikují se centrifugací v CsCl hustotním gradientu, dialyzují se, a  
 5 poté se zahřejí na 56 °C, aby se zničily všechny adenoviry, zatímco výsledný rekombinantní AAV, který je schopný exprimovat IL-18BP nebo virový IL-18BP, nebo jejich muteiny nebo fúzované proteiny, zůstává při tomto kroku neporušený.

Fyziologická funkce solubilních cytokinových receptorů nebyla dosud objasněna. Solubilní  
 10 receptory vážou své specifické ligandy a ve většině případů inhibují jejich biologickou aktivitu, jak bylo například ukázáno v systému TNF (Engelmann et al., 1989, *J. Biol. Chem.* 264:11974–11980; Engelmann et al., 1990, *J. Biol. Chem.* 265:1531–1536). Jen ve velmi málo případech, například u IL-6, solubilní receptor zvyšuje biologickou aktivitu. Experimenty ukázaly, že rekombinantní solubilní TNF receptor, též známý jako TBP (TNF binding protein, TNF-vazebný  
 15 protein), zabraňoval ve zvířecích modelech septickému šoku, a že solubilní formy IL-1 receptoru měly výrazné inhibiční účinky na rozvoj *in vivo* alloreaktivity u myších příjemců alloštěpu.

Podobně mohou IL-18BP a virové IL-18BP podle vynálezu nalézt použití jako modulátory aktivity IL-18, např. v případech diabetu I. typu, sepse, autoimunitních chorob, odhojování trans-  
 20 plantátu, revmatoidní artritidy, zánětlivých chorob střeva, roztroušené sklerosy, ischemické choroby srdeční včetně akutních srdečních infarktů, ischemického poškození mozku, lupénky, chronické hepatitidy a akutní hepatitidy. Mohou tedy být použity např. při jakékoli chorobě, při níž endogenní tvorba nebo exogenní podávání IL-18 indukuje chorobu nebo zhoršuje stav pacienta.

Vynález se dále týká farmaceutických prostředků obsahujících farmaceuticky přijatelný nosič a  
 25 IL-18BP nebo virový IL-18BP podle vynálezu, nebo jejich aktivní muteiny, fúzované proteiny a jejich soli nebo chemicky modifikované deriváty.

Vynález se dále týká farmaceutických prostředků obsahujících farmaceuticky přijatelný nosič a  
 30 např. virový vektor jako je kterýkoli z řečených AAV-odvozených virových vektorů nebo jiný vektor exprimující IL-18BP nebo jejich muteiny nebo fúzované proteiny, který je vhodný pro podání lidem a jiným savcům s cílem dosáhnout *in vivo* exprese IL-18BP, nebo jeho muteinů nebo fragmentů nebo fúzovaných proteinů podle vynálezu, tj. pro použití v genové terapii.

Farmaceutické prostředky podle vynálezu se připravují smícháním IL-18BP nebo virového IL-  
 35 18BP nebo jejich derivátů nebo vektorů pro jejich expresi s fyziologicky přijatelnými nosiči a/nebo stabilizátory a/nebo excipienty a směs se upraví do formy pro dávkování, např. lyofilizací do dávkových lahviček. Aplikace může být podle kteréhokoli z uznávaných způsobů používaných při aplikaci podobných prostředků a bude záviset na stavu, který se léčí, tedy například nitrožilně, nitrosvalově, podkožně, místní injekční nebo zevní aplikací, nebo kontinuální infúzí atd. Množství aktivní látky, které se bude aplikovat, závisí na způsobu aplikace, léčené chorobě a stavu pacienta. Místní injekce bude například vyžadovat menší množství proteinu, v závislosti na tělesné hmotnosti, než nitrožilní infúze.

Proteiny IL-18BP nebo virové IL-18BP nebo vektory, které je exprimují *in vivo*, jsou tedy indi-  
 45 kovány pro léčbu autoimunitních chorob, diabetu I. typu, revmatoidní artritidy, odhojování transplantátu, zánětlivých chorob střeva, sepse, roztroušené sklerosy, ischemické choroby srdeční včetně akutních srdečních infarktů, ischemického poškození mozku, chronické hepatitidy, lupénky, chronické pankreatitidy a akutní pankreatitidy a podobných chorob, při kterých dochází k nenormální expresi IL-18 vedoucí k nadbytku IL-18, nebo v případech komplikací vyvolaných exogenně dodaným IL-18.

Vynález zahrnuje také protilátky proti IL-18BP. Termín „protilátka“ zahrnuje polyklonální pro-  
 55 tilátky, monoklonální protilátky (mAb), chimérní protilátky, anti-idiotypové (anti-Id) protilátky



namířené proti protilátkám, které mohou být značené, v solubilní nebo vázané formě, humanizované protilátky, jakož i jejich fragmenty získané jakoukoli známou technikou, jako je, ale bez omezení, enzymatické štěpení, peptidová syntéza nebo rekombinantní technologie.

- 5 Polyklonální protilátky jsou heterogenní populace molekul protilátek získaných ze séra zvířat imunizovaných antigenem.

Monoklonální protilátka obsahuje v podstatě homogenní populaci protilátek specifických pro antigen, přičemž tato populace obsahuje v podstatě podobná vazebná místa pro epitop. Monoklonální protilátky mohou být získány metodami dobře známými v oboru. Viz například Kohler a Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975); Patent US 4 376 110; Ausubel et al. *supra*; Harlow a Lane, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); a Colligan et al., eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience N.Y., (1992, 1993), v nichž obsažené odkazy jsou zde v úplnosti zahrnuty odkazem.

10 Takovéto protilátky mohou příslušet do kterékoli třídy imunoglobulinů, včetně IgG, IgM, IgE, IgA, GILD a jejich podtříd. Hybridem produkující mAb podle vynálezu může být kultivován *in vitro*, *in situ* nebo *in vivo*. Vzhledem k produkci vysokých titrů monoklonálních protilátek *in vivo* nebo *in situ* se tomuto způsobu produkce v současnosti dává přednost.

20 Chiméřní protilátky jsou molekuly, jejichž různé části jsou odvozené z různých živočišných druhů, jako např. u chiméřních protilátek, které mají variabilní oblast odvozenou z myší monoklonální protilátky a konstantní část z lidského imunoglobulinů. Chiméřní protilátky se zejména používají pro snížení imunogenity při klinické aplikaci a pro vyšší výtěžky. Například v situaci, kdy myší mAb poskytují vyšší výtěžky z hybridomů, ale u lidí vyvolávají imunitní odpověď,

25 používají se takovéto lidské/myší chiméřní monoklonální protilátky. Chiméřní protilátky a způsoby jejich produkce jsou dobře známé v oboru (Cabilly et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3273-3277 (1984); Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984); Boulianne et al., *Nature* 312:643-646 (1984); Cabilly et al., Evropská patentová přihláška 125023 (publikovaná 14.listopadu 1984); Neuberger et al., *Nature* 314:268-270 (1985);

30 Taniguchi et al., Evropská patentová přihláška 171496 (publikovaná 19.února 1985); Morisson et al., Evropská patentová přihláška 173494 (publikovaná 5.března 1986); Neuberger et al., PCT přihláška WO 86 01533 (publikovaná 13.března 1986); Kudo et al., Evropská patentová přihláška 184187 (publikovaná 11.června 1986); Sahagan et al., *J. Immunol.* 137:1066-1074 (1986); Robinson et al., Mezinárodní patentová přihláška No. WO 97 02671 (publikovaná 7.května

35 1987); Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443 (1987); Sun et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218 (1987); Better et al., *Science* 240:1041-1043 (1988); a Harlow a Lane, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, *supra*. Tyto odkazy jsou zde v úplnosti zahrnuty odkazem.

40 Anti-idiotypová (anti-Id) protilátka je protilátka, která rozpoznává unikátní determinanty na molekule protilátky, zpravidla spojené s vazebným místem pro antigen. Anti-Id protilátka může být připravena imunizací zvířete stejného druhu a genetického typu (např. kmene myši) ze kterého pochází mAb, vůči které se anti-Id připravuje. Imunizované zvíře rozpozná a bude reagovat na idiotypové determinanty imunizující protilátky tím, že začne vytvářet protilátku proti těmto

45 idiotypovým determinantům (anti-Id protilátku). Viz např. Patent US 4 699 880, který je zde v úplnosti zahrnut odkazem.

Anti-Id protilátka může být rovněž použita jako „imunogen“ na vyvolání imunitní odpovědi v ještě dalším zvířeti, za vzniku tzv. anti-anti-Id protilátky. Anti-anti-Id může být epitopově identická s původní mAb, která vyvolala anti-Id. Takto je možné s použitím protilátek namířených proti idiotypovým determinantům mAb identifikovat další klony exprimující protilátky s identickou specifitou.

55 Monoklonální protilátky vytvořené proti IL-18BP a příbuzným proteinům podle vynálezu, mohou tedy být použity k navození anti-Id protilátek ve vhodných zvířatech, jako jsou myši

kmene BALB/c. Slezinné buňky z takto imunizovaných myší se použijí ke konstrukci s anti-Id hybridomů, jež budou produkovat anti-Id monoklonální protilátky. Dále, anti-Id monoklonální protilátky mohou být navázány na nosič jako je hemocyanin měkkýše šášně lodní (KLH) a použity k imunizaci dalších myší kmene BALB/c. Sérum těchto myší bude obsahovat anti-anti-Id protilátky s vazebnými vlastnostmi původní mAb specifické pro IL-18BP epitop nebo epitopy virového IL-18BP.

Anti-Id monoklonální protilátky tedy mají své vlastní idiotypové epitopy, neboli „idiotovy“, strukturně podobné hodnocenému epitopu, jako například IL-18BP nebo virový IL-18BP.

Termínem „humanizovaná protilátka“ se rozumí např. protilátky získané manipulací myších protilátek metodami genového inženýrství tak, aby byly slučitelnější s lidským tělem. Takovéto humanizované protilátky mají u lidí sníženou imunogenitu a lepší farmakokinetiku. Mohou být připraveny technikami známými v oboru, jak je popsáno například pro humanizované anti-TNF protilátky v *Molecular Immunology*, 30(16): 1443–1453 (1993).

Termínem „protilátka“ se rovněž rozumí, že zahrnuje jak celé molekuly, tak jejich fragmenty, jako například Fab a  $F(ab')_2$ , které jsou schopné vázat antigen. Fab a  $F(ab')_2$  fragmenty nemají Fc fragment protilátky, rychleji vymizí z cirkulace a mohou mít nižší nespecifickou tkáňovou vazbu než celá protilátka (Wahl et al., *J. Nucl. Med.* 24:316–325 (1983)). Je zřejmé, že Fab a  $F(ab')_2$  a další fragmenty protilátek využitelných podle vynálezu mohou být použity k detekci a kvantifikaci IL-18BP nebo virového IL-18BP s použitím metod zde uvedených pro celé molekuly protilátek. Takovéto fragmenty se zpravidla získávají proteolytickým štěpením, přičemž se užívají enzymy jako papain (na získání Fab fragmentů) nebo pepsin (na získání  $F(ab')_2$  fragmentů).

O protilátce lze říci, že je „schopná vázat“ molekulu, pokud je schopná specificky interagovat s molekulou a tím molekulu vázat k protilátce. Termínem „epitop“ se míní ta část jakékoli molekuly, která může být vázána protilátkou a která může být také rozpoznána touto protilátkou. Epitopy nebo „antigenní determinanty“ zpravidla sestávají z chemicky aktivních povrchových skupení molekul, jako jsou aminokyseliny nebo cukerné postranní řetězce, se specifickou trojrozměrnou strukturou a specifickými nábojovými vlastnostmi.

„Antigen“ je molekula nebo část molekuly, která může být vázána protilátkou, a která dále může vyvolat u zvířete tvorbu protilátky schopné vázat se k epitopu tohoto antigenu. Antigen může mít jeden nebo více epitopů. Specifickou reakcí, o níž byla řeč shora, se rozumí, že antigen reaguje vysoce selektivně se svojí odpovídající protilátkou a nikoli s velkým množstvím jiných protilátek, které mohly být vyvolány jinými antigeny.

Protilátky, včetně fragmentů protilátek, využitelné podle vynálezu, mohou být použity ke kvantitativní nebo kvalitativní detekci IL-18BP ve vzorcích nebo k detekci buněk, které exprimují takovéto proteiny podle vynálezu. Toho může být dosaženo imunofluorescenčními technikami, jež využívají fluorescenčně značené protilátky (viz níže) v kombinaci s detekcí mikroskopii, průtokovou cytometrií nebo fluorometrií.

Protilátky (nebo jejich fragmenty) využitelné podle vynálezu se mohou použít v histologii k *in situ* detekci IL-18BP podle vynálezu s použitím imunofluorescenční nebo imunoelektronové mikroskopie. *In situ* detekce může být provedena po odebrání histologického vzorku s od pacienta přidáním značené protilátky podle vynálezu k takovému vzorku. Protilátka (nebo fragment) je s výhodou použita tak, že značená protilátka (nebo fragment) je aplikována nebo přiložena k biologickému vzorku. Použitím takového postupu je možné stanovit nejen přítomnost IL-18BP, ale také jeho distribuci ve vyšetřované tkáni. Osoby běžně zběhlé v oboru si při použití vynálezu ihned uvědomí, že kterákoliv z celé řady histologických metod (jako například barvicí postupy) může být modifikována, aby bylo dosaženo takovéto *in situ* detekce.

Takovéto testy na IL-18BP podle vynálezu typicky zahrnují inkubaci biologického vzorku, jako například biologické tekutiny, extraktu tkáně, čerstvě odebraných buněk jako lymfocytů nebo leukocytů, nebo buněk, které byly inkubovány v tkáňové kultuře, v přítomnosti značené protilátky schopné identifikovat IL-18BP, a detekci protilátky pomocí kterékoli z celé řady technik dobře známých v oboru.

Biologický vzorek může být zachycen na pevnou fázi nebo nosič jako nitrocelulosu, nebo na jinou pevnou fázi nebo nosič, který umožňuje imobilizaci buněk, buněčných částí nebo rozpustných proteinů. Pevná fáze nebo nosič mohou pak být promyty vhodnými pufrů a následně inkubovány s detegovatelně značenou protilátkou v souladu s vynálezem, jak bylo uvedeno shora. Pevná fáze nebo nosič mohou pak být promyty pufrům podruhé, aby se odstranila nenavázaná protilátka. Množství vázané značky na pevné fázi nebo nosiči může potom být detekováno obvyklými prostředky.

Termíny „pevná fáze“, „nosič pevné fáze“, „pevný nosič“, nebo „nosič“ se rozumí jakákoli pevná fáze nebo nosič schopné vázat antigen nebo protilátky. Dobře známé pevné fáze nebo nosiče zahrnují sklo, polystyren, polypropylen, polyethylen, dextran, nylon, amylasy, přírodní a modifikované celulosy, polyakrylamidy, gabro a magnetit. Pro účely vynálezu může být nosič buď do určité míry rozpustný, nebo nerozpustný. Pevná fáze může mít prakticky libovolnou konfiguraci, nutné je pouze, aby navázaná molekula byla schopná se vázat k antigenu nebo protilátce. Pevná fáze nebo nosič tedy mohou být sférické jako u kuliček, válcovité jako u vnitřního povrchu zkumavky nebo vnějšího povrchu tyčinky. Povrch může také být plochý jako u listu nebo proužku, atd. Výhodné pevné fáze nebo nosiče zahrnují polystyrénové kuličky. Osoby znalé oboru budou znát mnoho dalších vhodných nosičů pro vazbu protilátek nebo antigenu, anebo budou schopny tyto zjistit pomocí rutinního experimentování.

Vazebná aktivita dané šarže protilátky podle vynálezu může být stanovena pomocí dobře známých metod. Osoby znalé oboru budou schopné určit běžným experimentováním funkční a optimální podmínky pro každé stanovení.

Další kroky jako promývání, míchání, třepání, filtrování a podobně, mohou být zařazeny do procedury jak je obvyklé nebo nutné v konkrétní situaci.

Jeden ze způsobů jak může být protilátka podle vynálezu detegovatelně označená je navázat protilátku k enzymu a použít ji v enzymoimunoanalýze (EIA). Tento enzym pak následně bude v přítomnosti vhodného substrátu reagovat se substrátem za vzniku chemického produktu, detegovatelného například spektrofotometricky, fluorometricky nebo vizuálně. Enzymy, jež mohou být použity k značení protilátek zahrnují, ale bez omezení, malátdehydrogenázu, stafylokokovou nukleázu, delta-5-steroidisomerázu, kvasinkovou alkoholdehydrogenázu, alfa-glycerofosfátdehydrogenázu, triosofosfátisomerázu, křenovou peroxidázu, alkalickou fosfatázu, asparaginázu, glukosaoxidázu, beta-galaktosidázu, ribonukleázu, ureázu, katalázu, glukóza-6-fosfátdehydrogenázu, glukooamylázu a acetylcholinesterázu. Detekce může být provedena kolorimetrickými metodami, jež využívají chromogenních substrátů enzymů. Detekce může být provedena též vizuálním porovnáním rozsahu enzymatické reakce substrátu se standardy připravenými za podobných podmínek.

Detekce může být dosaženo s použitím kterékoli z řady dalších imunostanovení. Po radioaktivním označení protilátek nebo jejich fragmentů je například možné delegovat IL-18BP pomocí radioimunoanalýzy (RIA). Dobrý popis RIA metody lze najít v Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, autorů Work, T.S. et al., North Holland Publishing Company, NY (1978) se zvláštním poukazem na kapitolu, kterou napsal Chard, T., „Úvod do radioimunoanalýzy a příbuzných technik“, která je zde zahrnuta odkazem. Radioaktivní izotop je delegován pomocí gama-počítače nebo kapalinového scintilačního počítače nebo autoradiografií.

5 Dále je možné protilátku podle vynálezu označit fluorescenční sloučeninou. Po vystavení fluorescenčně značené protilátky světlu o vhodné vlnové délce, může být přítomnost protilátky delegována díky fluorescenci. Mezi nejběžněji užívané sloučeniny k fluorescenčnímu značení patří fluorescein isothiokyanát, rhodamin, phycoerythrin, phycocyanin, allophycocyanin, o-ftalaldehyd, a fluoreskamin.

10 Protilátka může být též značena kovy vydávajícími fluorescenci jako jsou např.  $^{152}\text{Eu}$  nebo další lanthanidy. Tyto kovy mohou být navázány k protilátce prostřednictvím skupin chelatujících kovy, jako např. kyselina diethylenetriaminpentaoctová (ETPA).

15 Protilátka může být též značena navázáním biotinu. Biotinylovaná protilátka pak může být delegována avidinem nebo streptavidinem navázaným k fluorescenční sloučenině nebo k enzymu jako peroxidáza nebo k radioaktivnímu izotopu a podobně.

20 Protilátka může být též značena navázáním chemiluminiscenční sloučeniny. Přítomnost chemiluminiscenčně označené protilátky je pak stanovena podle luminiscence vycházející v průběhu chemické reakce. Příkladem obzvláště užitečných sloučenin pro chemiluminiscenční značení jsou luminol, isoluminol, thiomatický akridiniový ester, imidazol, akridiniová sůl a ester oxalátu.

25 Podobně mohou být k značení protilátky podle vynálezu použity bioluminiscenční sloučeniny. Bioluminiscence je typ chemiluminiscence, vyskytující se v biologických systémech, ve kterých je účinnost chemiluminiscenční reakce zvyšována katalytickým proteinem. Přítomnost bioluminiscenčního proteinu se stanovuje detekcí luminiscence. Důležité bioluminiscenční sloučeniny pro účely značení jsou luciferin, luciferasa a aequorin.

30 Molekula protilátky podle vynálezu může být použita v imunostanovení, známém též jako „dvojstranná“ nebo „sendvičová“ analýza. V typickém imunometrickém stanovení se určité množství neznačené protilátky (nebo fragmentu protilátky) naváže k pevné fázi nebo nosiči a přidává se určité množství solubilní značené protilátky, které umožňuje detekci a/nebo kvantifikaci ternárního komplexu mezi protilátkou na pevné fázi, antigenem a značenou protilátkou.

35 Typická a výhodná imunostanovení zahrnují „forward“ analýzy, při kterých je protilátka navázaná na pevné fázi nejprve inkubována s testovaným vzorkem, aby se antigen ze vzorku navázal do binárního komplexu protilátka na pevné fázi – antigen. Po vhodné době inkubace se pevná fáze nebo nosič promyje, aby se odstranily zbytky kapalného vzorku, včetně nenavázaného antigenu, je-li takový, a potom se přidá roztok obsahující neznámé množství značené protilátky (která slouží jako „reportérová molekula“). V průběhu druhé inkubace se značená protilátka komplexuje s antigenem, který je navázaný k pevné fázi to nebo nosiči prostřednictvím neznačené protilátky, a poté se pevná fáze nebo nosič podruhé promyje, aby se odstranila nenavázaná značená protilátka.

45 V jiném typu „sendvičového“ stanovení, které může být použitelné pro antigeny podle vynálezu, se provádějí tzv. „simultánní“ a „reverzní“ analýzy. Simultánní stanovení spočívá v jediném inkubačním kroku, ve kterém se protilátka vázaná k pevné fázi nebo nosiči a značená protilátka současně přidávají k testovanému vzorku. Po ukončení inkubace se pevná fáze nebo nosič promyje, aby se odstranily zbytky kapalného vzorku a nenavázaná značená protilátka. Přítomnost značené protilátky spojené s pevnou fází nebo nosičem se pak stanoví stejně jako v případě konvenčního „forward“ sendvičového stanovení.

50 Při „reverzním“ stanovení se nejprve přidá roztok značené protilátky ke kapalnému vzorku a po vhodné inkubační době následuje přídavek neznačené protilátky vázané na pevné fázi nebo nosiči. Po druhé inkubaci je pevná fáze konvenčním způsobem promyta, aby se odstranily zbytky testovaného vzorku a nenavázané značené protilátky. Stanovení značené protilátky spojené s pevnou fází nebo nosičem se provede stejně jako v „simultánní“ a „forward“ analýze.

55

Vynález též poskytuje DNA molekuly kódující IL-18BP jak shora definováno, replikovatelné vektory obsahující takovéto DNA molekuly, hostitelské buňky, jež jsou transformované těmito expresními vektory a zahrnující prokaryotické a eukaryotické hostitelské buňky, s výhodou CHO buňky. Vynález rovněž zahrnuje způsob přípravy expresních vektorů, kódujících IL-18BP podle  
5 vynálezu, za účelem jejich exprese v lidech a jiných savcích.

Vynález též zahrnuje způsob přípravy IL-18BP podle vynálezu spočívající v kultivaci transformované buňky v souladu s vynálezem a izolaci proteinu kódovaného DNA molekulou v expresním vektoru uvnitř takovéto transformované hostitelské buňky.  
10

IL-18BP nebo virový IL-18BP se mohou, vedle použití na modulaci aktivity IL-18, samozřejmě použít i pro purifikaci samotného IL-18. Pro tento účel se IL-18BP nebo virový IL-18BP naváže k afinitní koloně a hrubá frakce IL-18 se nanese na kolonu. Zachycený IL-18 se pak získá z kolony např. elucí při nízkém pH.  
15

#### Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1 ukazuje SDS-PAGE (elektroforesu v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným) IL-18-vazebného proteinu purifikovaného afinitní chromatografií. Na kolonu agarózy s navázaným IL-18 byla nanesena hrubá směs močových proteinů (zahuštěných ultrafiltrací z 500 l normální lidské moče). Kolona byla promyta a zachycené proteiny eluovány při pH 2,2. Eluované frakce byly neutralizovány a alikvoty analyzovány pomocí SDS-PAGE (10% akrylamid) za neredukujících podmínek, gel byl barven stříbrem. Jednotlivé dráhy obsahovaly: 1: hrubá směs močových proteinů (nanáška 1,5 µg); 2-9: eluáty 1-8 z kolony IL-18-agarózy; 10: markery molekulové hmotnosti, velikosti v kDa uvedeny vpravo. Šipkou je označen pruh odpovídající IL-18BP.  
20  
25

Obrázek 2 ukazuje autoradiogram SDS-PAGE (7,5% akrylamid) komplexů obsahujících <sup>125</sup>I-IL-18 (zdánlivá molekulová hmotnost 19 kDa) kovalentně provázaný s následujícími preparáty solubilního IL-18-vazebného proteinu: dráha 1: roztok po promytí IL-18 afinitní kolony; dráha 2: eluát 2 z IL-18 afinitní kolony; dráha 3: eluát 3 z IL-18 afinitní kolony. Markery molekulové hmotnosti jsou vyznačeny vpravo (v kDa). Šipka označuje kovalentně provázaný produkt (58 kDa).  
30  
35

Obrázek 3 ukazuje inhibiční účinek IL-18BP na tvorbu IFN-γ indukovanou IL-18.

(A) Myší splenocyty byly stimulovány (24 h, 37 °C) vyznačenými kombinacemi LPS (1 µg/ml) a lidského (hu) IL-18 (5 ng/ml), přidaným buď přímo, nebo po preinkubaci (1 hod, 37 °C) s močovým IL-18BP a po 24 h byla stanovena hladina myšního muIFN-γ v kultuře.

(B) Myší splenocyty byly inkubovány (24 h s LPS (1 µg/ml), spolu s myším IL-18 (10 ng/ml), který byl preinkubován (1 h, 37 °C) s rostoucími koncentracemi lidského IL-18BP.

(C) Myší splenocyty byly inkubovány (24 h s LPS (1 µg/ml), spolu s rostoucími koncentracemi lidského IL-18BP.

(D) Myší splenocyty byly inkubovány (24 h) s ConA (1 µg/ml), spolu s rostoucími koncentracemi lidského IL-18BP.  
40  
45

(E) Lidské KG-1 buňky byly stimulovány faktorem TNF-α (20 ng/ml) a lidským huIL-18 (25 ng/ml), přidaným buď samotným, nebo po preinkubaci (1 h, 37 °C) s močovým IL-18BP.

Obrázek 4 ukazuje sekvence cDNA a proteinu lidského IL-18BPa. Signální peptid je potvrzen.  
50

Obrázek 5 ukazuje sekvence cDNA a proteinu lidského IL-18BPb. Signální peptid je potvrzen.

Obrázek 6 ukazuje sekvence cDNA a proteinu lidského IL-18BPc. Signální peptid je potvrzen.

Obrázek 7 ukazuje sekvence cDNA a proteinu lidského IL-18BPd. Signální peptid je potvrzen.

Obrázek 8 ukazuje sekvenci lidského IL-18BP genu. Lidský genomový klon (7,1 kb) byl sekvenován a sekvence byla porovnána se sekvencemi tří různých cDNA klonů izolovaných ze tří cDNA knihoven. Společný iniciační kodon je dán nukleotidy 683-685. NuMA1 gen se nachází na negativním řetězci, od nukleotidu 3578 do konce.

Obrázek 9 ukazuje účinek rekombinantního IL-18BP na aktivitu lidského a myšního IL-18.

10 Rekombinantní IL-18BPa s navázaným hexapeptidem His<sub>6</sub>. His<sub>6</sub>-IL-18BPa, byl transientně exprimován v buňkách COS7 a purifikován (rIL-18BP).

(A) Lidský IL-18 (5 ng/ml) byl po preinkubaci s His<sub>6</sub>-IL-18BPa nebo s RPMI přidán k myším slezinným buňkám společně s LPS (1 μg/ml). Tvorba myšního muIFN-γ byla stanovena po 24 hodinách.

15 (B) Myší IL-18 (10 ng/ml) byl po preinkubaci s His<sub>6</sub>-IL-18BPa nebo s RPMI přidán k myším slezinným buňkám společně s LPS (1 μg/ml). Tvorba myšního muIFN-γ byla stanovena po 24 hodinách.

(C) Lidský IL-18 (25 ng/ml) byl po preinkubaci s COS7-IL-18BPa nebo s RPMI přidán k lidským buňkám PBMC v přítomnosti IL-12 (10 ng/ml).

20 (D) Lidský IL-18 (25 ng/ml) byl po preinkubaci s COS7-IL-18BPa nebo s RPMI přidán k lidským KG-1 buňkám v přítomnosti TNF-α (20 ng/ml) a byla stanovena tvorba lidského huIFN-γ.

Vynález bude nyní podrobněji popsán v následujících, nijak omezujících příkladech:

25

#### Příklady provedení vynálezu

##### Příklad 1: Izolace IL-18-vazebného proteinu

30

Rekombinantní (E.coli) IL-18 (2,5 mg, Peprotech, NJ) byl navázán k nosiči Affigel-10 (0,5 ml, BioRad) podle pokynů výrobce a gelem byla naplněna chromatografická kolonka. Hrubá frakce močových proteinů (1000 x koncentrovaná, 500 ml) byla nanášena na kolonku při průtoku 0,25 ml/min. Sloupec byl promyt 250 ml 0,5 M NaCl v PBS (fosfátem pufrovaný fyziologický roztok). Vázané proteiny pak byly eluovány roztokem 25 mM kyseliny citrónové pH 2,2 a benzamidinu (1 mM) a ihned neutralizovány roztokem 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Objem sbíraných frakcí byl 1 ml. Frakce byly analyzovány SDS-PAGE s barvením stříbrem. IL-18-vazebný protein byl eluován ve frakcích č. 2-8 jako protein o molekulové hmotnosti ~40,000 Da (Obr. 1). Zhruba ~40 kDa pruh odpovídající IL-18BP poskytoval při barvení stříbrem výrazné žluté zabarvení. Různé frakce byly analyzovány pomocí kovalentního provázání s <sup>125</sup>I-IL-18, SDS-PAGE a autoradiografie, jak je popsáno v Příkladu 2. Ve frakcích 2-8, eluovaných z kolony IL-18-agarózy (Obr. 2), tak byl potvrzen IL-18-vazebný protein.

35

40

##### 45 Příklad 2: Kovalentní provázání afinitně purifikovaného IL-18BP se značeným IL-18.

Vzorky (40 μl) IL-18BP z předchozího afinitně purifikačního kroku byly inkubovány (70 min při 4 °C) s <sup>125</sup>I-IL-18 (5,000,000 cpm). Poté byl přidán disukcinimidylsberát (DSS) rozpuštěný v dimethylsulfoxidu (DMSO, 20 mM) do výsledné koncentrace 2mM a směs byla ponechána 20 min při 4 °C. Reakce byla zastavena přidáním 1 M Tris-HCl pH 7,5 a 1 M NaCl do výsledné koncentrace 100 mM. Po přidání vzorkového pufru s obsahem dithiothreitolu (DTT, 25 mM výsledná koncentrace) byly směsi analyzovány pomocí SDS-PAGE (7,5% akrylamid) s následnou autoradiografií (Obr. 2).

50

Specifický pruh o molekulové hmotnosti 58 kDa, patrně obsahující ~40 kDa protein kovalentně provázaný s ~20 kDa  $^{125}\text{I}$ -IL-18, byl pozorován ve frakcích eluovaných z IL-18 afinitní kolony (dráhy 2 a 3), ale nikoli v promývacím roztoku (dráha 1), který obsahoval všechny zbývající močové proteiny.

5

Příklad 3: Analýza proteinové sekvence.

Eluované frakce z afinitní kolony podle Příkladu 1 byly rozděleny pomocí SDS-PAGE (10% akrylamid) za neredukujících podmínek a přeneseny z gelu elektroforetický na PVDF membránu (Pro-Blot, Applied Biosystems, USA). Membrána byla obarvena Coomassie modří, ~40 kDa pruh byl vystříhnut a podroben sekvenační analýze v Procise mikrosekvenátoru (Applied Biosystems, USA). Takto byla získána následující hlavní sekvence:

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

1 . . . 5 . . . . 10 . . .

15

kde x představuje dosud neurčený aminokyselinový zbytek.

Kromě ní byla získána i minoritní sekvence:

20

A-x-Y-x-R-I-P-A-x-A-I-A

1 . . . 5 . . . . 10 . . .

Kvůli této druhé sekvenci nebylo možné získat delší sekvenční data. Minoritní sekvence byla identifikována jako lidský defensin (přírůstkové č. p11398), počínaje aminokyselinovým zbytkem 65. Prohledání všech dostupných databází v NCBI a TIGR vyhledávacími programy blastp a tblastn nevedlo k nalezení žádného známého proteinu, který by odpovídal hlavní sekvenci.

25

Pro získání delší a přesnější sekvence a pro identifikaci případných cysteinových zbytků byl jiný alikvot frakce eluované z IL-18-agarózy redukován DTT v 6 M guanidin HCl, poté byl reagován s 4-vinylpyridinem, odsolen na mikroultrafiltračním zařízení (Ultrafree mezní velikost 10,000 Da, Millipore) a podroben proteinové mikrosekvenační analýze. Po 1. sekvenačním cyklu byl filtr reagován s o-ftalaldehydem, aby se blokovaly všechny N-koncové aminokyseliny kromě Pro. Tímto způsobem byla získána pouze hlavní proteinová sekvence:

30

TPVSQXXXAA XASVRSTKDP CPSQPPVFPA AKQCPALEVT

1                    10                    20                    30                    40

35

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

V cyklech 6,7,8 a 11 byl zaznamenán slabý signál pro Thr, avšak vzhledem k nízké hodnotě signálu jsme považovali za rozumnější nepřidělovat pro tyto cykly specifický aminokyselinový zbytek.

40

Výsledná sekvence se významně liší od sekvencí všech známých proteinů v proteinových databázích. Avšak prohledání databáze TIGR pomocí vyhledávacího programu tblast odhalilo cDNA sekvenci označenou THC123801, jejíž otevřený čtecí rámeček (218 15 kodonů) obsahuje amino-

45





(10 µg/ml) byla rovněž inhibována močovým IL-18BP (Obr. 3C). Concanavalin A (noc A) aktivuje buňky T k tvorbě IFN-γ v nepřítomnosti IL-18 (Fantuzzi et al., 1998, *Blood* 91:2118-2125), a skutečně, tato indukce IFN-γ concanavalinem A nebyla inhibována ani vysokou koncentrací IL-18BP (Obr. 3D). Tento výsledek prokázal, že IL-18BP působí jako specifický inhibitor biologické aktivity IL-18 a nikoli jako nespecifický inhibitor tvorby IFN-γ. IL-18BP také inhiboval aktivitu lidského IL-18 indukovanou v lidských KG-1 buňkách kombinací IL-18 a TNF-α (Obr. 3E).

Shora uvedená data ukazují, že močový IL-18BP inhibuje aktivitu lidského i myšního IL-18 měřeno koindukcí tvorby IFN-γ v lidských a myších mononukleárních buňkách. Koncentrace IL-18BP, která snížila aktivitu IL-18 o více než 90 %, byla srovnatelná s vlastní s koncentrací IL-18, což svědčí o vysoké afinitě mezi oběma těmito proteiny.

#### 15 Příklad 6: Izolace cDNA klonů kódujících IL-18BP.

Celková RNA z Jurkat buněk T (CRL 8163, sbírka ATCC) byla reversně transkribována SuperScript RNasa H<sup>-</sup> reversní transkriptasou (Gibco-BRL) s použitím randomních primerů (Promega, Madison WI). Výsledné cDNA fragmenty byly pak amplifikovány pomocí PCR s Taq DNA polymerasou (Sigma) a primery odpovídajícími nukleotidům 24-44 (sense) a 500-481 (reversní) v klonu TIGR THC123801. Bylo použito 30 cyklů hybridizace (55 °C, 2 min) a extenze (70 °C, 1 min). Výsledné PCR produkty byly rozděleny elektroforézou v agarózovém gelu (1%) a po eluci z gelu klonovány do vektoru pGEM-Teasy TA (Promega). DNA z jednotlivých klonů byla sekvenována s použitím T7 a SP6 primerů.

Výsledný fragment o velikosti 477 bp (párů bází) byl radioaktivně označen <sup>32</sup>P metodou náhodných primerů. Značená sonda bylo použita ke screeningu různých lidských cDNA a genomových knihoven. Z knihoven byly dvojmo pořízeny otisky na nitrocelulosových filtrech, které byly hybridizovány se sondou při 60 °C v pufru 6xSSC, 10x Denhardtův roztok, 0,1% SDS a 100 ng/ml DNA z lososích spermii. Filtry byly promyty a exponovány přes noc při -80 °C na Kodak XAR film. Plaky příslušející klonům, jež vyšly pozitivně na obou filtrech, byly přečištěny. Z λpCEV9 klonů byly vyštěpeny plasmidové DNA a ligací cirkularizovány. cDNA klony z ostatních knihoven byly izolovány podle instrukcí výrobce. DNA sekvenace izolovaných klonů byla provedena na automatizovaných sekvenátorech Model 373A a 377 (Applied Biosystems) s použitím sense a antisense primerů. Všechny klonovací postupy se prováděly podle standardních protokolů (Sambrook et al., „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“, 2. vydání, Cold Spring Harbor Press, 1989).

Screenovány byly následující knihovny: lidská cDNA knihovna z monocytů připravená v λpCEV9 klonovacím vektoru (Gutkind et al., 1991, *Mol. Cell. Biol.* 11:1500-1507), laskavě poskytnutá T Mikim; lidská cDNA knihovna z leukemických Jurkat T buněk, lidská cDNA knihovna z leukocytů periferní krve a lidská cDNA knihovna ze sleziny, všechny z firmy Clontech (Palo Alto, CA). Lidská genomová knihovna z placenty ve vektoru lambda FIX II byla z firmy Stratagene (La Jolla, CA).

Byly získány a charakterizovány cDNA klony odpovídající čtyřem odlišným IL-18BP sestřihovým variantám. Všechny sestřihové varianty kódovaly pro předpokládané solubilní secernované proteiny. Nejhojněji zastoupený klon (IL-18BPa) měl otevřený čtecí rámec 192 kodonů dlouhý a kódoval signální peptid o délce 28 aminokyselin, po kterých následoval maturní předpokládaný IL-18BPa, jehož prvních 40 zbytků (SEQ ID NO:10) se perfektně shodovalo s N-koncovou proteinovou sekvencí močového IL-18BP (SEQ ID NO:2). Poloha cysteinových zbytků naznačovala, že tento polypeptid patří do imunoglobulinové (Ig) nadrodiny. Každý ze čtyř Gin zbytků maturního IL-18BPa by mohl být N-glykosylačním místem. Ostatní tři sestřihové varianty IL-18BP byly podstatně méně zastoupené.

Jiná 1 kb IL-18BPb cDNA kódovala maturní protein o 85 aminokyselinových zbytcích (SEQ ID NO:4). Třetí variantu, IL-18BPc, představovala 2,3 kb cDNA, jež kódovala maturní IL-18BP o 169 aminokyselinových zbytcích (SEQ ID NO:6). Čtvrtá varianta, IL-18BPd, kódovala maturní IL-18BP o 133 aminokyselinách (SEQ ID NO:8). V pro-mRNA byla zjištěna dvě místa intron-exon sestřihu. Sestřih v těchto dvou místech spolu s dalším 5' exonem v IL-18BPd umožňuje v různých cDNA klonech vznik 3 odlišných 5' m UTR (nepřekládaných oblastí). Je proto docela možné, že různé varianty IL-18BP mohou vznikat jako odpověď na specifické transkripčně regulační signály.

Doposud nebyla zjištěna žádná cDNA, jež by kódovala receptor s transmembránovou doménou.

**Příklad 7:** Konstrukce savčího expresního vektoru, produkce rekombinantního IL-18BP, hodnocení biologické aktivity rekombinantního IL-18BP.

Kódující oblast IL-18BPa cDNA byla amplifikována pomocí PCR s těmito primery:

sense primer

5'TATATCTAGAGCCACCATGAGACACA ACTGGACACCA a reversní

primer

5' ATATCTAGATTAATGATGATGATGATGATGACCCTGCTGCTGTGGA  
CTGC.

PCR produkty byly štěpeny restriční enzymem XbaI a klonovány do XbaI místa expresního vektoru pEF-BOS (Mizushima a Nagata, 1990, *Nucl. Acid Res.* 18:5322-5328) za vzniku pEF-BOS-IL-18BPa. Konstrukce rekombinantních plasmidů byla ověřena sekvenováním DNA.

K transfekci bylo inkubováno  $6 \times 10^7$  COS7 buněk v 1,4 ml TD pufru obsahujícím DNA plasmidu pEF-BOS-IL-18BPa (10  $\mu$ g) a DEAE-dextran (120  $\mu$ g) po dobu 30 min při pokojové teplotě, jak bylo popsáno (Sompayrac a Danna, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:7575-7578). Buňky pak byly promyty médiem DMEM-10%FBS, nasazeny na 4 h v DMEM-10, promyty a inkubovány 3 až 5 dnů v bezsérovém DMEM. Kultivační médium bylo sebráno, zahuštěno 6x ultrafiltrací (membrána s mezní velikostí 10 kDa) a produkt, IL-18BP-His<sub>6</sub>, byl zachycen na kolonce Talon (Clontech) a eluován imidazolem podle návodu výrobce.

Imunologická křížová reaktivita močového a rekombinantního COS7-exprimovaného IL-18BP byla stanovena následovně: močový IL-18BP (5  $\mu$ g) byl označen radioaktivním <sup>125</sup>I postupem s chloraminem T. Supernatanty COS7 buněk (250  $\mu$ l) byly smíchány (1 h, pokojová teplota, výsledný objem 500  $\mu$ l) s protilátkou proti močovému IL-18BP zředěnou 1:1000 v PBS, 0,05% Tween 20 a 0,5% hovězí serumalbumin (promývací pufr). Poté byl přidán <sup>125</sup>I-značený močový IL-18BP (10<sup>6</sup> cpm) a po 1 hodině byla přidána protein G-Sepharosa (20  $\mu$ l). Suspense byla ponechána 1,5 h při 4 °C, kuličky Sepharosy pak byly izolovány a promyty 3x promývacím pufrům a 1x roztokem PBS. Materiál zachycený na kuličkách byl eluován vzorkovým pufrům, elektroforeticky rozdělen v SDS-PAGE (10% akrylamid) za redukujících podmínek a následně autoradiografován.

IL-18BPa migroval v SDS-PAGE (barvení stříbrem) jako jeden pruh za redukujících i neredu-  
kujících podmínek a měl stejnou zdánlivou molekulovou hmotnost jako močový IL-18BP (data neukázána). Stanovená proteinová sekvence tohoto preparátu vykazovala stejnou N-koncovou sekvenci jako u močového IL-18BP, což dokazuje, že IL-18BP izolovaný z moči nebyl degradovaný na N-konci.

Westernová analýza IL-18BPa pomocí protilátek namířených proti močovému IL-18BP identifikovala pruh o stejné molekulové hmotnosti jakou měl protein z moči. Kromě toho bylo imunoprecipitací a následnou SDS-PAGE a autoradiografií prokázáno, že IL-18BPa je schopen vytěsnit močový  $^{125}\text{I}$ -IL-18BP z vazby na protilátku. IL-18BPa proto strukturně odpovídá močovému IL-18BP.

U hrubého a purifikovaného IL-18BPa byla testována schopnost inhibovat biologickou aktivitu IL-18. Bylo zjištěno, že IL-18BPa inhiboval IFN- $\gamma$ -indukující aktivitu lidského a myšičího IL-18 v myších splenocytech, PBMC a lidských KG-1 buňkách, přičemž míra této inhibice závisela na dávce (Obr. 9).

Výsledky různých biologických stanovení jakož i test změny elektroforetické pohyblivosti (Příklad 8) prokázaly, že inhibice IL-18 aktivity je skutečnou vlastností klonovaného IL-18BP a nikoli nějakých nečistot doprovázejících IL-18BP izolovaný z moči, jako například kopurifikujícího fragmentu defensinu.

#### Příklad 8: Stanovení posunu elektroforetické pohyblivosti

Byl rovněž studován účinek močového a rekombinantního IL-18BP na IL-18-indukovanou aktivaci NF- $\kappa$ B v lidských KG-1 buňkách. Lidské KG-1 buňky ( $4 \times 10^6$  buněk v 1 ml RMPI) byly stimulovány buď huIL-18 (10 ng/ml), nebo huIL-18 preinkubovaným s IL-18BP (20 min, pokojová teplota). Po 20 min při 37 °C byly buňky třikrát promyty předchlazeným roztokem PBS a ihned zamrazeny v kapalném dusíku. Buněčné pelety byly resuspendovány v trojnásobném objemu pufru A (20 mM Tris pH 7,6, 0,4 M NaCl, 0,2 mM EDTA, glycerol (20% obj.), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM dithiothreitol (DTT), 0,4 mM PMSF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2  $\mu$ g/ml leupeptin, 2  $\mu$ g/ml pepstatin a 2 ng/ml aprotinin). Buněčné zlomky byly odstraněny centrifugací (15,000 x g, 15 min) a alikvoty supernatantu byly zmrazeny v kapalném dusíku a skladovány při -80 °C. Koncentrace proteinu byla určena stanovením podle Bradfordové (BiaRad), jako standard byl použit hovězí sérový albumin. Dvouřetězcový oligonukleotid odpovídající vazebnému elementu pro NF- $\kappa$ B (10 pmol, Promega) byl radioaktivně označen [ $^{32}\text{P}$ ]dCTP (300 Ci/mmol) T4 polynukleotidkinasou (New England Biolabs). Volné nukleotidy byly odstraněny centrifugací na mikrokolonkách. Extrakty (10  $\mu$ g proteinu) připravené z buněk, na něž bylo působeno IL-18 nebo IL-18 plus IL-18BP, byly inkubovány (15 min při pokojové teplotě) se značenou sondou ( $3 \times 10^4$  cpm), poly dI.dC (500 ng, Pharmacia) a denaturovanou DNA z lososích spermii (100 ng, Sigma) v 20  $\mu$ l pufru obsahujícího HEPES (pH 7,5, 10 mM), 60 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA, 1 mM DTT a glycerol (5% obj.) Směsi pak byly naneseny na 5% nedenaturující polyakrylamidový gel a byla provedena elektroforéza při 185V v 0,5 x TBE (40 mM Tris HCl, 45 mM kyselina boritá, 2,5 mM EDTA). Gely byly vysušeny pod vakuem a přes noc autoradiografovány při -80 °C. Výsledek ukázal, že IL-18 indukoval vytvoření p50 NF- $\kappa$ B homodimeru a p65/p50 heterodimeru. Močový i rekombinantní IL-18BP inhibovaly aktivaci NF- $\kappa$ B cytokinem IL-18, měřeno posuvem elektroforetické pohyblivosti s extrakty KG-1 buněk a radioaktivně značeným oligonukleotidem odpovídajícím NF- $\kappa$ B konsensní sekvenci.

Příklad 9: Expres IL-18BP v *E.coli*, kvasinkách a hmyzích buňkách.

IL-18BP může být produkován také jinými rekombinantními buňkami jako jsou prokaryotické buňky, např. *E. coli*, nebo jiné eukaryotické buňky, například kvasinky a hmyzí buňky. Pro konstrukci vhodných vektorů, jež nesou DNA kódující IL-18BP a jsou vhodné pro transformaci *E. coli* a kvasinkových buněk nebo pro infekci hmyzích buněk za účelem produkce rekombinantního IL-18BP, lze použít dobře známé postupy. V případě exprese v kvasinkách se vyštěpený inzert DNA kódující IL-18BP (Příklad 6) zaklonuje do expresních vektorů vhodných k transfekci kvasinkových buněk. Pro expresi v hmyzích buňkách se DNA kódující IL-18BP zaklonuje do bakuloviru a hmyzí buňky se infikují tímto rekombinantním bakulovirem. Pro expresi v *E.coli* se DNA kódující IL-18BP upraví místně cílenou mutagenezou s vhodnými oligonukleotidy tak, aby se těsně před první kodon maturního IL-18BP dostal iniciační ATG kodon. Jinou možností jak připravit takovouto DNA je použití PCR a vhodných sense a antisense primerů. Takto modifikované molekuly cDNA se pak postupy dobře známými v oboru vnesou do vhodně konstruovaných prokaryotických expresních vektorů (Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982).

20 Příklad 10: Konstrukce adeno-asociovaného expresního vektoru pro in vivo expresi IL-18BPa.

Funkční gen kódující IL-18BPa se konstruoval na základě plasmidů pcDNA3 (Invitrogen, San Diego CA). IL-18BP cDNA obsahující na 5'konci konsensní sekvenci Kozakové byla ligována do XbaI místa plasmidů pcDNA3 způsobem, kterým se zrušilo toto restrikční místo. Nová XbaI místa se vnesla pomocí místně cílené mutagenese před neomycinovou kazetu (báze 2151 původní pcDNA3 sekvence) a za SV40 polyadenylační signál (báze 3372 původní pcDNA3 sekvence). Tento meziprodukt byl potom štěpen XbaI a výsledný 4,7 kb minigen byl vnesen do XbaI místa plasmidů psub201 jak bylo popsáno (Snyder et al., 1996, *Current Protocols in Human Genetics*, kapitoly 12.1.1–12.1.17, John Wiley & Sons). Výsledný rekombinantní plasmid byl kotransfekován s pomocným AAV plasmidem pAAV/Ad do lidských buněk T293. Kultury pak byly infikovány adenovirem v roli pomocného viru a po 48 až 60 hodinách inkubace byly buňky sklizeny. Po třech cyklech zamrazení – roztátí a centrifugačním odstranění buněčných zlomků byl k supernatantu přidán síran amonný do 33% nasycení. Směs pak byla centrifugována a ze supernatantu byl vysrážen rAAV přidáním síranu amonného do 50% nasycení. Virus pak byl dále purifikován centrifugací v CsCl, dialyzován a nakonec 15 min zahřát na 56 °C, aby se zničil jakýkoli adenovirus.

40 Příklad 11: Konstrukce rekombinantních fúzovaných proteinů IL-18BP.

Proteiny obsahující IL-18BP fúzovaný ke konstantní oblasti IgG2 těžkého řetězce lze získat následujícím způsobem: do DNA kódující IL-18BP se místně cílenou mutagenezí s vhodnými oligonukleotidy zavede unikátní restrikční místo těsně před a za kódující sekvenci. Do plasmidu nesoucího konstantní oblast IgG2 těžkého řetězce, např. pRKCO42Fc1 (Byrn et al., 1990, *Nature* 344:667–670) se podobnou místně cílenou mutagenezí zavede stejné unikátní restrikční místo co možná nejbliže k Asp 216 v IgG1 těžkém řetězci takovým způsobem, aby se ve fúzovaném proteinu zachoval čtecí rámec. Fragment dsDNA obsahující 5' nepřekládanou sekvenci a kódující IL-18BP se připraví štěpením v unikátních restrikčních místech nebo pomocí PCR s vhodně navrženými primery. Mutovaný pRKCD42Fc1 je podobně štěpen za vzniku velkého fragmentu obsahujícího plasmid a IgG1 sekvence. Ligací obou fragmentů pak vznikne nový plasmid kódující polypeptidový prekurzor, který obsahuje IL-18BP a asi 227 C-koncových aminokyselin IgG1 těžkého řetězce (oblast „pantu“ a domény CH2 a CH3). DNA kódující fúzované proteiny se z plasmidu mohou izolovat digescí příslušnými restrikčními enzymy a poté vnést do účinných prokaryotických nebo eukaryotických expresních vektorů.

## Příklad 12: Příprava chemicky modifikovaných IL-18BP.

Zvýšení poločasu IL-18BP v plasmě lze dosáhnout chemickou modifikací IL-18BP polyethylen-  
glykolem (PEG). Modifikaci lze provést s kovalentním navázáním PEG k cysteinovému zbytku  
5 v molekulách IL-18BP. Konstruuji se i mutantní IL-18BP, které mají cysteinový zbytek navíc na  
amino-konci, v glykosylačních místech a na karboxy-konci každé molekuly IL-18BP. Muta-  
genezi lze provést pomocí PCR s použitím oligonukleotidů obsahujících požadovanou mutaci.  
Tyto mutantní proteiny se exprimují obvyklým způsobem, dobře známým v oboru. Proteiny se  
10 pak modifikují navázáním molekul PEG a vyhodnotí se jejich aktivita.

## Příklad 13: Příprava polyklonálních protilátek proti IL-18BP.

Králíkům bylo nejprve podkožně injikováno 5 µg čistého preparátu močového IL-18BP v emulzi  
s kompletním Freundovým adjuvans. O tři týdny později bylo opět podkožně injikováno 5 µg  
preparátu IL-18BP v nekompletním Freundově adjuvans. V 10 denních intervalech byly pak  
dány dvě další injekce IL-18BP ve formě roztoku v PBS. Po 10 dnech od poslední imunizace  
byli králíci vykrváčeni. Tvorba protilátek byla sledována radioimunoanalýzou. K různým ředě-  
ním (1:50, 1:500, 1:5,000 a 1:50,000) králíčího séra byly přidány <sup>125</sup>I-značený IL-18BP (166,000  
20 cpm) a suspenze kuliček protein G-agarózy (20 µl, Pharmacia) v celkovém objemu 200 µl. Směs  
byla ponechána 1 h při pokojové teplotě, kuličky byly pak 3x promyty a vázaná radioaktivita byla  
změřena. Jako negativní kontrola bylo použito králíčí antisérum proti lidskému leptinu. Titr anti-  
séra proti IL-18BP byl mezi 1:500 a 1:5000, přičemž titr negativní kontroly byl nižší než 1:50.

## Příklad 14: Příprava monoklonálních protilátek proti IL-18BP.

Samicím myši Balb/C (3 měsíce starým) byly nejprve injikovány 2 bg purifikovaného IL-18BP v  
30 emulzi s kompletním Freundovým adjuvans a o tři týdny později podkožně v nekompletním  
Freundově adjuvans. Tři další injekce antigenu v roztoku PBS byly dány podkožně v 10 denních  
intervalech. Poslední posilovací dávky byly podány intraperitoneálně 4 a 3 dny před fúzí myši,  
která vykazovala nejvyšší titr pro vazbu ve stanovení pomocí IRIA (viz níže). K fúzi se použily  
buňky NSO/1 myelomové linie a lymfocyty připravené ze sleziny a mízních uzlin imunizované  
35 myši. Suspenze fúzovaných buněk byla rozpipetována do mikrokultivačních destiček a hybri-  
domy selektovány v DMEM doplněném HAT a 15% koňským sérem. Hybridomy, které produ-  
kovaly protilátky proti IL-18BP, byly dále klonovány metodou limitního ředění a injikovány do  
myši kmene Balb/C, které byly senzibilizované pristanem pro tvorbu ascitů. Izotypy protilátek  
byly stanoveny s použitím komerčně dostupné ELISA soupravy (Amersham, UK).

Screening hybridomů produkujících anti-IL-18BP monoklonální protilátky se prováděl takto:  
Supernatanty hybridomů se testovaly na přítomnost anti-IL-18BP protilátek obrácenou radio-  
imunoanalýzou na pevné fázi (IRIA). Jamky ELISA destiček (Dynatech Laboratories, Alexan-  
dria, VA) byly potaženy (10 µg/ml, 100 µl/jamka) IL-18BP<sub>a</sub>-His<sub>6</sub> purifikovaným na Talon  
45 kolonce. Po inkubaci přes noc při 4 °C byly destičky 2x promyty roztokem PBS obsahujícím  
BSA (0,5%) a Tween 20 (0,05%) a poté blokovány v promývacím roztoku nejméně 2 h při 37 °C.  
Na destičky pak byly přidány supernatanty z kultur hybridomů (100 µl/jamka) a destičky byly  
inkubovány 4 h při 37 °C. Destičky byly 3x promyty a do jamek byl přidán na 2 h při pokojové  
teplotě kozí anti-myší imunoglobulin konjugovaný s křenovou peroxidázou (HRP, Jackson Labs,  
50 1:10,000, 100 µl/jamka). Destičky byly 4x promyty a do jamek byl přidán ABTS (2,2'-azino-bis  
(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonová kyselina), Sigma) a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jako substrát. Vzniklé zbarvení  
bylo měřeno v automatické ELISA čtečce. Vzorokly poskytující OD alespoň 5x vyšší než hodnota  
negativní kontroly byly považovány za pozitivní.

## Příklad 15: Afinitní chromatografie IL-18BP s monoklonálními protilátkami.

Protilátky proti IL-18BP lze použít při purifikaci IL-18BP afinitní chromatografií. Ascitická tekutina obsahující monoklonální protilátku secernovanou hybridomem byla purifikována srážením síranem amonným při 50% nasycení s následnou důkladnou dialýzou proti PBS. Asi 10 mg imunoglobulinů bylo pak navázáno k 1 ml suspenze Affigel 10 (BioRad USA) podle návodu výrobce.

Na 0,5 ml kolonku Affigelu nesoucího anti-IL-18BP protilátku bylo nanášeno při 4 °C a průtoku 0,25 ml/min 250 ml lidských močových proteinů (ekvivalent 250 l surové moče). Kolonka byla promývána PBS dokud nebyly protekly roztok prostý proteinů. IL-18BP byl eluován 25 mM citrátovým pufrům pH 2,2 (8 frakcí o objemu kolonky) a ihned neutralizován 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Další purifikace tohoto preparátu lze docílit chromatografií na základě gelové filtrace.

## Příklad 16: ELISA test.

K povrchu jamek mikrotitračních destiček (Dynatech, nebo Maxisorb firmy Nunc) se naváže anti-IL-18BP monoklonální protilátka (bezserový hybridomový supernatant nebo imunoglobuliny ascitické tekutiny) inkubací přes noc při 4 °C. Destičky se promyjí roztokem PBS obsahujícím BSA (0,5%) a Tween 20 (0,05%) a dále jsou blokovány stejným roztokem nejméně 2 h při 37 °C. Zkoumané vzorky se naředí s blokovacím roztokem a přidají se do jamek (100 µl/jamka) na 4 h při 37 °C. Destičky se pak 3x promyjí roztokem PBS obsahujícím Tween 20 (0,05%) a přidá se králičí anti-IL-18BP sérum (1:1000, 100 µl/jamka) na další inkubaci přes noc při 4 °C. Destičky se poté 3x promyjí a na 2 h při pokojové teplotě se přidá kozí anti-králičí imunoglobulin konjugovaný s křenovou peroxidázou (HRP, Jackson Labs, 1:10,000, 100 µl/jamka). Destičky se 4x promyjí a přidá se ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonová kyselina), Sigma) a N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jako substrát. Vzniklé zbarvení se měří v automatické ELISA čtečce.

## Příklad 17: Neglykosylovaný lidský IL-18BP je biologicky aktivní.

U purifikovaného rekombinantního IL-18BP<sub>a</sub> se zkoušela schopnost inhibovat biologickou aktivitu IL-18. IL-18BP<sub>a</sub> inhiboval IFN-γ-indukující aktivitu lidského a myšičího IL-18 v myšičích splenocytech, PBMC a lidských KG-1 buňkách, přičemž míra této inhibice závisela na dávce (Obr. 9).

Purifikovaný IL-18BP<sub>a</sub> obsahující His<sub>6</sub> přívěsek na C-konci (1,5 µg, 50 µl) byl upraven na pH 7,5 a smíchán s N-glykosidázou F (3 µl, 500,000 U/ml, PNGasa F, New England Biolabs). Směs byla inkubována 24 h při 37 °C za nedenerujících podmínek. Alikvoty ze vzorku a z kontrolního neštěpeného IL-18BP-His<sub>6</sub> byly analyzovány pomocí SDS-PAGE za neredukujících podmínek a následně imunoblotovány s protilátkami proti IL-18BP. Bylo zjištěno, že ve frakci podrobené účinku PNGasy zmizel ~40 kDa pruh odpovídající IL-18BP-His<sub>6</sub> a objevil se nový ~20 kDa pruh. Molekulová hmotnost produktu a specifita štěpení PNGasou nasvědčují, že IL-18BP-His<sub>6</sub> byl plně deglykosylován.

Frakce podrobená účinku PNGasy, neštěpený IL-18BP-His<sub>6</sub> a kontrolní vzorek obsahující pouze PNGasu v pufru byly samostatně adsorbovány na kuličky Talonu, promyty fosfátovým pufrům a eluovány imidazolem (100 mM). S eluovanými frakcemi bylo provedeno stanovení biologické aktivity s použitím lidského IL-18 (20 ng/ml), LPS (2 µg/ml) a myšičích splenocytů. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

<u>Vzorek</u>	<u>IFN-<math>\gamma</math> (ng/ml)</u>
Kontrola	7,5
Neštěpený IL-18BP-His <sub>6</sub>	0
PNGasou štěpený IL-18BP-His <sub>6</sub>	0

Z pokusu lze tedy vyvodit, že deglykosylovaný IL-18BP je biologicky aktivní modulátor aktivity IL-18.

5

Předcházející popis konkrétních provedení osvětluje obecnou povahu vynálezu, takže při aplikaci současných vědomostí mohou jiní tato konkrétní provedení snadno modifikovat a/nebo adaptovat pro různá využití, aniž by se odchýlili od obecného principu, a proto takovéto adaptace a modifikace budou spadat smyslem a rozsahem mezi ekvivalenty zde zveřejněných provedení. Rozumí se, že zde použitá frazeologie a terminologie je pro účely popisu a nijak neomezuje.

10

#### PŘEHLED SEKVENCÍ

15

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

20

<120> Interleukin-18 Binding Proteins, their Preparation and Use

<130> IL-18 Rubinstein

25

<140>

<141>

<150> 125463

<151> 1998-07-22

30

<150> 122134

<151> 1957-11-06

<150> 121869

35

<151> 1997-09-29

<150> 121639

<151> 1997-08-27

40

<150> 121554

<151> 1997-08-14

<160> 10

45

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1  
 <211> 1348  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 5 <400> 1

```

gagaagagga cggtgtcaca gataaagagc caggctcacc agctcctgac gcatgcatca 60
tgaccatgag acacaactgg acaccagacc tcagcccttt gtgggtcctg ctccctgtgtg 120
cccacgtcgt cactctcctg gtcagagcca cactctctc gcagaccacc acagctgcca 180
ctgcctcagt tagaagcaca aaggaccctt gccctccca gcccccagtg ttcccagcag 240
ctaagcagtg tccagcattg gaagtgacct ggccagaggt ggaagtgcca ctgaatggaa 300
cgctgagcct atcctgtgtg gcctgcagcc gcttcccaa cttcagcatc ctctactggc 360
tgggcaatgg ttccctcatt gagcacctcc caggccgact gtgggagggg agcaccagcc 420
gggaacgtgg gagcacaggt acgcagctgt gcaaggcctt ggtgctggag cagctgaccc 480
ctgccctgca cagcaccaac ttctcctgtg tgctcgtgga ccctgaacag gttgtccagc 540
gtcacgtcgt cctggcccag ctctgggctg ggctgagggc aaccttgcc cccaccaag 600
aagccctgcc ctccagccac agcagctccac agcagcaggg ttaagactca gcacagggcc 660
agcagcagca caaccttgac cagagcttgg gtccctacctg tctacctgga gtgaacagtc 720
cctgactgcc tgtaggctgc gtgga-gcgc aacacacccc ctccctctct gctttgggtc 780
ccttctctca ccaaattcaa actccattcc cacctaccta gaaaatcaca gcctccttat 840
aatgcccct cctcctgcca ttctctctcc acctatccat tagccttctt aagtcctac 900
tcctcacact gctctactgc tcagaaacca ccaagactgt tgatgcctta gccttgact 960
ccagggccct acctgcattt cccacatgac tttctggaag cctcccaact attcttgctt 1020
ttcccagaca gctcccactc ccattgtctt gctcatttag tcccgtcttc ctccaccgcc 1080
cagcagggga acgctcaagc ctggttgaaa tgctgcctct tcagtgaagt catcctcttt 1140
cagctctggc cgcattctgc agacttctta tcttctgtgt gtatgttttt tttttcccc 1200
ttcacctaa tggactgttc caggggaagg atggggggcac cagctgcttc ggatccacac 1260
tgtatctgtg tcatccccac atgggtctct ataaaggatt attcaatgga aaaaaaaaaa 1320
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa 1348
    
```

10 <210> 2  
 <211> 192  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <220>  
 <221> SIGNAL  
 <222> (1) .. (28)

<400> 2



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  
20 25 30

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

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

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  
100 105 110

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

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

Asn Phe Ser Cys Val Leu Val Asp Pro Glu Gln Val Val Gln Arg His  
145 150 155 160

Val Val Leu Ala Gln Leu Trp Ala Gly Leu Arg Ala Thr Leu Pro Pro  
165 170 175

Thr Gln Glu Ala Leu Pro Ser Ser His Ser Ser Pro Gln Gln Gln Gly  
180 185 190

<210> 3  
5 <211> 1038  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 3

```

gagaagagga cgttgtcaca gataaaagagc caggctcacc agctcctgac gcatgcatca 60
tgaccatgag acacaactgg acaccagacc tcagcccttt gtgggtcctg ctctgtgtg 120
cccacgtcgt cactctcctg gtcagagcca caccgtctc gcagaccacc acagctgcca 180
ctgcctcagt tagaagcaca aaggaccctt gccctccca gccccagtg tccccagcag 240
ctaagcagtg tccagcattg gaagtgacct ggccagaggt ggaagtgcca ctgagctggg 300
ctgagggcaa ccttgccccc cacccaagaa gccctgccct ccagccacag cagtccacag 360
cagcaggggt aagactcagc acagggccag cagcagcaca accttgacca gagcttgggt 420
cctacctgtc tacctggagt gaacagtccc tgactgcctg taggtgcgt ggatgcgcaa 480
cacacccctt ccttctctgc tttgggtccc ttctctcacc aaattcaaac tccattccca 540
cctacctaga aaatcacagc ctcttataa tgctctctcc tcttgccatt ctctctccac 600
ctatccatta gccttccata cgctctactc ctacactgc tctactgctc agaaaccacc 660
aagactggtg atgccttagc cttgcactcc agggccctac ctgcatttcc cacatgactt 720
tctggaagcc tcccaactat tcttgctttt cccagacagc tccactccc atgtctctgc 780
tcatttagtc ccgtcttctt caccgccccca gcaggggaac gctcaagcct ggttgaaatg 840
ctgcctcttc agtgaagtca tcctcttcca gctctggccg cttctgagc acttctctac 900
ttcgtgctgt atgtttttt tttccctctt cactctaag gactgttcca ggggaaggat 960
gggggcacca gctgcttcgg atccacactg tatctgtgct atccccacat gggctctcat 1020
aaaggattat tcaatgga 1038

```

<210> 4

<211> 113

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SIGNAL

10 <222> (1)..(28)

<400> 4

```

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
           20           25           30
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
Leu Glu Val Thr Trp Pro Glu Val Glu Val Pro Leu Ser Trp Ala Glu
           65           70           75           80
Gly Asn Leu Ala Pro His Pro Arg Ser Pro Ala Leu Gln Pro Gln Gln
           85           90           95
Ser Thr Ala Ala Gly Leu Arg Leu Ser Thr Gly Pro Ala Ala Ala Gln
           100           105           110
Pro

```

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 7063

&lt;212&gt; DNA

5 &lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 5

```

gaattcgcgg ccgcgtcgac gccagagggg ctaggatgag agacagaggg tgtgatgggtg 60
ggtgctggga aatgtaccog accttggggc tggtaggctgg gggagtgggt agcctgggaa 120
aggccaggat gtggacggac tggtaggca ttgagcctga agtgggtccaa cttggggttc 180
cccagtgcct aggaaagttg tccccttgaa tgtcagtgtg aaggtgaagg aggaagcaga 240
tgccctgttca tatggaaaca aagacctggc tgtgaagagg ggaggcggac accaaagtcc 300
tgacacttgg gcgggacaga attgatctgt gagagactca tctagttcat accctaggtg 360
accctggggg tggcatgggg gtagattaga gatcccagtc tggtagcttc tggagagtag 420
gagtcccagg agctgaaggt ttctggccac tgaactttgg ctaaagcaga ggtgtcacag 480
ctgctcaaga ttcccctggt aaaaagtgaa agtgaatatag agggtcgggg cagtgccttc 540
ccagaaggat tgctcggcat cctgcccttc ccagaagcag ctctggtgct gaagagagca 600
ctgcctccct gtgtgactgg gtgagtccat attctctctt tgggtctcaa ttttgccttc 660

```

cctaataagagg gggtaagatt ggactaggta agcatcttac aaccatttgc ggcatgaga 720  
 gctgggggtgg ggaaggattg tcacttgacc cccccagctc tgtttctaag tgctgaaaga 780  
 gctccagget atgctacggg aggagaagcc agctactgag gaaaagccag ctactgagaa 840  
 aaagcgggag tggtttacca ttctccccc ccaccttca ccagagaaga ggacgttgtc 900  
 acacataaag agccaggctc accagctcct gacgeatgca tcatgaccat gagacacaac 960  
 tggacaccag acctcagccc ttgagggtc ctgctcctgt gtgcccacgt cgtcactctc 1020  
 ctggctcagag ccacacctgt ctgcagacc accacagctg ccaactgcctc agttaagaagc 1080  
 acaaaagacc cctgcccctc ccagcccca gtgttcccag cagctaagca gtgtccagca 1140  
 ttggaagtga cctggccaga ggtggaagtg ccaactgaatg gaacgctgag cttatcctgt 1200  
 gtggcctgca gccgcttccc caactcagc atcctctact ggctgggcaa tggttccttc 1260  
 attgagcacc tcccaggccg actgtgggag gggagcacca gccgggaacg tgggagcaca 1320  
 ggtacgcagc tgtgcaaggc cttggctgtg gaggagctga cccctgcctc gcacagcacc 1380  
 aacttctcct gtgtgctcgt ggacctgaa cagggtgtcc agcgtcagct cgtcctggcc 1440  
 cagctctggg tgaggagccc aaggagaggc ctccaggaac aggaggagct ctgcttccat 1500  
 atgtggggag gaaaggggtg gccctgccag agcagcctgt gaactaatgc ccagcattcc 1560  
 tcaaggtcag ccagacaaaa aggaacttag gtcttgggca gaggaggtgt agcctggggc 1620  
 aaagtgatga gatgtccctc ctttccctgg cctgatcctt gtctgccttc acttccctag 1680  
 gctgggctga gggcaacctt gccccccacc caagaagccc tgcctccag ccacagcagt 1740  
 ccacagcagc agggtaaga ctacgcacag gcccagcagc agcacaacct tgaccagagc 1800  
 ttgggtccta cctgtctacc tggagtgaac agtccctgac tgcctgtagg ctgcgtggat 1860  
 gcgcaacaca cccctcctt ctctgctttg ggtcccttct ctaccaaact tcaaaactcca 1920  
 ttcccacctc cctagaaaat cacagcctcc ttataatgcc tctctcctc gccattctct 1980  
 ctccacctat ccattagcct tcccaacgtc ctactcctca cactgctcta ctgctcagaa 2040  
 accaccaaga ctgttgatgc cttagccttg cactccaggg ccoctacctc atttcccaca 2100  
 tgactttctg gaagcctccc aactattctt gcttttccca gacagctccc actcccattgt 2160  
 ctctgctcat ttagtcccgt cttcctcacc gcccagcag gggaacgtc aagcctgggt 2220  
 gaaatgctgc ctcttcagtg aagtcattct ctttcagctc tggccgcat ctgcagacct 2280  
 cctatcttctg tctgtatgt ttttttttc ccccttccact ctaatggact gttccagggg 2340  
 agggatgggg gcagcagctg cttcggatcc aactgtatc tgtgtcatcc ccacatgggt 2400  
 cctcataaag gattattcaa tggaggcatc ctgacatctg ttcatttagg cttcagttcc 2460  
 actcccagga actttgcctg tcccacgagg gagtatggga gagatggact gccacacaga 2520  
 agctgaagac aacacctgct tcaggggaac acaggcctt gaaaaagaaa agagagaaca 2580  
 gcccataatg ctcccgggga gcagaggcca ctaatggaga gtgggaagag cctggaaaga 2640  
 tgtggcctca ggaaaaggga tgagagaaag gagggtggtat ggaagactca gcaggaacaa 2700  
 ggtaggcttc aaagagccta tattcctctt tttcccacac cgatcaagtc aactcagtac 2760  
 tcacgggaga aaaatagact ttatttacia gtaataacat ttagaaaaga tccatccccg 2820  
 gcccttaaaa accttcccat cactccaaat cccaccccag tgcaagtctg gggaggttag 2880  
 ggtgtgagct gctgctgaag gctgtcccc aaccccactc ctgagacaca gggcccatcc 2940  
 gtccctggaa agagcatcct ctggcaggtg ctcccaccag gtcagacca gtccctggact 3000  
 tcaagagtga gggcccctgc tgggcccagc caccaggaca gcaggaacca gggcctactc 3060  
 ctcttatggt ccttctaga tccagaggct aagaggaaga ctggccaggc ccaaggaccc 3120  
 agccatcaaa accagcctca aatctggttg tgatggagaa gtgactttgc ttaagaaaa 3180  
 aaggaggcaa ggtagggaga gcgcccacac tgtccatgct ccaggcccc tgggcccagct 3240  
 ccgagaaggc gccagtgaag gaccaggac caggccaygg tgcgggcagg catcactgtc 3300  
 tctagggtt tggctactgt tggcctggga gctgagagaa ggcactgaga gggacagtag 3360  
 gcggaggacc aggtgacggc agcatcgggg acacaggtgg ggcactcac tggactggc 3420  
 cctttagtgc tttgctgaa agagacacag tcacatggcc agatgagaac ttgcgatact 3480  
 agcctgcacc cactggctgg gaagatctct tccctgctccc acgcccctgt ctggatcccc 3540

tcccttgatga gccccagggt tatcagttgc tggctgtgce tgagcagctc tgggtgctct 3600  
 ccattgagaat gggggccatct gtcttctctc cttggagagg agctaccagg acagggacac 3660  
 ctcttaccctc acaccctcca gcagcctggc gtggcccccac cttggatgct acttgggtggg 3720  
 ggggtctggg ggggtgcccac gctctcatcg ggtttccctc ccccatcctg ccagtgcctc 3780  
 taccttgccc tgggctcgag ggggtggcacc aatggcggca gcagtggcgg cgctggctgt 3840  
 ggtggtgcca atgctcggag aacggcgggt tccactgcca gtgttggggg aagccttggg 3900  
 cagggccttc tctgaggctc cccgcgcgag aaggtgttc cctagctctt tgggtgtgtt 3960  
 gaggatgctg aaggccatcg actggcggcg gtcagcctgc aaggaagggc tgtcagaccg 4020  
 ggagacccaa tgcctgcctc ccaggccagc gtgtgtgccc acgctgtacc agcaaggtec 4080  
 cgcacaggcg tgccttcac ccccttcagc cccagcctca cctgtttagt agaagctgga 4140  
 gctgctttct tctgggctc agtagtgctc tgtttgcgcc cttcatgtcg gtctcgggga 4200  
 gtcattggggc gttggaaaca gctgggtggc tctctagact atggagaaga ggacagttag 4260  
 gcagacagta gcaagaggag tcacatctga agccagggtc cttgtcctct cagagctgag 4320  
 tggaccttgt aagtcaactg gcaacctgct ccccttccca actctggggc agatccttcc 4380  
 cttcccaaca gttcccatcc atgggtcagg ccttggaga gagggaaaga gagggggaag 4440  
 tgagggaagg agagagaagg ctcccttag tccctgggtg gctgggctc acctgagcac 4500  
 agtgcctggg taacaccag gagccaccgc gctacctca ggagtccag ggccctggtg 4560  
 gggctctagg gagaccggt tgcgctgctc cgggtgtgtg atgccagtgc cctcggctat 4620  
 ctggattggc tgcattgctg ctcggcgcag ggtctcttgg gggctctccag tttctatctc 4680  
 cctatctgtg atggtgccc a ggtcaggga aggctgcatg ggtggaagag gtggctcagt 4740  
 gaccatagct gtatggagat ggaggaggac ctggggctgt tccagaactc tacactcgcc 4800  
 cgacacttat ggtcgggacc cttcctgccc acgaggtaga aagacacaag cctccttcc 4860  
 tgtctgtct tctacctaa ccttgggcaa atggcacaag cagtgcagtc ctgaccagat 4920  
 tccctctctga gctcctgccc acccccaggg acttcacccc tgagtgcctt ccagctgtct 4980  
 gttccacctg gaacatgaga aggtcacccc ttcctctct cggccagtca gtgatccagg 5040  
 gccctagtgc tcaggctaga tcagcaggct ggattccaa gaaagggcagg gatgggaggc 5100  
 cctgcacagt gaccccaggc ctcaccctgg actccaggga tagcaggctc tcagatgtgg 5160  
 ggggcacact cgattgctct gctgcagctc tgcaatgccc ttcagctcat ccagctgctc 5220  
 aggtcctacc tggcaagtgc ccatgtagaa gctgttccct cctgtggaag gcagggagat 5280  
 gggaaacaaat gagcctggag tcggcaggct acctcctggc cctggcatct tgccagcctt 5340  
 tgcctgccacc taccocataa acttgaagcc cggcacacca gctctgattca gtgcccagg 5400  
 tgcaggagta cggcacacag actatttcta tcttaggggc ttgctacca ccttctccct 5460  
 ggagagggca gaagaggctc cacgcagaga ctgctactac atcttattca cctgccaaag 5520  
 cttgggtggc aacaccaga ggaacaaatt aaggaccggg aattaattcc caggggctcc 5580  
 ctggtgccca aaggacaaga gcttccaaga agagtctggc cagcctggcc tttccagcag 5640  
 cccatcaccg cctgagaagg gcatggagga ctccccacag ctaagtgtca caattgtgct 5700  
 gggaaatccg ggccctaac tctggctaag agtgccccc aacacagccag cccctagatg 5760  
 ggcaggtaag gaaggccctg aggctgcagg aaggaggggc aggtggagct ggatggtagc 5820  
 aaggaggcca gccttggatt tttaaaagc tttctctct tccctgtgcc acgatccacc 5880  
 tccagctcta attttgggt atagtaagtc cctgtagtcc cctcaccctg aggggcccc 5940  
 ctggacaccc cggcctggga acgacgagca gaactgcgag tgggtggggc gtagccaggc 6000  
 aagctgagca gggctgagtt gccataatcg ggagaaccca ggcgagctag agactgagta 6060  
 gaggagggtg ctgcaggct agcctgggaa gcaggagcag accgcgtgct gtagaacgat 6120  
 gagttggcgc tgcctggctc tccacatct agcttctgga agacagagtg aatctgttgc 6180  
 agtgtacagt ccttggcact gtacagaagc ttcctattcc cttccgaagc cctcagatcc 6240  
 cacggcacat ccatgtattc ccaactgctt tgcaaaaggt cttaaagtgt gtgtctgcaa 6300  
 gaaatgggce tttctgacag aagcctcac aagggtgtgc tgatgttgtc aagactcttc 6360  
 tacgcatttt tttcatggag tctattcata atgctttagc gtagggaatg cagagtgttt 6420

```

atcggccat cttggagatg aagtgc aaag aaataaagtg actagcccca aatcacactg 6480
ctaggaagta tcagagctgg ggctaggccc catgtctect gactagtcag gctcatccca 6540
cagcctctgc tgcctctcag tccaaacttc cagggccctt accatgttcc agaacttccc 6600
ccaacttctt ggtagcaggg ggcaccctaa acacacaggt cccccctgct gtaccagggg 6660
ccccctctec cctcctccca aacctccctt tcaagatgtg gaaacaaagg caagggcctg 6720
cagcctgtca ggcagtcac tgggcagcaa caatgcctct cagctgcatg gggcatgctg 6780
ggaggcacag gatgggctgc agcttcgcca cgttctctcc cttcacctg cacaggctca 6840
gtgctacgca tggagagaat gctagcctta gtcaggaggc agggatctaa tcctagccct 6900
gcctttctct tcagaagtgc ccttaaccaa gtcactgcc tttttaagac ctctcagctt 6960
tcccactgta acatggactg gctgctcctc cctcctgct cctgactgag tgcccagtg 7020
aaagatgcc ttgagaggaa gtgggaattg ctgacctgac gac 7063
    
```

<210> 6

<211> 197

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SIGNAL

10 <222> (1)..(28)

<400> 6

```

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
           20           25           30
    
```

```

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
    
```

```

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

```

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
           100           105           110
    
```

```

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

```

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

Asn Phe Ser Cys Val Leu Val Asp Pro Glu Gln Val Val Gln Arg His  
 145 150 155 160

Val Val Leu Ala Gln Leu Trp Val Arg Ser Pro Arg Arg Gly Leu Gln  
 165 170 175

Glu Gln Glu Glu Leu Cys Phe His Met Trp Gly Gly Lys Gly Gly Leu  
 180 185 190

Cys Gln Ser Ser Leu  
 195

- <210> 7
- <211> 1360
- 5 <212> DNA
- <213> Homo sapiens

<400> 7

```

gcggcgcgct cgaccacgca gctaaacaca gctaacttga gctttggagc tcctaaaggg 60
aagcttctgg aaaggaaggc tcttcaggac ctcttaggag ccaaagaaga ggacgttgtc 120
acagataaag agccaggctc accagctcct gacgcattga tcatgaccat gagacacaac 180
tggacaccag acctcagccc tttgtgggtc ctgctcctgt gtgcccacgt cgtcactctc 240
ctggtcagag ccacacctgt ctgcagacc accacagctg ccaactgctc agttagaagc 300
acaaaggacc cctgccccctc ccagccccca gtgttcccag cagcraagca gtgtccagca 360
ttggaagtga cctggccaga ggtggaagtg ccactgaatg gaacgctgag cttatcctgt 420
gtggcctgca gccgcttccc caacttcagc atcctctact ggctgggcaa tggttccttc 480
attgagcacc tcccaggccg actgtgggag gggagcacca gccgggaacg tgggagcaca 540
ggctgggctg agggcaacct tgccccccac ccaagaagcc ctgcccctca gccacagcag 600
tccacagcag cagggttaag actcagcaca gggccagcag cagcacaacc ttgaccagag 660
cttgggtcct acctgtctac ctggagtga cagtccttga ctgctgtag gctgctgga 720
tgcgcaacac accccctcct tctctgcttt gggctccttc tctcacaaa ttcaaactcc 780
attcccacct acctagaaa tcacagcctc cttataatgc ctctcctcc tgccattctc 840
tctccacctc tccattagcc ttctaactgt cctactcctc aactgctct actgctcaga 900
aaccaccaag actgttgatg ctttagcctt gcactccagg gccctacctg catttcccac 960
atgactttct ggaagcctcc caactattct tgcttttccc agacagctcc cactcccattg 1020
tctctgctca tttagtcccg tcttctctac cgcccagca ggggaacgct caagcctggt 1080
tgaaatgctg cctcttcagt gaagtcatec tctttcagct ctggccgcat tctgcagact 1140
tcttatcttc gtgctgatg tttttttttt cccccttcac tctaattggac tgttccaggg 1200
aagggatggg ggcagcagct gcttcggatc cacactgtat ctgtgtcate cccacatggg 1260
tctcataaaa ggattattca atggaggcat cctgacatct gtccatttag gcttcagttc 1320
cactcccagg aactttgcct gtcccacgag ggagtatggg 1360
    
```

- 10 <210> 8
- <211> 161
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

- 15 <220>
- <221> SIGNAL
- <222> (1) . . (28)

- 20 <400> 8

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  
 20 25 30

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

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

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  
 100 105 110

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

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

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

Pro

- <210> 9
- <211> 7812
- 5 <212> DNA
- <213> Homo sapiens



<400> 9

gtcgacggta cccccgggaa agatttaata cgactcacta tagggcgggga cagaattgat 60  
ctgtgagaga ctcatctagt tcatacccta ggtgaccctg ggggtggcat gggggtagat 120  
tagagatccc agtctgggat cctctggaga gtaggagtc caggagctga aggtttctgg 180  
ccactgaact ttggctaaag cagaggtgtc acagctgctc aagattccct ggtaaaaaag 240  
tgaagtgaa atagagggtc ggggcagtg cttcccagaa ggattgctcg gcatcctgcc 300  
cttcccagaa gcagctctgg tgctgaagag agcactgcct cctgtgtga ctgggtgagt 360  
ccatattctc tctttgggtc tcaattttgc cttcccta at gaaggggtaa gattggacta 420  
ggtaagcacc ttacaacct ttgtggtcat gagagctggg gtggggaagg attgtcactt 480  
gacccccca gctctgttc taagtgtga aagagctcca ggctatgcta cgggaggaga 540  
agccagctac tgaggaaaag ccagctactg aaaaaagcg ggagtggttt accattctcc 600  
tccccacct ttcaccagag aagaggactg tgtcacacat aaagagccag gctcaccagc 660  
tcctgacgca tgcacatga ccagagaca caactggaca ccaggtaggc cttggggcta 720  
cgcatgggca gggggggtag ggtgaggtct atgaacagaa tggagcaatg ggctaaccgc 780  
gagccttcac tccaaggcaa accaccagc gcacctggg ctgttgcttt aagaacctgg 840  
gcagatattg tagctctggc tccagctaa agcttctctg tactctgttc aataaagggc 900  
taaggggtgg gtgctgagg gtcctcttc ccgctctgat tccctggcta gaaccagac 960  
atctctgggc tggagttaca tectaccgc ggcagcccac tctgtctca gagccgctga 1020  
cctgtaactg tctttctc agacctcag cctttgtggg tctgtctct gtgtgccac 1080  
gtcgtcactc tctggctcag agccacacct gtctcgcaga ccaccacagc tgcactgcc 1140  
tcagttagaa gcacaaagga cccctgccc tccagcccc cagtgttccc agcagctaag 1200  
cagtgtccag cattggaagt gacctggcca gaggtggaag tgcactgag taagaagcac 1260  
agtgggtggg ggtgggctat gggcacagag gttcccaggg tggggtgac tctgagcgc 1320  
cagtccctt ctgcccagc accaccagc gagccagctg ggctgagcac gcaccattct 1380  
ccctcccaa cccagtgca tgggtgcagg cttggcgcag ctcccaagat gctccctatc 1440  
aaataggaca gagaactcaa gacataagta atggtcacag gacctccag agccttgggt 1500  
gcagtggaac ccaaggccag cccctccacc cagagcctgc tggcctctgg ccatctcaga 1560  
ggagcagcag ccatccagca ctgcctctgt cacctgggct cccaagtcac cgaggctggg 1620  
cactagaaaa ggtcatctg aggagacagg ttcagaagag gattcatcac gtgaaccaag 1680  
gaccattcct cacattcccc gtgtttaggg ctagggccctc tgggagacaa ctgcaactct 1740  
gtaaccggacg tcccaccta ggtgggtgtc agagcagttc tctaggttcc agatgcatgg 1800  
ggactggggg gagctggcag agagggcaca gcagagcagg gtaggggaag ggctgtct 1860  
tctgaagagc taactgctgc ctgtgtccct agatggaacg ctgagcttat cctgtgtggc 1920  
ctgcagcgc tccccaaact tcagcatcct ctactggctg ggcaatggtt ccttcattga 1980  
gcacctcca ggccgactgt gggaggggag caccaggtga gggctgcagc agccaggtgg 2040  
gtgggaagga agccttctgc ggccttctca tgaccttcc tcccttccg ctccagccgg 2100  
gaacgtggga gcacaggtac gcagctgtgc aaggcctgg tgetggagca gctgacct 2160  
gccttgcaca gcaccaact ctctgtgtg ctctgtggacc ctgaacaggt tgtccagcgt 2220  
cacgtcgtcc tggcccagct ctgggtgagg agcccaagga gaggcctcca ggaacaggag 2280  
gagctctgct tccatagtg gggaggaaa ggtgggctct gccagagcag cctgtgaact 2340  
aatgcccagc attctcaag gtcagocaga caaaaaggaa cttaggtctt gggcagagga 2400  
ggtgtagcct ggggcaaagt gatgagatgt cctcctttc cttggcctga tctgtgtctg 2460  
ccttcacttc cctaggtgg gctgagggca acctgcccc ccaccaaga agccctgcc 2520  
tccagccaca gcagtcaca gcagcagggt taagactcag cacaggcca gcagcagcac 2580  
aaccttgacc agagcttggg tctacctgt ctacctggag tgaacagtcc ctgactgcct 2640  
gtaggtctcg tggatgcga acacaccccc tcttctctg ctttgggtcc cttctctcac 2700  
caaattcaaa ctccattccc acctacctag aaaatcacag cctccttata atgcctctc 2760  
ctcctgccat tctctctcca cctatccatt agccttcta acgtcctact cctcactg 2820  
ctctactgt cagaaaccac caagactgt gatgccttag ccttgcactc cagggcccta 2880  
cctgcatttc ccacatgact ttctggaagc ctcccaacta ttcttgcttt tccagacag 2940  
ctccactcc catgtctctg ctcatctagt ccctcttcc tcaccgcccc agcaggggaa 3000

cgctcaagcc tggttgaaat gctgcctctt cagtgaagtc atcctctttc agctctggcc 3060  
 gcattctgca gacttcttat ctctgtgctg tatgtttttt ttttccccct tcaactctaat 3120  
 ggactgttcc aggggaagggg tgggggcagc agctgcttcg gatccacact gtatctgtgt 3180  
 catccccaca tgggtcctca taaaggatta ttcaatggag gcacccctgac atctgttcat 3240  
 ttaggcttca gttccactcc caggaacttt gcctgtccca cgaggagta tgggagagat 3300  
 ggactgccac acagaagctg aagacaacac ctgcttcagg ggaacacagg cgcttgaaaa 3360  
 agaaaagaga gaacagccca taatgctccc cgggagcaga ggcactaat ggagagtggg 3420  
 aagagcctgg aaagatgtgg cctcaggaaa agggatgaga gaaaggagggt ggtatggaag 3480  
 actcagcagg aacaaggtag gcttcaaaga gcctatatcc ctctttttcc cacaccgatc 3540  
 aagtcaactc agtactcacg ggagaaaaat agactttatt tacaagtaat aacattttaga 3600  
 aaagatccat ccccgccctt taaaaacctt cccatcactc caaatccccac cccagtgcaa 3660  
 gtctggggaa ggtaggggtg gagctgctgc tgaaggctgt cccccaccc cactcctgag 3720  
 acacagggcc catccgtcct gggaaagagc atcctctggc aggtgctccc accaggtcag 3780  
 acccagtcct ggacttcaag agtgagggcc cctgctgggc ccagccacca ggacagcagg 3840  
 aaccagggcc tactcctctt atggtccctt ctagatccag aggctaagag gaagactggc 3900  
 caggcccaag gacccagcca tcaaaaccag cctcaaatct ggttgtgatg gagaagtgac 3960  
 tttgctttaa gaaaaaagga ggcaaggtag ggagagcgcc cacactgtcc atgctccagg 4020  
 cccccgggc cagctccgag aaggcgccag tgaaggacca gggaccaggc cagggtgagg 4080  
 gcaggcatca ctgtctctag gggtttggct actgttggcc tgggagctga gagaaggcac 4140  
 tgagagggac agtaggcgga ggaccaggtg acggcagcat cggggacaca ggtggggcca 4200  
 ctcaactgga ctggcccttt agtgctttgc ctgaaagaga cacagtcaca tggccagatg 4260  
 agaacttgcg atactagcct gcacccactg gctgggaaga tctcttcctg ctcccacgcc 4320  
 cctgtctgga tccccctcct tgtgagcccc agggttatca gtgctggct gtgcctgagc 4380  
 agctctgggt gctctccatg agaatggggc catctgtctt ctctccttgg agaggagcta 4440  
 ccaggacagg gacacctctt accccacacc ctccagcagc ctggcgtggc cccatcttgg 4500  
 atgctacttg gtggggcggt ctgggggggt cccatgctct catcgggttt cctccccca 4560  
 tcctgccagt gcctctacct tgcccttggc tcgaggggtg gcaccaatgg cggcagcagt 4620  
 ggcggcgctg gctgtggtgg tggcaatgcg cggagaacgg cgggttccac tgcgagtgtt 4680  
 gggggaagcc ttggacaggg ccttctttga ggctccccgc cgcagaaggc tgttccctag 4740  
 cttcttgggt gtgttgagga tgctgaaggc catcgactgg cgccggctcag cctgcaagga 4800  
 agggctgtca gaccgggaga cccaatgctg ccttcccagg ccagcgtgct gtgccacgct 4860  
 gtaccagcaa ggtcccgcca gggcgtcgtc tcateccccct tcagccccag cctcacctgt 4920  
 ttagtagaag ctggagctgc tttcttctgg gcctcagtag tgctctgttt ggccttca 4980  
 tgtcggctctc ggggagtcct ggggcgtggg aaacagctgg tggccttctt agactatgga 5040  
 gaagaggaca gttaggcaga cagttagcaag aggagtcaca tctgaagcca ggtgtcttgt 5100  
 cctctcagag ctgagtgga cttgtaagtc aacgtgcaac ctgctccccct tcccactct 5160  
 gggccagatc ctccccctcc caacagttcc catccatggg tcaggccctt ggagagaggg 5220  
 aaagagaggg ggaagtgagg gaaggagaga gaaggctccc tttagtcctt ggtgagctgg 5280  
 gcctgaacct agcacagtgc tggagtaaca cccaggagcc accgcgccta cctcaggagt 5340  
 tccagggccc tgggggggct ctaggagagc ccgtttgctg tgctgcccgg tggatgagcc 5400  
 agtgccctcg gctatctgga ttggctgcat gctggtctgg cgcagggtct cttgggggtc 5460  
 tccagttttc atctcctcat ctgtgatggt gcccaggctc aggggaaggct gcatgggtgg 5520  
 aagaggtggt cagtggacca tagctgtatg gagatggagg agaacctggg gctgttccag 5580  
 aactctacac tcgcccgaca cttatggctg ggacccttcc tgccctacgag gtagaagagc 5640  
 acaagcctcc tttcctgttc tgctttctac ctaagcctct ggcaaatggc acaagcagt 5700  
 cagtcctgac cagattcctc tctgagctcc tgccctaccc cagggaactc acccctgagt 5760  
 gccctccagc tgtctgttcc acctggaaca tgagaaggtc accccttccc ctcttcggcc 5820  
 agtcagtgat ccagggccct agtgctcagg ctagatcagc aggtgggatt ccaaggaagg 5880

gcagggatgg gaggcctgc acagtgacc caggcctcac cctggactcc agggatagca 5940  
 ggtcttcaga tgtggggggc aactctgatt gcgctgctgc agctctgcaa tgcggttcca 6000  
 gtcacccagc tgctcaggct catcctggca agtgcccctg tagaagctgt tcttctctgt 6060  
 ggaaggcagg gaagtgggaa caaatgagcc tggagtcggc aggtcacctc ctggccctgg 6120  
 catcttgcca gcctttgctg ccacctaccc cataaacttg aagcccggca caccagtctg 6180  
 attcagtgcc gcaggtgcaq gagtacggca cacagactat ttctatccta ggggcttgct 6240  
 caccaccttc tccctggaga gggcagaaga ggtcacacgc agagactgct actacatctt 6300  
 attcacctgc caaggcttgg tggccaacac ccagaggaac aaattaagga ccgggaatta 6360  
 attcccaggg gctccctggt gcccaaagga caagagcttc caagaagagt ctggccagcc 6420  
 tggcctttcc agcagcccat caccgctga gaaggcctg gaggactccc cacagctaaq 6480  
 tgtcaccaat gtgctgggaa tcccgggccc ttaactctgg ctaagagtgc ccccaacaca 6540  
 gccagccccc agatgggag gtaaggaagg ccctgaggct gcaggaagga ggggcagggtg 6600  
 gagctggatg gtagcaagga ggccagcctt ggatttttaa aaagctttcc tcttttccct 6660  
 gtgccacgat ccaccttcca gtctaatttt ggggtatagt aagtcctctg agtcccctca 6720  
 cctggagggg cccactgga cccccggcc tgggaacgac gagcagaact gcgagtgggtg 6780  
 gggcggtagc caggcaagct gagcagggtc gagttgcoat aatcgggaga acccagggca 6840  
 gctagagact gtagtaggga ggtggctcgc aggctagcct gggaagcagg agcagaccgc 6900  
 gtgctgtaga acgatgagtt ggcgctgtct ggctcttcca catctagctt ctggaagaca 6960  
 gagtgaatct gttgcagtgt acagtccctg gcaactgtaca gaagcttccc attccttcc 7020  
 gaagccctca gatcccacgg cacatccatg tattcccac tgctttgcaa aggtccttaa 7080  
 agtgtgtgtc tgcaagaaat gggccttgtc gacagaagcc ctcaacaaggt ggtgctgatg 7140  
 ttgtcaagac tcttctacgc attttttca 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  
 gttccagaac ttccccaac ttcttggtag cagggggcac cctaaacaca caggctcccc 7440  
 ctgctgtacc aggggcccc tctcccctcc tcccaaacct ccccttcaag atgtggaac 7500  
 aaaggcaagg gcctgcagcc tgtcaggcag tccactgggc agcaacaatg cctctcagct 7560  
 gcatggggca tgctgggagg cacaggatgg gctgcagctt cgccacgttc tctcccttca 7620  
 cctgcacag gctcagtgt acgcatggag agaatgctag ccttagtcag gaggcagggg 7680  
 tctaactcta gccctgcctt tttcttcaga agtgccctta accaagtcac tgcccttttt 7740  
 aagacctctc agctttccca ctgtaacatg gactggctgc tcctccctcc ctgctcctga 7800  
 ctgagtgcac ag 7812

<210> 10  
 <211> 40  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 10

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
			20					25					30		
Gln	Cys	Pro	Ala	Leu	Glu	Val	Thr								
		35					40								

10

## PATENTOVÉ NÁROKY

- 5
1. IL-18-vazebný protein, IL-18BP, vybraný ze skupiny sestávající z:
    - (a) polypeptidů obsahujících aminokyselinové sekvence ze SEQ ID NO: 2 nebo 6;
    - (b) polypeptidů definovaných v (a) bez vedoucí sekvence;
    - (c) muteinů s alespoň 80% homologií s IL-18BP jak definováno v (a) nebo (b), fúzovaných pro-
  - 10 teinů, chemicky modifikovaných derivátů, cirkulárně permutovaných derivátů a jejich směsí polypeptidů definovaných v (a) nebo (b); a které se vážou k IL-18 a blokují produkci IFN- $\gamma$  indukovanou IL-18.
  2. IL-18BP podle nároku 1, přičemž tento IL-18BP je nevirový protein.
  - 15 3. IL-18BP podle nároku 2, přičemž tento IL-18BP je lidský protein.
  4. IL-18BP podle kteréhokoli z nároků 1 až 3, přičemž jeho molekulová hmotnost je přibližně 40 kDa.
  - 20 5. IL-18BP podle kteréhokoli z nároků 1 až 4, přičemž fúzovaný protein obsahuje imunoglobulin nebo jeho fragment.
  6. IL-18BP podle nároku 5, kterým je fúzovaný protein zvolený z IL-18BP fúzovaného ke konstantní oblasti těžkého řetězce IgG2.
  - 25 7. IL-18BP podle kteréhokoli z nároků 1 až 6, přičemž chemicky modifikované deriváty obsahují postranní řetězce polyethylenglykolu.
  - 30 8. IL-18BP podle kteréhokoli z nároků 1 až 7 v solubilní formě.
  9. IL-18BP podle kteréhokoli z nároků 1 až 8, který je glykosylovaný.
  10. IL-18BP podle kteréhokoli z nároků 1 až 8, který je neglykosylovaný.
  - 35 11. Molekula DNA kódující IL-18BP podle kteréhokoli z nároků 1 až 10.
  12. Molekula DNA podle nároku 11 opatřená na 3' konci stop kodonem.
  - 40 13. Molekula DNA obsahující sekvenci DNA v SEQ ID NO: 1 nebo 5, kde tato sekvence DNA kóduje IL-18BP podle kteréhokoli z nároků 1 až 10.
  14. Molekula DNA podle kteréhokoli z nároků 11 až 13 funkčně připojená k jiným DNA sekvencím umožňujícím expresi, jako promotorům nebo enhancerům.
  - 45 15. Molekula DNA podle kteréhokoli z nároků 11 až 14, přičemž tato DNA je genomová.
  16. Molekula DNA podle kteréhokoli z nároků 11 až 15, kterou je cDNA.
  - 50 17. Molekula cDNA podle nároku 16 obsahující sekvenci cDNA vybranou ze skupiny DNA sekvencí SEQ ID NO: 1 a 5.
  18. Molekula cDNA podle kteréhokoli z nároků 16 a 17, která je přizpůsobena pro expresi v bakteriálním hostiteli.

19. Replikovatelný vektor obsahující molekulu DNA podle kteréhokoli z nároků 11 až 18.
20. Transformovaná hostitelská buňka obsahující vektor podle nároku 19.
21. Transformovaná hostitelská buňka podle nároku 20, přičemž tato buňka je eukaryotická.
22. Transformovaná hostitelská buňka podle nároku 21, přičemž tato buňka je savčí.
23. Transformovaná hostitelská buňka podle nároku 22, přičemž tato buňka je zvolená z buněk lidských, opicích, myších a buněk vaječníků čínského křečka, CHO.
24. Transformovaná hostitelská buňka podle nároku 20, přičemž tato buňka je prokaryotická.
25. Způsob produkce IL-18BP podle kteréhokoli z nároků 1 až 10, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že zahrnuje pěstování hostitelské buňky podle kteréhokoli z nároků 20 až 24, za podmínek vhodných pro expresi IL-18BP.
26. Způsob produkce IL-18BP podle nároku 25, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že dále zahrnuje izolaci IL-18BP.
27. Protilátka specificky reagující se sekvencí ukázanou v SEQ ID NO: 2 nebo 6.
28. Protilátka podle nároku 27, přičemž tato protilátka je polyklonální.
29. Protilátka podle nároku 27, přičemž tato protilátka je monoklonální.
30. Protilátka podle nároku 29, přičemž tato protilátka je chimérní.
31. Protilátka podle nároku 30, přičemž tato protilátka je humanizovaná.
32. Anti-idiotypová protilátka proti protilátce podle nároku 27.
33. Způsob izolace IL-18BP podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že zahrnuje:  
 (a) průchod lidské tekutiny chromatografickou kolonou, na které je navázán IL-18,  
 (b) eluci proteinu schopného vazby k IL-18, a  
 (c) purifikaci tohoto proteinu.
34. Farmaceutický prostředek, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje virem kódovaný homolog IL-18BP, který se váže k IL-18 a blokuje produkci IFN- $\gamma$  indukovanou IL-18.
35. Farmaceutický prostředek, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje DNA kódující IL-18BP podle kteréhokoli z nároků 1 až 10 nebo DNA kódující virem kódovaný homolog IL-18BP, který se váže k IL-18 a blokuje produkci IFN- $\gamma$  indukovanou IL-18.
36. Použití IL-18BP podle kteréhokoli z nároků 1 až 10 nebo jeho virem kódovaného homologu jak definován v nároku 34 pro výrobu farmaceutického prostředku, pro léčbu autoimunitních onemocnění.
37. Použití IL-18BP podle kteréhokoli z nároků 1 až 10 nebo jeho virem kódovaného homologu jak definován v nároku 34 pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčbu diabetů typu I.
38. Použití IL-18BP podle kteréhokoli z nároků 1 až 10 nebo jeho virem kódovaného homologu jak definován v nároku 34 pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčbu sepse.

39. Použití IL-18BP podle kteréhokoli z nároků 1 až 10 nebo jeho virem kódovaného homologu jak definován v nároku 34 pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčbu odmítnutí štěpu.
- 5 40. Použití IL-18BP podle kteréhokoli z nároků 1 až 10 nebo jeho virem kódovaného homologu jak definován v nároku 34 pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčbu revmatoidní artritidy.
- 10 41. Použití IL-18BP podle kteréhokoli z nároků 1 až 10 nebo jeho virem kódovaného homologu jak definován v nároku 34 pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčbu zánětlivého onemocnění střev.
- 15 42. Použití IL-18BP podle kteréhokoli z nároků 1 až 10 nebo jeho virem kódovaného homologu jak definován v nároku 34 pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčbu roztroušené sklerózy.
- 20 43. Použití IL-18BP podle kteréhokoli z nároků 1 až 10 nebo jeho virem kódovaného homologu jak definován v nároku 34 pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčbu ischemického onemocnění srdce včetně infarktů.
- 25 44. Použití IL-18BP podle kteréhokoli z nároků 1 až 10 nebo jeho virem kódovaného homologu jak definován v nároku 34 pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčbu ischemického poškození mozku.
- 30 45. Použití IL-18BP podle kteréhokoli z nároků 1 až 10 nebo jeho virem kódovaného homologu jak definován v nároku 34 pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčbu lupénky.
- 35 46. Použití IL-18BP podle kteréhokoli z nároků 1 až 10 nebo jeho virem kódovaného homologu jak definován v nároku 34 pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčbu akutní nebo chronické hepatitidy.
- 40 47. Použití IL-18BP podle kteréhokoli z nároků 1 až 10 nebo jeho virem kódovaného homologu jak definován v nároku 34 pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčbu akutní nebo chronické pankreatitidy.
- 45 48. Použití IL-18BP podle kteréhokoli z nároků 1 až 10 pro purifikaci IL-18.
49. Použití protilátek podle kteréhokoli z nároků 27 až 31 v testu pro detekci IL-18BP.
50. Použití molekuly DNA kódující IL-18BP podle kteréhokoli z nároků 1 až 10 nebo jeho virem kódovaný homolog jak definován v nároku 34 pro výrobu farmaceutického prostředku pro genovou terapii.

25 výkresů

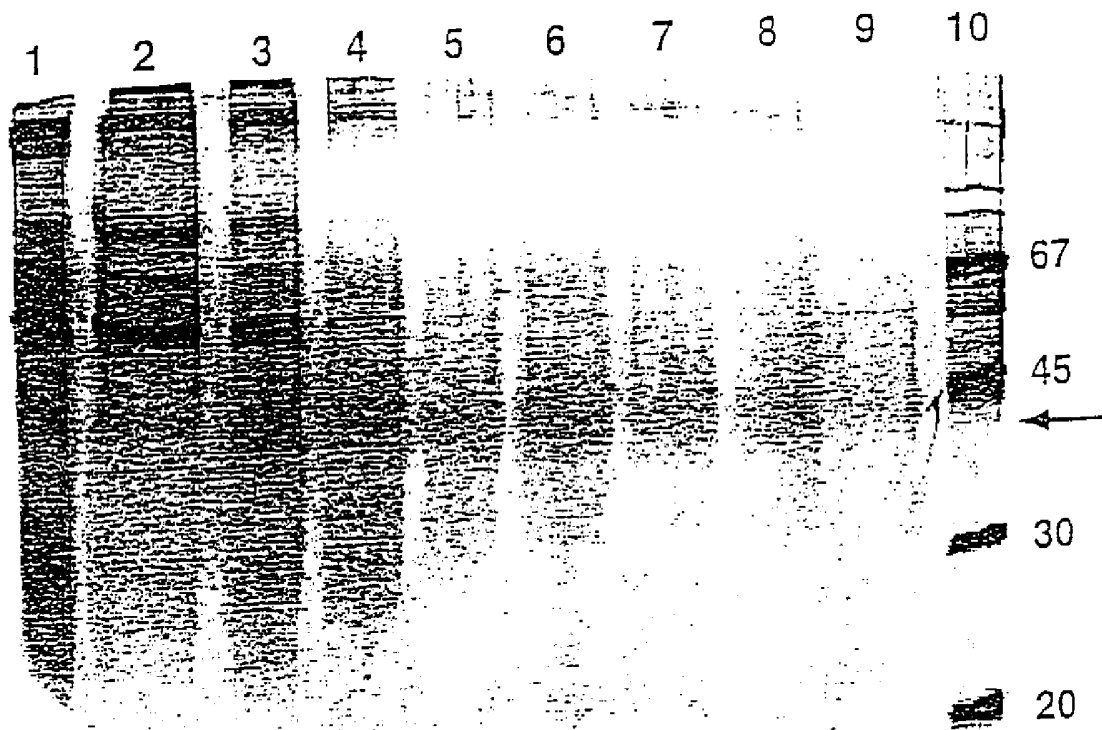


FIG. 1

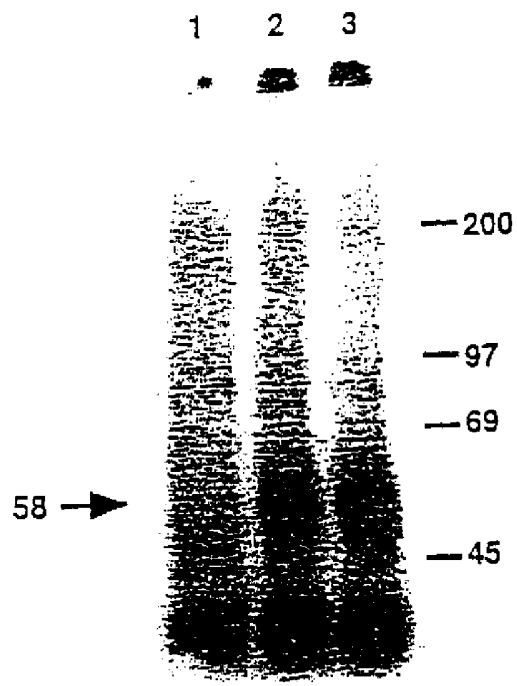


FIG. 2



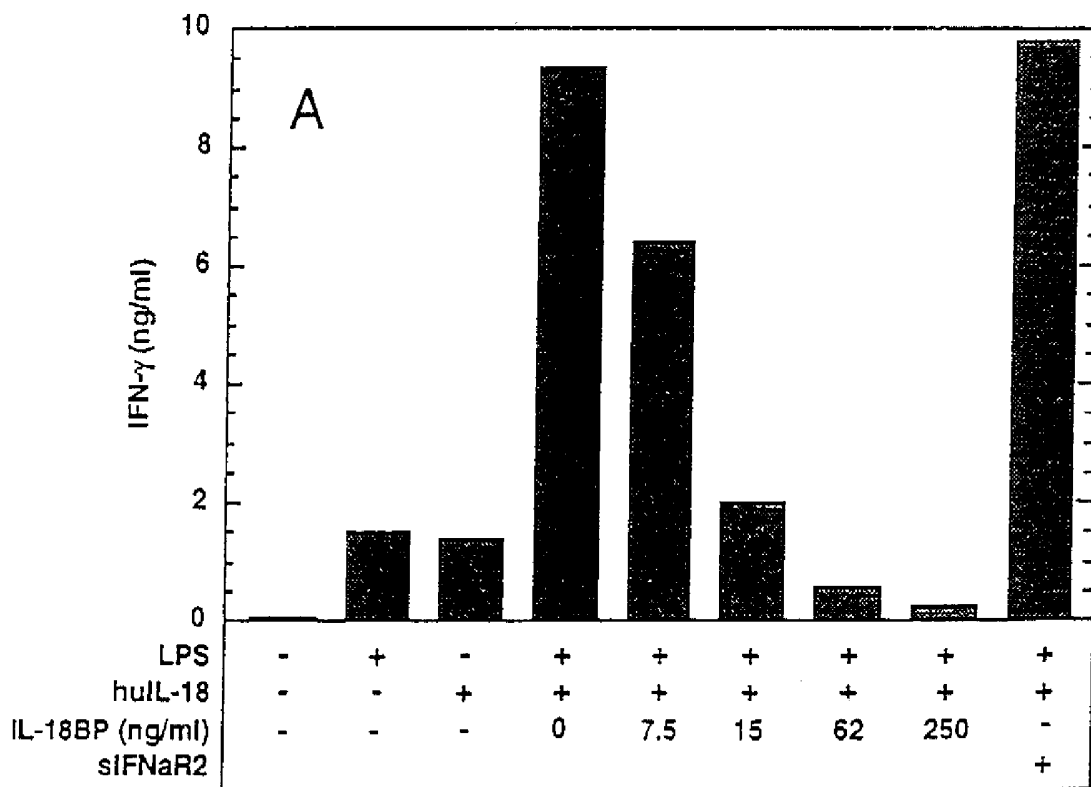


Fig. 3A

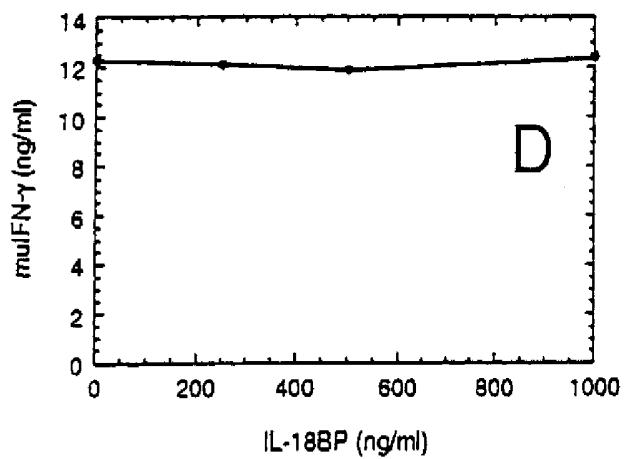
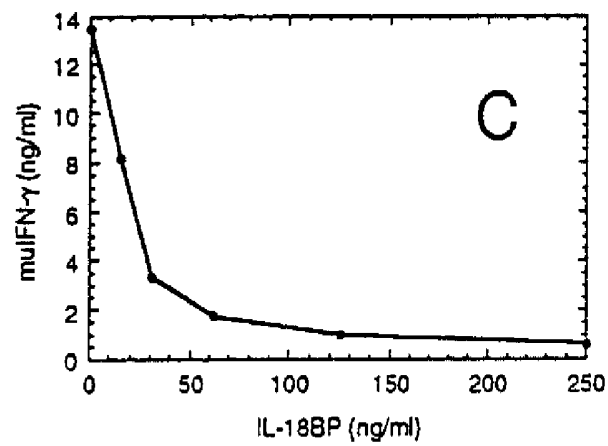
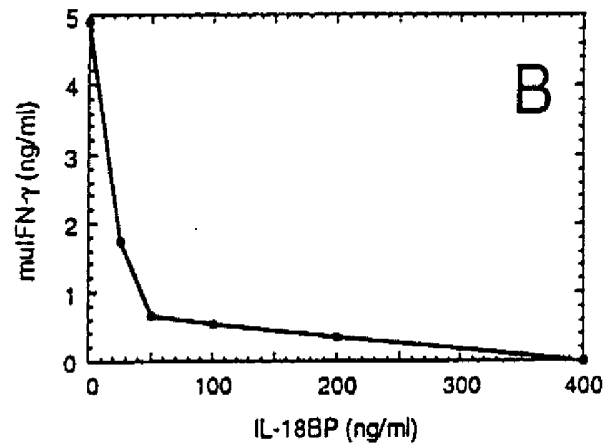


Fig. 3 B-D

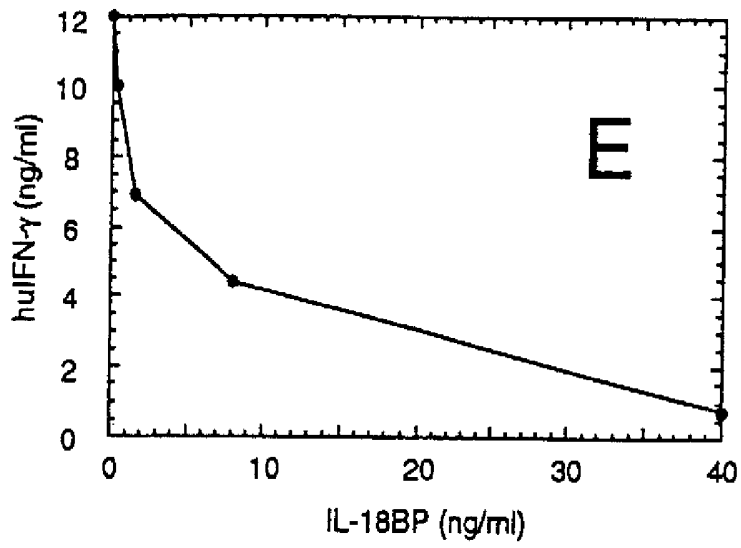


Fig. 3E

IL-18Bpa; DNA sequence:

Length: 1348 December 14, 1997 15:41 Type: N Check: 2207 ..

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 TTCCAGCAG CTAAGCAGTG  
 251 TCCAGCATTG GAAGTGACCT GGCCAGAGGT GGAAGTGCCA CTGAATGGAA  
 301 CGCTGAGCTT ATCCTGTGTG GCCTGCAGCC GCTTCCCCAA CTTCAGCATC  
 351 CTCTACTGGC TGGGCAATGG TTCCTTCATT GAGCACCTCC CAGGCCGACT  
 401 GTGGGAGGGG AGCACCAGCC GGGAACGTGG GAGCACAGGT ACGCAGCTGT  
 451 GCAAGGCCTT GGTGCTGGAG CAGCTGACCC CTGCCCTGCA CAGCACCAAC  
 501 TTCTCCTGTG TGCTCGTGA CCCTGAACAG GTTGTCCAGC GTCACGTCGT  
 551 CCTGGCCCAG CTCTGGGCTG GGCTGAGGGC AACCTTGCCC CCCACCCAAG  
 601 AAGCCCTGCC CTCCAGCCAC AGCAGTCCAC AGCAGCAGGG TTAAGACTCA  
 651 GCACAGGGCC AGCAGCAGCA CAACCTTGAC CAGAGCTTGG GTCCTACCTG  
 701 TCTACCTGGA GTGAACAGTC CCTGACTGCC TGTAGGCTGC GTGGATGCCG  
 751 AACACACCCC CTCCTTCTCT GCTTTGGGTC CTTTCTCTCA CCAAATTCAA  
 801 ACTCCATTCC CACCTACCTA GAAAATCACA GCCTCCTTAT AATGCCTCCT  
 851 CCTCCTGCCA TTCTCTCTCC ACCTATCCAT TAGCCTTCTT AACGTCCTAC  
 901 TCCTCACACT GCTCTACTGC TCAGAAACCA CCAAGACTGT TGATGCCTTA  
 951 GCCTTGCACT CCAGGGCCCT ACCTGCATTT CCCACATGAC TTTCTGGAAG  
 1001 CCTCCCAACT ATTCTTGCTT TTCCAGACA GCTCCCACTC CCATGTCTCT  
 1051 GCTCATTAG TCCCGTCTTC CTCACCGCCC CAGCAGGGGA ACGCTCAAGC  
 1101 CTGGTTGAAA TGCTGCCTCT TCAGTGAAGT CATCCTCTTT CAGCTCTGGC  
 1151 CGCATTCTGC AGACTTCCTA TCTTCGTGCT GTATGTTTTT TTTTCCCCC  
 1201 TTCACTCTAA TGGACTGTTT CAGGGAAGGG ATGGGGGCAC CAGCTGCTTC

Fig. 4

1251 GGATCCACAC TGTATCTGTG TCATCCCCAC ATGGGTCTC ATAAAGGATT

1301 ATTCAATGGA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

(SEQ ID NO:1)

IL-18Bpa; Protein sequence:

Length: 192 June 5, 1998 13:39 Type: P Check: 3073

1 MRHNWTPDLS PLWVLLCAH VVTLLVRATP VSQTTAATA SVRSTKDPCP

51 SQPPVFPAAK QCPALEVTWP EVEVPLNGTL SLSCVACSRF PNFSILYWLG

101 NGSFIEHLPG RLWEGSTSRE RGSTGTQLCK ALVLEQLTPA LHSTNFSCVL

151 VDPEQVVQRH VVLAQLWAGL RATLPPTQEA LPSSHSPQQ QG

(SEQ ID NO:2)

Fig. 4A

## IL-18BPb; DNA sequence

Length: 1038 June 19, 1998 14:10 Type: N Check: 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 CCTTGCCCCC CACCCAAGAA GCCCTGCCCT CCAGCCACAG  
 351 CAGTCCACAG CAGCAGGGTT AAGACTCAGC ACAGGGCCAG CAGCAGCACA  
 401 ACCTTGACCA GAGCTTGGGT CCTACCTGTC TACCTGGAGT GAACAGTCCC  
 451 TGA CTGCCTG TAGGCTGCGT GGATGCGCAA CACACCCCT CTTCTCTGC  
 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 CCGTCTTCTT  
 801 CACCGCCCCA GCAGGGGAAC GCTCAAGCCT GGTGAAATG CTGCCTCTTC  
 851 AGTGAAGTCA TCCTCTTTCA GCTCTGGCCG CATTCTGCAG ACTTCCTATC  
 901 TTCGTGCTGT ATGTTTTTTT TTTCCCCTT CACTCTAATG GACTGTTCCA  
 951 GGAAGGGAT GGGGGCACCA GCTGCTTCGG ATCCACACTG TATCTGTGTC  
 1001 ATCCCCACAT GGGTCCTCAT AAAGGATTAT TCAATGGA

(SEQ ID NO:3)

Fig. 5

huIL-18BPb  
Clone-m7  
peptide

1 MRHNWTPD LSPLWVLLC AHVVTLLVRA TPVSQTTAA TASVRSTKDP  
49 CPSQPPVFPA AKQCPALEVT WPEVEVPLSW AEGNLAPHPR SPALQPQQST  
99 AAGLRLSTGP AAAQP\*

(SEQ ID NO:4)

Fig. 5A

hulL18BPc.seq Length: 7063 July 16, 1998 19:47 Type: N Check: 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 TGCCTGTTCA  
 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 CTAAGCAGA GGTGTACAG 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 CCCCCAGCTC TGTTTCTAAG TGCTGAAAGA GCTCCAGGCT ATGCTACGGG  
 801 AGGAGAAGCC AGCTACTGAG GAAAAGCCAG CTA CTGAGAA AAAGCGGGAG  
 851 TGGTTTACCA TTCTCCTCCC CCACCTTCA 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 GTGTTCCCAG CAGCTAAGCA GTGTCCAGCA TTGGAAGTGA  
 1151 CCTGGCCAGA GGTGGAAGTG CCACTGAATG GAACGCTGAG CTTATCCTGT  
 1201 GTGGCCTGCA GCCGCTTCCC CAACTTCAGC ATCCTCTACT GGCTGGGCAA

Fig. 6



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 TTGGGTCCCTA CCTGTCTACC TGGAGTGAAC AGTCCCTGAC TGCCGTAGG  
 1851 CTGCGTGGAT GCGCAACACA CCCCCTCCTT CTCTGCTTTG GGTCCCTTCT  
 1901 CTCACCAAAT TCAAACCTCA TTCCCACCTA CCTAGAAAAT CACAGCCTCC  
 1951 TTATAATGCC TCCTCCTCCT GCCATTCTCT CTCCACCTAT CCATTAGCCT  
 2001 TCCTAACGTC CTA CTCTCTCA CACTGCTCTA CTGCTCAGAA ACCACCAAGA  
 2051 CTGTTGATGC CTTAGCCTTG CACTCCAGGG CCCTACCTGC ATTTCCACA  
 2101 TGACTTTCTG GAAGCCTCCC AACTATTCTT GCTTTTCCCA GACAGCTCCC  
 2151 ACTCCCATGT CTCTGCTCAT TTAGTCCCGT CTTCCCTACC GCCCCAGCAG  
 2201 GGGAACGCTC AAGCCTGGTT GAAATGCTGC CTCTTCAGTG AAGTCATCCT  
 2251 CTTTCAGCTC TGGCCGCATT CTGCAGACTT CCTATCTTCG TGCTGTATGT  
 2301 TTTTTTTTTC CCCCTTCACT CTAATGGACT GTTCCAGGGA AGGGATGGGG  
 2351 GCAGCAGCTG CTTCGGATCC AACTGTATC TGTGTCATCC CCACATGGGT  
 2401 CCTCATAAAG GATTATTCAA TGGAGGCATC CTGACATCTG TTCATTTAGG  
 2451 CTTTCAGTTC ACTCCCAGGA ACTTTGCCTG TCCCACGAGG GAGTATGGGA  
 2501 GAGATGGACT GCCACACAGA AGCTGAAGAC AACACCTGCT TCAGGGGAAC

Fig. 6A

2551 ACAGGCGCTT GAAAAAGAAA AGAGAGAACA GCCCATAATG CTCCCCGGGA  
 2601 GCAGAGGCCA CTAATGGAGA GTGGGAAGAG CCTGGAAAGA TGTGGCCTCA  
 2651 GGAAAAGGGA TGAGAGAAAG GAGGTGGTAT GGAAGACTCA GCAGGAACAA  
 2701 GGTAGGCTTC AAAGAGCCTA TATTCCTCTT TTTCCACAC CGATCAAGTC  
 2751 AACTCAGTAC TCACGGGAGA AAAATAGACT TTATTTACAA GTAATAACAT  
 2801 TTAGAAAAGA TCCATCCCCG GCCCTTAAAA ACCTTCCCAT CACTCCAAAT  
 2851 CCCACCCAG TGCAAGTCTG GGGAAGGTAG GGTGTGAGCT GCTGCTGAAG  
 2901 GCTGTCCCCC AACCCCACTC CTGAGACACA GGGCCCATCC GTCCTGGGAA  
 2951 AGAGCATCCT CTGGCAGGTG CTCCCACCAG GTCAGACCCA GTCCTGGACT  
 3001 TCAAGAGTGA GGGCCCCTGC TGGGCCCAGC CACCAGGACA GCAGGAACCA  
 3051 GGGCCTACTC CTCTTATGGT CCCTTCTAGA TCCAGAGGCT AAGAGGAAGA  
 3101 CTGGCCAGGC CCAAGGACCC AGCCATCAAA ACCAGCCTCA AATCTGGTTG  
 3151 TGATGGAGAA GTGACTTTGC TTTAAGAAAA AAGGAGGCAA GTAGGGAGA  
 3201 GCGCCACAC TGTCCATGCT CCAGGCCCCC TGGGCCAGCT CCGAGAAGGC  
 3251 GCCAGTGAAG GACCAGGGAC CAGGCCAGGG TGCGGGCAGG CATCACTGTC  
 3301 TCTAGGGGTT 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 TCCCTTGTGA  
 3551 GCCCCAGGGT TATCAGTTGC TGGCTGTGCC TGAGCAGCTC TGGGTGCTCT  
 3601 CCATGAGAAT GGGGCCATCT GTCTTCTCTC CTTGGAGAGG AGCTACCAGG  
 3651 ACAGGGACAC CTCTTACCCC ACACCCTCCA GCAGCCTGGC GTGGCCCCAT  
 3701 CTTGGATGCT ACTTGGTGGG GCGGTCTGGG GGGTGCCCAT GCTCTCATCG  
 3751 GGTTTCCCTC CCCCATCCTG CCAGTGCTC TACCTTGCCC TTGGCTCGAG  
 3801 GGGTGGCACC AATGGCGGCA GCAGTGGCGG CGCTGGCTGT GGTGGTGGCA

Fig. 6B

3851 ATGCGCGGAG AACGGCGGGT TCCACTGCGA GTGTTGGGGG AAGCCTTGG A  
 3901 CAGGGCCTTC TTTGAGGCTC CCCGCCG CAG 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 CTTTCATGTTC GTCTCGGGGA  
 4201 GTCATGGGGC GTGGGAAACA GCTGGTGGCC TTCTTAGACT ATGGAGAAGA  
 4251 GGACAGTTAG GCAGACAGTA GCAAGAGGAG TCACATCTGA AGCCAGGTGT  
 4301 CTTGTCCTCT CAGAGCTGAG TGGACCTTGT AAGTCAACGT GCAACCTGCT  
 4351 CCCCTTCCA ACTCTGGGCC AGATCCTTCC CTTCCCAACA GTTCCCATCC  
 4401 ATGGGTCAGG CCCTTGGAGA GAGGGAAAGA GAGGGGGAAG TGAGGGAAGG  
 4451 AGAGAGAAGG CTCCTTTAG TCCTTGGTGA GCTGGGCCTG ACCTGAGCAC  
 4501 AGTGCTGGAG TAACACCCAG GAGCCACCGC GCCTACCTCA GGAGTTCCAG  
 4551 GGCCCTGGTG GGGCTCTAGG GAGACCCGTT TGCGCTGCTG 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 GGTCGGGACC CTTCTGCCT ACGAGGTAGA AAGACACAAG  
 4851 CCTCCTTCC TGTTCTGCTT TCTACCTAAG CCCTGGGCAA ATGGCACAAG  
 4901 CAGTGCAGTC CTGACCAGAT TCCTCTCTGA GCTCCTGCCT ACCCCAGGG  
 4951 ACTTCACCCC TGAGTGCCCT CCAGCTGTCT GTTCCACCTG GAACATGAGA  
 5001 AGGTCACCCC TTCCCCTCTT CGGCCAGTCA GTGATCCAGG GCCCTAGTGC  
 5051 TCAGGCTAGA TCAGCAGGTG GGATTCCAAG GAAGGGCAGG GATGGGAGGC  
 5101 CCTGCACAGT GACCCAGGC CTCACCCTGG ACTCCAGGGA TAGCAGGTCT

Fig. 6C

5151 TCAGATGTGG GGGGCACACT CGATTGCGCT GCTGCAGCTC TGCAATGCGG  
 5201 TTCCAGTCAT CCAGCTGCTC AGGCTCATCC TGGCAAGTGC CCATGTAGAA  
 5251 GCTGTTCCCTT CCTGTGGAAG GCAGGGAAGT GGAACAAAT GAGCCTGGAG  
 5301 TCGGCAGGTC ACCTCCTGGC CCTGGCATCT TGCCAGCCTT TGCTGCCACC  
 5351 TACCCATAA ACTTGAAGCC CGGCACACCA GTCTGATTCA GTGCCGCAGG  
 5401 TGCAGGAGTA CGGCACACAG ACTATTTCTA TCCTAGGGGC TTGCTCACCA  
 5451 CCTTCTCCCT GGAGAGGGCA GAAGAGGTCA CACGCAGAGA CTGCTACTAC  
 5501 ATCTTATTCA CCTGCCAAGG 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 AGTGCCCCCA ACACAGCCAG  
 5751 CCCCTAGATG GGCAGGTAAG GAAGGCCCTG AGGCTGCAGG AAGGAGGGGC  
 5801 AGGTGGAGCT GGATGGTAGC AAGGAGGCCA GCCTTGGATT TTTAAAAAGC  
 5851 TTTCTCTTT TCCCTGTGCC ACGATCCACC TTCCAGTCTA ATTTTGGGGT  
 5901 ATAGTAAGTC CCTGTAGTCC CCTCACCTGG AGGGGCCCCA CTGGACACCC  
 5951 CGGCCTGGGA ACGACGAGCA GAACTGCGAG TGGTGGGGCG GTAGCCAGGC  
 6001 AAGCTGAGCA GGGCTGAGTT GCCATAATCG GGAGAACCCA GGCGAGCTAG  
 6051 AACTGAGTA GAGGAGGTGG CTCGCAGGCT AGCCTGGGAA GCAGGAGCAG  
 6101 ACCGCGTGCT GTAGAACGAT GAGTTGGCGC TGTCTGGCTC TTCCACATCT  
 6151 AGCTTCTGGA AGACAGAGTG AATCTGTTGC AGTGTACAGT CCCTGGCACT  
 6201 GTACAGAAGC TTCCCATTCC CTTCCGAAGC CCTCAGATCC CACGGCACAT  
 6251 CCATGTATT CCAACTGCTT TGCAAAGGTC CTAAAGTGT GTGTCTGCAA  
 6301 GAAATGGGCC TTGTGACAG AAGCCCTCAC AAGGTGGTGC TGATGTTGTC  
 6351 AAGACTCTTC TACGCATTTT TTTCATGGAG TCTATTCATA ATGCTTTGAG  
 6401 GTAGGGAATG CAGAGTGTTT ATCGGCCCAT TTTGGAGATG AAGTGCAAAG

Fig. 6D

6451 AAATAAAGTG ACTAGCCCCA AATCACACTG CTAGGAAGTA TCAGAGCTGG  
 6501 GGCTAGGCCC CATGTCTCCT GACTAGTCAG GCTCATCCCA CAGCCTCTGC  
 6551 TGTCCTCAG TCCAACTTC CAGGGCCCTT ACCATGTTCC AGAACTTCCC  
 6601 CCAACTTCTT GGTAGCAGGG GGCACCCTAA ACACACAGGT CCCCCCTGCT  
 6651 GTACCAGGGG CCCCCTCTCC CCTCCTCCA 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 GCCTTTTTCT TCAGAAGTGC CCTTAACCAA GTCACTGCC TTTTAAAGAC  
 6951 CTCTCAGCTT TCCCCTGTA ACATGGACTG GCTGCTCATC CCTCCCTGCT  
 7001 CCTGACTGAG TGCCCAGTGC AAAGATGCC TTAGAGGAA GTGGGAATTG  
 7051 CTGACCTGTC GAC

(SEQ ID NO:5)

IL-18BPc; Protein

Length: 197 June 5, 1998 13:41 Type: P Check: 3353 ..

1 MRHNWTPDLS PLWVLLCAH VVTLVLRATP VSQTTAATA SVRSTKDPCP  
 51 SQPPVFPAAK QCPALEVTWP EVEVPLNGTL SLSCVACSRF PNFSILYWLG  
 101 NGSFIEHLPG RLWEGSTSRE RGSTGTQLCK ALVLEQLTPA LHSTNFSCVL  
 151 VDPEQVVQRH VVLAQLWVRS PRRGLQEQQE LCFHMWGGKG GLCQSSL

(SEQ ID NO:6)

Fig. 6E

IL-18BPd; DNA

Length: 1360 June 19, 1998 14:55 Type: N Check: 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 CCTGCCCTC 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 CTTGGGTCCT ACCTGTCTAC CTGGAGTGAA CAGTCCCTGA  
 701 CTGCCTGTAG GCTGCGTGGA TGCGCAACAC ACCCCCTCCT TCTCTGCTTT  
 751 GGGTCCCTTC TCTACCAAA TTCAAaCTCC ATTCCCACCT ACCTAGAAAA  
 801 TCACAGCCTC CTTATaATGC CTCCTCCTCC TGCCATTCTC TCTCCACCTA  
 851 TCCATTAGCC TTCCTAACGT CCTACTCCTC AACTGCTCT ACTGCTCAGA  
 901 AACCACCAAG ACTGTTGATG CCTTAGCCTT GCACTCCAGG GCCCTACCTG  
 951 CATTTCACAC ATGACTTTCT GGAAGCCTCC CAACTATTCT TGCTTTTCCC  
 1001 AGACAGCTCC CACTCCCATG TCTCTGCTCA TTTAGTCCCG TCTTCCTCAC  
 1051 CGCCCCAGCA GGGGAACGCT CAAGCCTGGT TGAATGCTG CCTCTTCAGT  
 1101 GAAGTCATCC TCITTCAGCT CTGGCCGCAT TCTGCAGACT TCCTATCTTC  
 1151 GTGCTGTATG TTTTTTTTTT CCCCCTCAC TCTAATGGAC TGTTCCAGGG

Fig. 7

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

(SEQ ID NO:7)

IL-18BPd; protein

Length: 161 June 5, 1998 13:40 Type: P Check: 2239 ..

1 MRHNWTPDLS PLWVLLCAH VVTLVLRATP VSQTTTAATA SVRSTKDPCP  
51 SQPPVFPAAK QCPALEVTWP EVEVPLNGTL SLSCVACSRF PNFSILYWLG  
101 NGSFIEHLPG RLWEGSTSRE RGSTGWAEGN LAPHRSPAL QPQQSTAAGL  
151 RLSTGPAAAQ P

(SEQ ID NO:8)

Fig. 7A

## HulL-18BP gene

Length: 7812 July 15, 1998 11:55 Type: N Check: 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 GGTTAAAAAG TGAAAGTGAA  
 251 ATAGAGGGTC GGGGCAGTGC TTTCCAGAA GGATTGCTCG GCATCCTGCC  
 301 CTTCCCAGAA GCAGCTCTGG TGCTGAAGAG AGCACTGCCT CCCTGTGTGA  
 351 CTGGGTGAGT CCATATTCTC TCTTTGGGTC TCAATTTTGC CTTCCCTAAT  
 401 GAAGGGGTAA GATTGGACTA GGTAAGCATC TTACAACCAT TTGTGGTCAT  
 451 GAGAGCTGGG GTGGGAAGG 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 GGCGGGGTAG GGTGAGGTCT  
 751 ATGAACAGAA TGGAGCAATG GGCTAACCCG GAGCCTTAC TCCAAGGCAA  
 801 ACCACCCAGC GCACCTGGTG CTGTTGCTTT AAGAACCTGG GCAGATATTG  
 851 TAGCTCTGGC TCCAGTCTAA AGCTTCTCTG TACTCTGTTC AATAAAGGGC  
 901 TAAGGGGTGG GTGCTGAGGG GTCCTCTTC CCGCTCTGAT TCCCTGGCTA  
 951 GAACCCAGAC ATCTCTGGGC TGGAGTTACA TCCTTACCCG GGCAGCCCAC  
 1001 TCTGTCTCCA GAGCCGCTGA CCTGTA ACTG TCCTTTCCTC AGACCTCAGC  
 1051 CCTTTGTGGG TCCTGCTCCT GTGTGCCAC GTCGTCACTC TCCTGGTCAG  
 1101 AGCCACACCT GTCTCGCAGA CCACCACAGC TGCCACTGCC TCAGTTAGAA  
 1151 GCACAAAGGA CCCCTGCCCC TCCCAGCCCC CAGTGTTCCC AGCAGCTAAG

Fig. 8



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 AGCCTTGTTT  
 1501 GCAGTGGACC CCAAGGCCAG CCCCTCCACC CAGAGCCTGC TGGCCTCTGG  
 1551 CCATCTCAGA GGAGCAGCAG CCATCCAGCA CTGCCTCTGT CACCTGGGCT  
 1601 CCCAAGTCAC CGAGGCTGGG CACTAGAAAA GGTCATCCTG AGGAGACAGG  
 1651 TTCAGAAGAG GATTCATCAC GTGAACCAAG GACCATTCTT CACATTCCCC  
 1701 GTGTTTAGGG CTAGGGCCTC TCGGAGACAA CTGCACTTCT GTAACGGACG  
 1751 TTCCACCTA GGTGGTGTGC AGAGCAGTTC TCTAGGTTCC AGATGCATGG  
 1801 GGA CTGGGGG GAGCTGGCAG AGAGGGCACA GCAGAGCAGG GTAGGGGAAG  
 1851 GGCCTGCTCT TCTGAAGAGC TAACTGCTGC CTGTGTCCCT AGATGGAACG  
 1901 CTGAGCTTAT CCTGTGTGGC CTGCAGCCGC TTCCCAACT TCAGCATCCT  
 1951 CTA CTGGCTG GGCAATGGTT CCTTCATTGA GCACCTCCA GGCCGACTGT  
 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 CACGTCTGCC TGGCCAGCT CTGGGTGAGG  
 2251 AGCCCAAGGA GAGGCCTCCA GGAACAGGAG GAGCTCTGCT TCCATATGTG  
 2301 GGGAGGAAAG GGTGGGCTCT GCCAGAGCAG CCTGTGAACT AATGCCCAGC  
 2351 ATTCCTCAAG GTCAGCCAGA CAAAAGGAA CTTAGGTCTT GGGCAGAGGA  
 2401 GGTGTAGCCT GGGGCAAAGT GATGAGATGT CCCTCCTTTC CTTGGCCTGA  
 2451 TCCTTGTCTG CCTTCACTTC CCTAGGCTGG GCTGAGGGCA ACCTTGCCCC

Fig. 8A

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 ACGTCTACT CCTCACACTG CTCTACTGCT CAGAAACCAC CAAGACTGTT  
 2851 GATGCCTTAG CCTTGCACTC CAGGGCCCTA CCTGCATTC CCACATGACT  
 2901 TTCTGGAAGC CTCCCAACTA TTCTTGCTTT TCCCAGACAG CTCCCCTCC  
 2951 CATGTCTCTG CTCATTTAGT CCCGTCTTCC TCACCGCCCC AGCAGGGGAA  
 3001 CGCTCAAGCC TGGTTGAAAT GCTGCCTCTT CAGTGAAGTC ATCCTCTTTC  
 3051 AGCTCTGGCC GCATTCTGCA GACTTCCTAT CTTCTGTCTG TATGTTTTTT  
 3101 TTTTCCCCCT TCACTCTAAT GGACTGTTCC AGGGAAGGGA TGGGGGCAGC  
 3151 AGCTGCTTCG GATCCACACT GTATCTGTGT CATCCCCACA TGGGTCTCA  
 3201 TAAAGGATTA TTCAATGGAG GCATCCTGAC ATCTGTTTAT 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 AGTACTCAGG 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 GGAATTCAAG

Fig. 8B

3801 AGTGAGGGCC CCTGCTGGGC CCAGCCACCA GGACAGCAGG AACCAGGGCC  
3851 TACTCCTCTT ATGGTCCCTT CTAGATCCAG AGGCTAAGAG GAAGACTGGC  
3901 CAGGCCCAAG GACCCAGCCA TCAAAACCAG CCTCAAATCT GGTGTGTATG  
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 AGAACTTGC ATACTAGCCT GCACCCACTG GCTGGGAAGA  
4301 TCTCTTCTG CTCCCAGCC 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 GCGGCGCTG GCTGTGGTGG TGGCAATGGC  
4651 CGGAGAACGG CGGGTTCCAC TGCAGTGTT GGGGAAGCC TTGGACAGGG  
4701 CCTTCTTTGA GGCTCCCCGC CGCAGAAGGC TGTTCCCTAG CTTCTTGGGT  
4751 GTGTTGAGGA TGCTGAAGGC CATCGACTGG CGCCGGTCAG CCTGCAAGGA  
4801 AGGGCTGTCA GACCGGGAGA CCCAATGCTG CCTTCCCAGG CCAGCGTGCT  
4851 GTGCCACGCT GTACCAGCAA GGTCCCGCCA GGGCGTCGCT TCATCCCCCT  
4901 TCAGCCCCAG CCTCACCTGT TTAGTAGAAG CTGGAGCTGC TTTCTTCTGG  
4951 GCCTCAGTAG TGCTCTGTTT GCGCCCTTCA TGTCGGTCTC GGGGAGTCAT  
5001 GGGCGTGGG AAACAGCTGG TGGCCTTCTT AGACTATGGA GAAGAGGACA  
5051 GTTAGGCAGA CAGTAGCAAG AGGAGTCACA TCTGAAGCCA GGTGTCTTGT

Fig. 8C

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 TCGCCCCACA  
 5601 CTTATGGTCG GGACCCTTCC TGCCTACGAG GTAGAAAGAC ACAAGCCTCC  
 5651 TTTCTGTTC TGCTTTCTAC CTAAGCCCTG GGCAAATGGC ACAAGCAGTG  
 5701 CAGTCCTGAC CAGATTCTC TCTGAGCTCC TGCCTACCCC CAGGGACTTC  
 5751 ACCCCTGAGT GCCCTCCAGC TGTCTGTTCC ACCTGGAACA TGAGAAGGTC  
 5801 ACCCCTTCCC CTCTTCGGCC AGTCAGTGAT CCAGGGCCCT AGTGCTCAGG  
 5851 CTAGATCAGC AGGTGGGATT CCAAGGAAGG GCAGGGATGG GAGGCCCTGC  
 5901 ACAGTGACCC CAGGCCTCAC CCTGGACTCC AGGGATAGCA GGTCTTCAGA  
 5951 TGTGGGGGGC AACTCGATT GCGCTGCTGC AGCTCTGCAA TGCGGTTCCA  
 6001 GTCATCCAGC TGCTCAGGCT CATCCTGGCA AGTGCCCATG TAGAAGCTGT  
 6051 TCCTTCCTGT GGAAGGCAGG GAAGTGGGAA CAAATGAGCC TGGAGTCGGC  
 6101 AGGTCACCTC CTGGCCCTGG CATCTTGCCA GCCTTTGCTG CCACCTACCC  
 6151 CATAAACTTG AAGCCCGGCA CACCAGTCTG ATTCAGTGCC GCAGGTGCAG  
 6201 GAGTACGGCA CACAGACTAT TTCTATCCTA GGGGCTTGCT CACCACCTTC  
 6251 TCCCTGGAGA GGGCAGAAGA GGTCACACGC AGAGACTGCT ACTACATCTT  
 6301 ATTCACCTGC CAAGGCTTGG TGGCCAACAC CCAGAGGAAC AAATTAAGGA  
 6351 CCGGGAATTA ATTCCAGGG GCTCCCTGGT GCCCAAAGGA CAAGAGCTTC

Fig. 8D

6401 CAAGAAGAGT CTGGCCAGCC TGGCCTTTCC AGCAGCCCAT CACCGCCTGA  
6451 GAAGGGCATG GAGGACTCCC CACAGCTAAG TGTCACAATT GTGCTGGGAA  
6501 TCCCGGGCCC TTA ACTCTGG CTAAGAGTGC CCCAACACA GCCAGCCCCT  
6551 AGATGGGCAG GTAAGGAAGG CUCTGAGGCT CCAGGAAGGA GGGGCAGGTG  
6601 GAGCTGGATG GTAGCAAGGA GGCCAGCCTT GGATTTTTAA AAAGCTTTCC  
6651 TCTTTTCCCT GTGCCACGAT CCACCTTCCA GTCTAATTTT GGGGTATAGT  
6701 AAGTCCCTGT AGTCCCCTCA CCTGGAGGGG CCCCACTGGA CACCCCGGCC  
6751 TGGGAACGAC GAGCAGA ACT GCGAGTGGTG GGGCGGTAGC CAGGCAAGCT  
6801 GAGCAGGGCT GAGTTGCCAT AATCGGGAGA ACCCAGGCGA GCTAGAGACT  
6851 GAGTAGAGGA GGTGGCTCGC AGGCTAGCCT GGAAGCAGG AGCAGACCGC  
6901 GTGCTGTAGA ACGATGAGTT GGGCCTGTCT GGCTCTTCCA CATCTAGCTT  
6951 CTGGAAGACA GAGTGAATCT GTTGCAGTGT ACAGTCCCTG GCACTGTACA  
7001 GAAGCTTCCC ATTCCCTTCC GAAGCCCTCA GATCCCACGG CACATCCATG  
7051 TATCCCAAC TGCTTTGCAA AGGTCCTTAA AGTGTGTGTC TGCAAGAAAT  
7101 GGGCCTTGTC GACAGAAGCC CTCACAAGGT GGTGCTGATG TTGTCAAGAC  
7151 TCTTCTACGC ATTTTTTTCA TGGAGTCTAT TCATAATGCT TTGAGGTAGG  
7201 GAATGCAGAG TGTTTATCGG CCCATTTTGG AGATGAAGTG CAAAGAAATA  
7251 AAGTGA CTAG CCCCAAATCA CACTGCTAGG AAGTATCAGA GCTGGGGCTA  
7301 GGCCCCATGT CTCCTGACTA GTCAGGCTCA TCCCACAGCC TCTGCTGTCC  
7351 CTCAGTCAA ACTTCCAGGG CCCTTACCAT GTTCCAGAAC TTCCCCAAC  
7401 TTCTTGGTAG CAGGGGGCAC CCTAACACA CAGGTCCCCC CTGCTGTACC  
7451 AGGGGCCCC 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

Fig. 8E

7701 TTTCTTCAGA AGTGCCCTTA ACCAAGTCAC TGCCCTTTT AAGACCTCTC  
7751 AGCTTTCCA CTGTAACATG GACTGGCTGC TCATCCCTCC CTGCTCCTGA  
7801 CTGAGTGCCC AG

(SEQ ID NO:9)

Fig. 8F

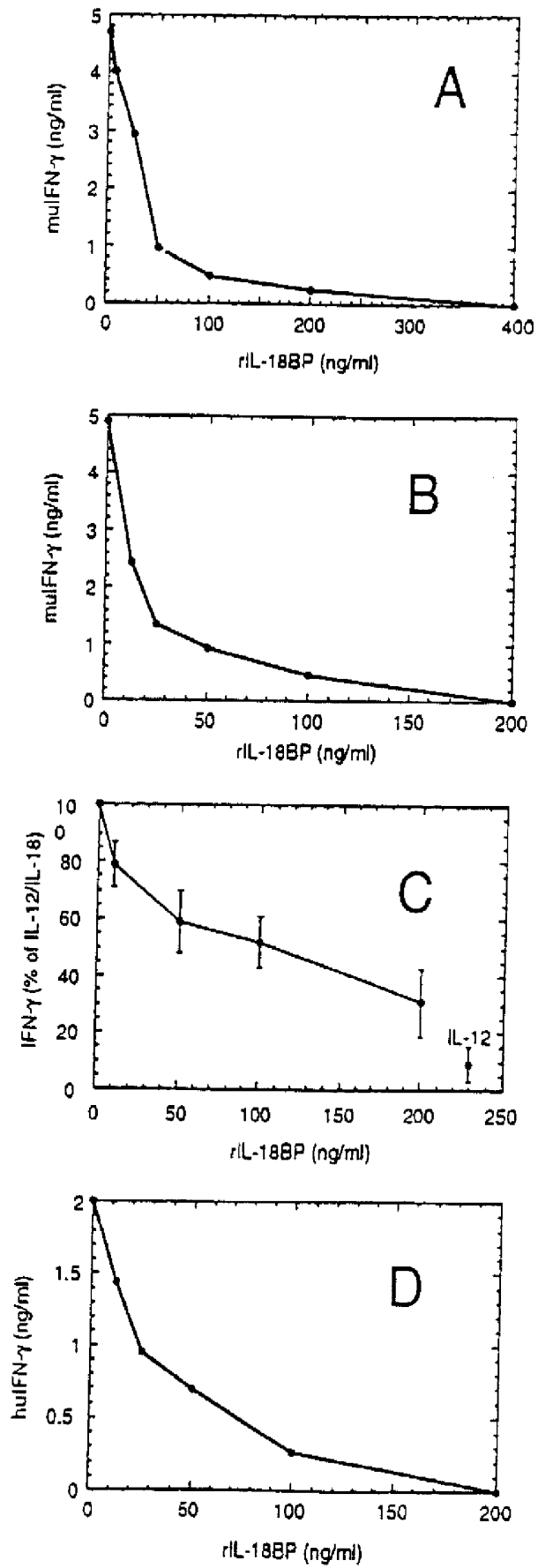


Fig. 9 A-D

Konec dokumentu