

Область изобретения

Данное изобретение относится к интерлейкин-18-связывающему белку (IL-18), в дальнейшем IL-18BP, который способен связывать IL-18. В частности, это изобретение относится к растворимому IL-18BP, получаемому из биологических жидкостей, к растворимым IL-BP, получаемым в результате экспрессии соответствующих ДНК-векторов в клетках-хозяевах, к кодируемому вирусом гомологам IL-18BP, получаемым посредством экспрессии соответствующих ДНК-векторов в клетках-хозяевах, к векторам, экспрессирующим различные IL-BP, к векторам, применимым для экспрессии IL-18BP у людей и других млекопитающих, к антителам против IL-18BP, к терапевтическому применению указанных IL-18BP посредством модулирования и/или блокирования активности IL-18, к терапевтическому применению указанных экспрессирующих векторов для модулирования и/или блокирования активности IL-18 и к применению антител.

Предпосылки изобретения

В 1989 году было описано индуцируемое эндотоксином сывороточное активное вещество, стимулирующее выработку интерферона-гамма (IFN- γ), выделенное из клеток селезенки мыши (27). Данное сывороточное активное вещество действует не как непосредственный индуктор IFN- γ , а скорее как костимулятор вместе с IL-2 или митогенами. Попытка выделить активное вещество из сыворотки мышей, предварительно обработанных эндотоксином, позволила выявить, по-видимому, гомогенный белок массой 50-55 кДа (26). Так как другие цитокины способны действовать как костимуляторы продукции IFN- γ , невозможность нейтрализации сывороточного активного вещества нейтрализующими антителами против IL-1, IL-4, IL-5, IL-6 или TNF позволяет предположить, что оно является отличным фактором. В 1995 г. те же исследователи показали, что индуцируемый эндотоксином костимулятор продукции IFN- γ присутствует в экстрактах печени мышей, предварительно обработанных P.acnes (31). В этой модели, популяция макрофагов печени (клетки Купфера) увеличивается, и для этих мышей становится летальной низкая доза бактериального липополисахарида (LPS), которая не является летальной для необработанных мышей. Фактор, названный IFN- γ - индуцирующим фактором (IGIF), позднее обозначенный как интерлейкин-18 (IL-18), выделили в гомогенном состоянии из 1200 г печени мышей, обработанных P.acnes. Вырожденные олигонуклеотиды, полученные из аминокислотных последовательностей очищенного IL-18, применяли для клонирования кДНК IL-18 мыши (31). IL-18 представляет собой белок массой 18-19 кДа из 157 аминокислот, который не имеет никакой явной гомологии с каким-либо пептидом из баз данных. Мессенджерные

РНК IL-18 и интерлейкина-12 (IL-12) легко обнаружить в клетках Купфера и активированных макрофагах. Рекомбинантный IL-18 стимулирует выработку IFN- γ более мощно, чем IL-12, по-видимому, посредством отдельного механизма (31). Подобно индуцированному эндотоксином сывороточному активному веществу сыворотки, IL-18 сам по себе не индуцирует IFN- γ , а действует, главным образом, как костимулятор с митогенами или IL-2. IL-18 усиливает пролиферацию Т-клеток, по-видимому, посредством IL-2-зависимого механизма, и увеличивает *in vitro* продукцию цитокинов -Th-1 и в случае сочетанного действия с IL-12 проявляет синергизм, увеличивая продукцию IFN- γ (24).

Было показано, что нейтрализующие антитела против IL-18 мыши предотвращают летальное действие низких доз LPS на мышей, предварительно обработанных P.acnes. Другие исследователи сообщили о значении IFN- γ как медиатора летального действия LPS у предварительно обработанных мышей. Например, нейтрализующие анти-IFN- γ - антитела предупреждали развитие у мышей генерализованной реакции Шварцмана (16), а обработанные галактозамином мыши с дефицитом IFN- γ -рецептора, оказываются резистентными к гибели, вызванной LPS (7). Следовательно, не является неожиданным, что нейтрализующие антитела против IL-18 мыши защищают мышей, предварительно обработанных P.acnes, от летального действия LPS (31). К тому же обработка антителами против мышиного IL-18 предотвращает тяжелую печеночную цитотоксичность у выживших мышей.

После того как клонировали мышиную форму, в 1996 г. описали последовательность кДНК IL-18 человека (38). Рекомбинантный IL-18 человека проявляет активность нативного IL-18 (38). Рекомбинантный IL-18 человека не проявляет непосредственной индуцирующей IFN- γ активности в Т-клетках человека, а действует как костимулятор продукции IFN- γ и других цитокинов Т-хелперов-1 (Th-1) (38). В настоящее время, IL-18 рассматривают главным образом как костимулятор продукции цитокинов Th-1 (IFN- γ , IL-2 и колониестимулирующего фактора гранулоцитов-макрофагов) (20), а также как костимулятор для FAS-лиганд-опосредованной цитотоксичности клонов натуральных-киллеров мыши (37).

В результате клонирования IL-18 из поврежденных тканей и изучения экспрессии гена IL-18, выявлена тесная связь этого цитокина с аутоиммунным заболеванием. У нетучных диабетических (NOD) мышей спонтанно развивается аутоиммунный инсулит и сахарный диабет, которые усиливают и синхронизируют однократной инъекцией циклофосамида. С помощью полимеразной цепной реакции (PCR) с обратной транскриптазой выявляют мРНК IL-18 в поджелудочной железе мышей-NOD на ранних

стадиях инсулита. После обработки циклофосфамидом быстро увеличивается содержание мРНК IL-18 и это предшествует возрастанию мРНК IFN- γ и далее развитию сахарного диабета. Интересно, что эти кинетические параметры подобны кинетике мРНК IL-12-p40, что приводит в результате к тесной корреляции с содержанием отдельных мРНК. Клонирование кДНК IL-18 из РНК поджелудочной железы с последующим секвенированием позволило выявить идентичность с последовательностью IL-18, клонированной из купферовых клеток и *in vivo* из предварительно активированных макрофагов. Макрофаги мышей-NOD отвечают на циклофосфамид экспрессией гена IL-18, тогда как макрофаги параллельно обработанных мышей Balb/c не реагируют. Поэтому, экспрессия IL-18 регулируется аномально у аутоиммунных мышей-NOD и тесно ассоциирована с развитием сахарного диабета (32).

IL-18 играет существенную роль в иммунорегуляции или воспалении посредством увеличения функциональной активности Fas-лиганда на Th-1 клетках (10). IL-18 также экспрессируется в коре надпочечника и поэтому является секретлируемым нейроиммунотулятором, играющим важную роль в настройке иммунной системы после воздействия стресса (9).

In vivo, IL-18 образуется в результате расщепления pro-IL-18 и, как оказалось, его эндогенная активность объясняет продукцию IFN- γ в случаях летальности, опосредованной P.acnes и LPS. Вследствие его активности, блокирование биологической активности IL-18 при заболевании человека является терапевтической стратегией при многочисленных болезнях. Этого достигают использованием растворимых рецепторов или блокирующих антител к связанному с клеткой рецептору IL-18.

Белки, связывающие цитокины, (растворимые рецепторы цитокинов) соответствуют внеклеточным лигандсвязывающим доменам соответствующих им рецепторов клеточной поверхности цитокинов. Их получают или посредством альтернативного сплайсинга пре-мРНК, свойственной рецептору клеточной поверхности, или посредством протеолитического расщепления рецептора клеточной поверхности. Такие растворимые рецепторы были описаны ранее, включая в частности растворимые рецепторы IL-6 и IFN- γ (30), TNF (11, 12), IL-1 и IL-4 (21), IFN- α/β (28, 29) и другие. Один цитокин-связывающий белок, названный остеопротегерин (OPG, также известный как фактор, ингибирующий остеокласты - OCIF), член TNFR/Fas семейства, является первым примером растворимого рецептора, который существует только как секретлируемая белок (1, 34, 39).

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к IL-18-связывающим белкам, (IL-18BP) и кодируемым вирусами гомологам IL-18BP (в дальнейшем, вирусные IL-18BP), и рекомбинантным белкам, мутеинам, функциональным производным, активным фрагментам и их преобразованные через циклизацию производные, способные связывать IL-18.

Изобретение также относится к способу выделения IL-18BP из жидкостей организма человека, и способу получения их с помощью рекомбинантных методик. Изобретение также относится к векторам, экспрессирующим IL-18BP, подходящим для экспрессии IL-18BP у людей и других млекопитающих. Отдельные IL-18BP, кодируемые вирусами гомологи IL-18BP, гибридные белки, мутеины, функциональные производные, активные фрагменты и их преобразованные через циклизацию производные по настоящему изобретению применимы для модулирования и/или блокирования активности IL-18.

Также обеспечены реплицируемые экспрессирующие векторы, содержащие последовательности ДНК, подходящие для экспрессии различных IL-18BP в клетках-хозяевах, трансформированных ими, и белки и полипептиды, продуцируемые посредством экспрессии такими хозяевами.

Кроме того, изобретение относится к фармацевтическим композициям, состоящим из приемлемых носителей и IL-18BP, или вирусных IL-18BP или векторов, экспрессирующих их у людей и других млекопитающих, для лечения заболеваний или состояний, при которых необходимо модулирование или блокирование активности IL-18.

Далее изобретение относится к антителам против IL-18BP и вирусных IL-18BP, подходящим для их аффинной очистки и иммуноанализа.

Описание чертежей

Фиг. 1 представляет SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия) IL-18-связывающего белка, очищенного по аффинной методике. Неочищенные белки мочи (500 л мочи здоровых людей, сконцентрированной ультрафильтрацией) наносят на колонку с IL-18-агарозой. Колонку промывали, а связанные белки элюировали при pH 2,2. Элюированные фракции нейтрализовывали и аликвоты анализировали с помощью SDS-PAGE (10% акриламид) в невосстанавливающих условиях и при окрашивании серебром. Дорожки представляют собой 1: неочищенные белки мочи (1,5 мкг наносят на гель); 2-9: элюаты 1-8 соответственно с колонки с IL-18-агарозой; 10: маркеры молекулярных масс в кДа, указанные справа. Стрелка указывает зону, соответствующую IL-18BP.

Фиг. 2 изображает автордиограмму SDS-PAGE (7,5% акриламид) комплексов, состоящих из ^{125}I -IL-18 (кажущаяся молекулярная масса 19 кДа), поперечно-связанного со следующими препаратами растворимого IL-18-связывающего белка; дорожка 1: промывка с IL-18-аффинной колонки; дорожка 2: элюция 2 с IL-18-аффинной колонки; дорожка 3: элюция 3 с IL-18-аффинной колонки. Справа указаны маркеры молекулярных масс (в кДа). Стрелка указывает поперечно-сшитый продукт (58 кДа).

Фиг. 3 изображает ингибирование индуцированной IL-18 продукции IFN- γ посредством BL-18BP

(А) Спленциты мыши стимулируют (24 ч, 37°C) указанными сочетаниями LPS (1 мкг/мл) и IL-18 человека (5 нг/мл), добавленными или непосредственно, или после предварительного смешивания (1 ч, 37°C) с IL-18BP мочи. Уровень $\text{muIFN-}\gamma$ (мыши) в культуре определяют через 24 ч.

(В) Спленциты мыши инкубируют (24 ч) с LPS (1 мкг/мл) вместе с IL-18 мыши (10 нг/мл), предварительно смешанный (1 ч, 37°C) с возрастающими концентрациями IL-18BP человека.

(С) Спленциты мыши инкубируют (24 ч) с LPS (10 мкг/мл) вместе с возрастающими концентрациями IL-18BP человека.

(D) Спленциты мыши инкубируют (24 ч) с Con A (конканавалином А) (мкг/мл) вместе с возрастающими концентрациями IL-18BP человека.

(Е) KG-1 клетки человека стимулируют TNF- α (20 нг/мл) и huIL-18 (человека) (25 нг/мл), добавленных или одних, или после предварительного смешивания (1 ч, 37°C) с IL-18BP мочи.

На фиг. 4 представлена последовательность кДНК IL-18BPa человека и белка. Сигнальный пептид подчеркнут.

На фиг. 5 представлена последовательность кДНК IL-18BPb человека и белка. Сигнальный пептид подчеркнут.

На фиг. 6 представлена последовательность кДНК IL-18BPc человека и белка. Сигнальный пептид подчеркнут.

На фиг. 7 представлена последовательность кДНК IL-18BPd человека и белка. Сигнальный пептид подчеркнут.

На фиг. 8 изображена последовательность гена IL-18BP человека. Определяют последовательность геномного клона (7,1 т.п.н.) человека и сравнивают с последовательностями различных клонов кДНК, выделенных из 3 кДНК библиотек. Общий стартовый кодон трансляции представляет собой нуклеотиды 683-685. Nu-MA1 ген локализуется на негативной цепи от нуклеотида 3578 до конца.

Фиг. 9 показывает влияние рекомбинантного IL-18BP на активность IL-18 человека и мыши.

His₆-меченый IL-18BPa кратковременно экспрессируют в клетках COS7 и очищают.

(А) IL-18 человека (5 нг/мл) предварительно смешивают или с His₆-меченым-IL-18BPa, или с RPMI и добавляют к клеткам селезенки мыши вместе с LPS (1 мкг/мл). Продукцию IFN- γ измеряют через 24 ч.

(В) IL-18 мыши (10 нг/мл) предварительно смешивают или с His₆-меченым-IL-18BPa, или с RPMI и добавляют к клеткам селезенки мыши вместе с LPS (1 мкг/мл). Продукцию IFN- γ измеряют через 24 ч.

(С) IL-18 человека (25 нг/мл) предварительно смешивают или с COS7-IL-18BPa, или с RPMI и добавляют к PBMC (мононуклеарные клетки периферической крови) человека в присутствии IL-12 (10 нг/мл).

(D) IL-18 человека (25 нг/мл) предварительно смешивают или с COS7-IL-18BPa, или с RPMI и добавляют к KG-1 клеткам человека в присутствии TNF- α (20 нг/мл).

Подробное описание изобретения

Данное изобретение относится к различным IL-18BP и вирусным IL-18BPs, которые связывают IL-18. Такие IL-18BP модулируют и/или блокируют биологические активности IL-18. Термин «IL-18BP и вирусные IL-18B» включает в себя зрелый белок (без сигнальной последовательности), белок, содержащий сигнальную последовательность, мутеины IL-18BP и вирусных IL-18BP, производные IL-18BP и вирусных IL-18BP и усеченные формы IL-18BP и вирусных IL-18BP и их соли.

Далее изобретение относится к ДНК, кодирующим различные IL-18BP, вирусные IL-18BP, мутеины, рекомбинантные белки, функциональные производные, активные фракции и их смеси. Указанная ДНК представляет собой геномную ДНК, кДНК, синтетическую ДНК, продукт PCR или их сочетания. Эти ДНК вставляют в реплицируемые носители экспрессии для экспрессии различных IL-18BP и вирусных IL-18BP в клетках-хозяине согласно данному изобретению. ДНК способны гибридизоваться с указанными ДНК при жестких условиях, а кодирование белков или полипептидов, которые связывают IL-18, также включают в данное изобретение.

Одна такая ДНК кодирует IL-18BP, включающий в себя аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и содержит терминирующий кодон на ее 3'-конце.

Экспрессирующие векторы, подходящие для экспрессии различных IL-18BP или вирусных IL-18BP у людей или других млекопитающих, т.е. для генной терапии, представляют собой вирусные векторы или другие типы векторов, в которые включают ген IL-18BP или кДНК

IL-18BP или ДНК, кодирующую IL-18BP по способу, который позволяет осуществить эффективную экспрессию IL-18BP или вирусного IL-18BP у людей и других млекопитающих. Данное изобретение также включает молекулы ДНК, гибридизирующиеся с указанными ДНК при жестких условиях и кодирующие белки и полипептиды, которые связывают IL-18.

Выделение IL-18BP проводят в соответствии с данным изобретением, например, посредством пропускания жидкостей организма человека, таких как моча или сыворотка, через хроматографическую колонку, к которой присоединен IL-18, и последующей элюции IL-18BP.

Различные IL-18BP и вирусные IL-18BP получают с помощью рекомбинантных методик, т.е. посредством экспрессирования IL-18BP в соответствующем хозяине, вслед за оперативным присоединением промоторов, энхансеров экспрессии, регуляторных последовательностей и так далее, приемлемых для данного используемого хозяина, что, например, предусматривает экспрессию в правильной ориентации.

Различные IL-18BP и вирусные IL-18BP и векторы для экспрессирования EL-18BP у людей и других млекопитающих применяют для лечения и облегчения состояний, в которые вовлечен IL-18 или которые вызваны избытком экзогенно введенного или эндогенно образованного IL-18. Такими состояниями являются, например, аутоиммунные заболевания, сахарный диабет I типа, ревматоидный артрит, отторжение трансплантата, воспалительное заболевание кишечника, сепсис, рассеянный склероз, ишемическая болезнь сердца (включая сердечный приступ), ишемическое поражение мозга, хронический гепатит, псориаз, хронический панкреатит, острый панкреатит и тому подобное.

Согласно данному изобретению IL-18BP выделяют из мочи здорового человека с помощью одной хроматографической стадии. Препарат неочищенной мочи человека, сконцентрированной из 500 л мочи здоровых людей, наносят на колонку, содержащей IL-18 человека, связанный с агарозой. Колонку промывают, а связанный белок элюируют при низком значении pH. Элюированные фракции нейтрализуют, а аликвоты анализируют с помощью SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия) (10% акриламида) при невозможности восстановления условий и окрашивании серебром. В частности, в элюированных фракциях выявлена белковая зона 40 кДа (фиг. 1).

Белок ~40 кДа, полученный на первой стадии, идентифицируют как IL-18-связывающий белок по его способности, в частности, попеременно связывать ¹²⁵I-IL-18 (фиг. 2). К тому же, белок ~40 кДа характеризуют, анализируя N-концевую последовательность белка. Аликвоты из элюированного белка подвергают SDS-PAGE, электроблоттинг на PVDF-мембране и

проводят анализ первичной структуры короткого фрагмента последовательности белка. Аналогично, аликвоты элюированного белка подвергают прямому анализу первичной структуры короткого фрагмента последовательности белка. В обоих случаях получены две полипептидные последовательности. Главная последовательность и минорная последовательность, последняя соответствующая фрагменту дефенсина человека (номер доступа p11398), начиная с аминокислоты 65. Вычитание известной последовательности дефенсина дает следующую последовательность:

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

1 . . . 5 10

где x представляет собой еще неопределенные аминокислоты. Чтобы получить более длинную и более точную последовательность и чтобы идентифицировать возможные остатки цистеина, аликвоты элюированной фракции восстанавливают ДТТ (дитиотрейтолом) при денатурирующих условиях, проводят реакцию с 4-винилпиридином, обессоливают с помощью микроультрафильтрационного устройства (Ultrafree, cutoff 10000Lf, Millipore) и проводят анализ первичной структуры короткого фрагмента последовательности белка. После цикла № 1 секвенирования, проводят реакцию остаточного белка с о-фталевым альдегидом, чтобы заблокировать все N-концевые полипептиды помимо Pro, а затем продолжают секвенирование. По этому способу получена следующая одноцепочечная белковая последовательность:

TPVSQXXXAA XASVRS TKDP CSPQPPVFPA AKQCPALEVT

1 10 20 30 40

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

Полученная последовательность значительно отличается от последовательности любого другого известного белка, что установлено исследованием баз данных по структуре белка. Однако исследование базы данных The Institute of Genomic Research (TOGR) ([HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) с помощью tblastn программы исследования предоставило файл кДНК, обозначенный THC12801, открытая рамка считывания (128 кодонов) которой, когда транслируется, содержит последовательность высоко гомологичную N-концевой последовательности IL-18BP. Таким образом представляют гомологию:

1 TPVSQXXXAA XASVRS TKDP CSPQPPVFPA AKQCPALEVT . . . 40

51 VTLVLRATXVXQT TTAATASVRS TKDP CSPQPPVFPA AKQCPALEVT WPE 100

(Верхняя последовательность (1-40) является последовательностью IL-18BP, выделенной согласно изобретению; нижняя последовательность (51-100) получена трансляцией кДНК файла THC123801 TIGR).

Последовательность кДНК, идентифицированная как THC 12801, является, однако, только EST (экспрессированная tag последова-

тельность), т.е. случайно выбранным клоном кДНК. Никогда не исследовали, содержит ли EST открытую рамку считывания, или экспрессируется ли белок с гена, соответствующего EST, или с самого EST, не идентифицировали ли когда-либо любую функцию белка, кодируемого TNC12801. Вообще нет информации, что TNC123801 содержит открытую рамку считывания, кодирующую IL-18BP.

Аффинно-очищенный IL-18BP мочи сохраняет способность связывать его меченый лиганд (^{125}I -IL-18), и после ковалентного поперечного связывания образует комплекс с молекулярной массой 58 кДа. Молекулярная масса комплекса соответствует соотношению 1:1 IL-18BP ~40 кДа и IL-18 19 кДа (фиг. 2).

Аффинно-очищенный IL-18BP блокирует биологическую активность IL-18 человека, равно как и мыши. Таким образом, когда IL-18BP добавляют к IL-18 или человека, или мыши, он блокирует способность IL-18 вызывать продукцию интерферона-гамма, если добавляют вместе с липополисахаридом (LPS) к культурам клеток селезенки мыши (фиг. 3).

В целях данного описания выражение «биологическая активность IL-18» относится, по крайней мере, к одному из следующих биологических свойств:

(i) индукция IFN- γ , главным образом, в качестве костимулятора с митогенами, IL-1, IL-12, TNF- α , LPS в различных типах клеток, таких как мононуклеарные клетки периферической крови человека, линия KG-1 клеток человека и Т-клетки,

(ii) увеличение пролиферации Т-клеток,

(iii) увеличение образования цитокина TN-1 *in vitro*, главным образом в качестве костимулятора,

(iv) синергизм с IL-12 в отношении увеличения продукции IFN- γ , действие костимулятора в отношении продукции IFN- γ и других цитокинов Т-хелперов-1,

(v) костимулирующее действие в отношении FAS-лиганд-опосредованной цитотоксичности клонов натуральных киллеров мыши,

(vi) индукция активации NF- κ B в KG-1 клетках человека, вероятно посредством индуцирования образования гомодимера 50 NF- κ B и гетеродимера p65/p50 NF- κ B,

(vii) индукция IL-8.

Используемое в описании выражение «связывание с IL-18» подразумевает способность IL-18BP связывать IL-18, что доказывают, например, посредством связывания IL-18BP с меченым IL-18 при аффинной очистке, как описывают в примере 2 описания.

Используемое в описании выражение «модулирование активности IL-18» подразумевает способность IL-18BP изменять любую активность IL-18, а не блокирование, например час-

тичное ингибирование, усиление и тому подобное.

Используемое в описании выражение «блокирование активности IL-18» относится к активности IL-18BP, которая блокирует, по крайней мере, одну из вышеприведенных биологических активностей IL-18. Активность IL-18BP, блокирующая IL-18, является примером способности IL-18BP блокировать ассоциированную с IL-18 экспрессию IFN- γ в спленоцитах мыши. Как будет показано более подробно ниже, модулирование или блокирование активности IL-18BP отчасти обусловлено тем, что IL-18BP ингибирует вызванную IL-18 активацию NF- κ B. К тому же, IL-18BP блокирует, по крайней мере, одну из следующих активностей IL-18, а именно индукцию IFN- γ в клетках человека и мыши, индукцию IL-8 и активацию NF- κ B.

ДНК-зонд для скрининга кДНК библиотек получают посредством PCR с обратной транскриптазой со специфическими смысловым и антисмысловым праймерами и РНК из Т-клеток человека Jurkat с праймерами из TIGR последовательности. Полученный продукт PCR подтверждают анализом последовательности ДНК. Продукт PCR метят ^{32}P и используют в качестве зонда для скрининга четырех кДНК библиотек человека, полученных из моноцитов периферической крови, из линии Т-клеток Jurkat, из РВМС (мононуклеарных клеток, периферической крови) и из селезенки человека. Различные независимые клоны кДНК соответствуют четырем вариантам сплайсинга IL-18BP (SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7). Все варианты сплайсинга кодируют предполагаемые растворимые секреторируемые белки. Наиболее изобилующий вариант (IL-18BP α) имеет открытую рамку считывания из 192 кодонов, кодирующую сигнальный пептид, прежде упоминаемый как «лидер-последовательность» из 28 аминокислотных остатков, за которым следует зрелый предполагаемый IL-18BP α , первые 40 остатков которого идеально соответствуют N-концевой белковой последовательности IL-18BP мочи (SEQ ID NO: 2). Положение остатков цистеина позволяет предположить, что этот полипептид принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов (Ig). Интересно, что каждый из четырех остатков Gln в зрелом IL-18BP α является участком возможного N-гликозилирования. Три других варианта IL-18BP имеются в меньшем количестве, чем IL-18BP α . Они включают в себя более короткую 1 т.п.н. кДНК IL-18BP β , кодирующую сигнальный пептид из 28 аминокислотных остатков с последующим зрелым белком из 85 аминокислотных остатков (SEQ ID NO: 4). Третий вариант, IL-18BP γ , представляет собой кДНК 2,3 т.п.н., кодирующую сигнальный пептид из 28 аминокислотных остатков с последующим зрелым IL-18BP из 169 аминокислотных остатков (SEQ ID NO: 6). Четвертый вариант, IL-18BP δ ,

кодирует сигнальный пептид из 28 аминокислотных остатков с последующим зрелым IL-18BP из 161 аминокислотных остатков (SEQ ID NO:8).

Для дальнейшего исследования возможно существование дополнительных вариантов сплайсинга IL-18BP, проводят скрининг геномной библиотеки человека зондом, соответствующим полной длине кДНК IL-18BP. Пять геномных клонов, отличающихся по длине, идентифицированы в этой библиотеке. Проводят анализ последовательности ДНК этих клонов с использованием внешнего и внутреннего праймеров. Всего из этих клонов собрана последовательность 7,8 т.п.н. (SEQ ID NO:9). Не идентифицируют никакого экзона, кодирующего трансмембранный (ТМ) рецептор с последовательностью 7,8 т.п.н. Все варианты, распределенные в обычном иницирующем сайте трансляции, кодируют тот же сигнальный пептид из 28 аминокислотных остатков и растворимые зрелые белки, отличающиеся по величине и С-концевым последовательностям. IL-18BP-локус содержит дополнительный ген, кодирующий белок 1 ядерного митотического аппарата (NUMA1), находящегося на минус цепи. Эти данные локализуют ген IL-18BP в хромосоме 11q 13 (36).

Исследование гомологии проводят на полной белковой последовательности IL-18BP и GenPept базе данных (HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov), используя Smith Watermann-алгоритм. Обнаружено, что гомологи IL-18BP экспрессируются в некоторых покс-вирусах в виде секретлируемых белков с ранее неизвестной функцией. Ранее сообщали, что вирусы кодируют различные рецепторы цитокинов и что такие кодируемые вирусами молекулы служат в качестве ловушек-рецепторов, что ингибирует иммунные ответы посредством нейтрализации их соответствующего цитокина (рассматривают Spriggs, МК, 1994, Cmt, Opin. Immunol., 6, 526-529). Поэтому изобретение далее относится к кодируемым вирусами гомологам IL-18BP, которые также являются блокаторами или модуляторами биологической активности IL-18. Примеры кодируемых вирусами гомологов IL-18BP представляют в табл. 1.

Согласно данному изобретению кодируемый вирусом гомолог экспрессируют в прокариотическом или эукариотическом хозяине. Используемое в описании выражение «кодируемый вирусом гомолог IL-18BP» подразумевает сходство, по крайней мере, 50% в последовательности из, по крайней мере, 70 аминокислотных остатков. Более предпочтительно сходство составляет, по крайней мере, 50%, по крайней мере, 60%, по крайней мере, 70%, по крайней мере, 80% или более предпочтительно, по крайней мере, 90% сходства в последовательности из 100 аминокислотных остатков.

Таблица 1

Кодируемые вирусами белки, проявляющие высокую гомологию с IL-18BP человека

Последовательность Gen Pept	Тип вируса
MCU60315_54	U60315 Вирус Molluscum contagiosum
MCU60315_53	U60315 Вирус Molluscum contagiosum
SWPHLSB_12	L22013 Вирус оспы свиньи
CV41KBPL_14	Вирус (оспо)вакцины
VVCGAA_5	Вирус натуральной оспы
U01161_3 174	Вирус эктомелии (вирус оспы мышей)
VVU18340_6	Вирус натуральной оспы
VVU18338_7	Вирус натуральной оспы
VVU18337_7	Вирус натуральной оспы
VARCG_7 173	Основной вирус натуральной оспы
MCU60315_51	Вирус Molluscum contagiosum
HNABV_1	Новый вирус, ассоциированный с гепатитом не-А, не-В

IL-18BPа экспрессируют в клетки COS7 обезьяны. С этой целью кДНК IL-18BPа включают в экспрессирующий вектор рEF-BOS млекопитающих. Кассету, кодирующую (His)₆-последовательность, присоединяют к 3'-концу ORF IL-18BP в рамке, чтобы облегчить очистку рекомбинантного белка. Клетки COS7 временно трансфицируют экспрессирующим вектором, а бессывороточную среду этих клеток (150 мл) концентрируют и очищают посредством металлхелатирующей хроматографии. IL-18BPа движется в виде одной полосы при SDS-PAGE с окрашиванием серебром при восстанавливающих и невосстанавливающих условиях и имеет такую же кажущуюся молекулярную массу, как масса IL-18BP мочи. Анализ белковой последовательности этого препарата выявляет такую же N-концевую последовательность как последовательность IL-18BP мочи. Анализ IL-18BPа с помощью иммуоблоттинга с антителами, полученными против IL-18BP мочи, выявляет зону с такой же молекулярной массой как масса белка мочи. Кроме того, используя иммунопреципитацию с последующими SDS-PAGE и автордиографией, устанавливают, что IL-18BPа вытесняет ¹²⁵I-IL-18BP мочи из соединения с антителом. Поэтому IL-18BPа структурно соответствует IL-18BP, выделенному из мочи.

Были проведены исследования способности сырого и очищенного IL-18BPа ингибировать биологическую активность IL-18. IL-18BPа ингибирует активность IL-18 человека и мыши в спленоцитах мыши, РВМС и линии KG-1 клеток человека (фиг. 9). Эти результаты подтверждают подлинность кДНК IL-18BPа, как кДНК, кодирующей биологически активный IL-18BP.

Далее данное изобретение относится к мутантам и фрагментам IL-18BP и вирусных IL-18BP, и к рекомбинантным белкам, состоящим из IL-18BP дикого типа и вирусных IL-18BP или

их мутеинов или фрагментов, слитых с другим полипептидом или белком и характеризующихся способностью связывать IL-18 или его гомологи.

Используемый в описании термин «мутеины» относится к аналогам IL-18BP или аналогам вирусного IL-18BP, в которых один или более аминокислотных остатков нативного IL-18BP или вирусного IL-18BP замещают различными аминокислотными остатками или удаляют, или один или более аминокислотных остатков присоединяют к последовательности нативного IL-18BP или вирусного IL-18BP без значительного изменения способности полученных продуктов связывать IL-18 по сравнению с IL-18BP дикого типа или вирусным IL-18BP. Эти мутеины получают посредством известного синтеза и/или методами сайт-направленного мутагенеза, или любого другого известного метода, приемлемого для этого.

Предпочтительно любой такой мутеин имеет последовательность аминокислот существенно повторяющую последовательность IL-18BP, существенно повторяющую последовательность вирусного IL-18BP, такую, чтобы иметь, по существу, одинаковую активность с IL-18BP. Одной активностью является его способность связывать IL-18. Поскольку мутеин характеризуется значительной IL-18-связывающей активностью, его используют для очистки IL-18, как, например, посредством аффинной хроматографии, и таким образом полагают, что он имеет активность, подобную активности IL-18BP. Так, имеет ли любой данный мутеин, по существу, такую же активность как IL-18BP можно определить с помощью рутинных экспериментов, в которых такой мутеин подвергают, например простому конкурентному сэндвич-анализу, чтобы установить связывает ли он или нет соответственно меченный IL-18, и таким как радиоиммуноанализ и EUSA (твердофазный иммуноферментный анализ).

В предпочтительном осуществлении любой такой мутеин имеет, по крайней мере, 40% идентичности или гомологии с последовательностью или IL-18BP, или кодируемого вирусом гомолога IL-18BP. Более предпочтительно он имеет, по крайней мере, 50%, по крайней мере, 60%, по крайней мере, 70%, по крайней мере, 80% или наиболее предпочтительно, по крайней мере, 90% идентичности или гомологии с ней.

Мутеины полипептидов IL-18BP или мутеины вирусных IL-18BP, применимые в соответствии с данным изобретением, или нуклеиновая кислота, кодирующая их, включают в себя определенный набор существенно соответствующих последовательностей, как пептиды замещения или полинуклеотиды, которые рутинно получают посредством одного из обычных способов на данном уровне техники без излишних экспериментов на основании инструкций и руководства, представленных в описании. Под-

робное описание химии и структуры белка см. Schulz G.E. et al., Principles of Protein Structure, Spring-Verlag, New York, 1978; и Creighton, T.E., Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, которые цитируют в описании. Для ознакомления с заменами в нуклеотидной последовательности, например, такими как кодонные предпочтения, см. Ausubel et al., supra, at A, 1.1-A.1.24, и Sambrook et al., supra, в приложениях C и D.

Предпочтительными заменами в отношении мутеинов согласно данному изобретению являются замены, известные как консервативные. Консервативные замены полипептидов или белков IL-18BP или вирусных IL-18BP включают в себя синонимические аминокислоты, группы которых характеризуются достаточно похожими физико-химическими свойствами, что при замещениях между членами группы сохраняется биологическая функция молекулы, Grantham, Science, Vol. 185, pp. 862-864 (1974). Ясно, что вставки и делеции аминокислот в указанных последовательностях можно производить без изменения их функции, особенно если вставки и делеции вовлекают только несколько аминокислот, например меньше тридцати, и предпочтительно меньше десяти, и не удаляют или замещают аминокислоты, которые являются существенными для функциональной конформации, например остатки цистеина, Anfinsen, "Principles That Govern The Folding of Protein Chains", Science, Vol. 181, pp. 22-20 (1973). Белки и мутеины, образованные с помощью таких делеции и/или вставок, входят в компетенцию данного изобретения.

Однако остатки цистеина, которые не являются существенными для биологической функции, замещают на другие остатки, например, чтобы избежать образования нежелательных внутримолекулярных и межмолекулярных дисульфидных мостиков, которые вызывают снижение активности IL-18BP.

Предпочтительные синонимические аминокислотные группы представлены в табл. 2. Более предпочтительно синонимические аминокислотные группы представляют собой группы, перечисленные в табл. 3, и наиболее предпочтительно синонимические аминокислотные группы представляют собой группы, перечисленные в табл. 4.

Таблица 2

Предпочтительные группы синонимических аминокислот

Аминокислота	Синонимическая группа
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

Таблица 3

Более предпочтительные группы синонимических аминокислот

Аминокислота	Синонимическая группа
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

Таблица 4

Наиболее предпочтительные группы синонимических аминокислот

Аминокислота	Синонимическая группа
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	Met

Примеры производства аминокислотных замен в белках, которые используют для полу-

чения мутеинов полипептидов или белков IL-18BP, или мутеинов вирусных IL-18BP, для применения в данном изобретении, включают любые известные стадии способов, таких как представленные в патентах США RE 33653, 4959314, 4588585 и 4737462 Mark et al.; 5116943 Koths et al., 4965195 Namen et al.; 4879111 Chong et al.; и 5017691 Lee et al; и белки с замещенным лизином представляют в патентах США № 4904584 (Shaw et al.).

В другом предпочтительном направлении данного изобретения мутеин IL-18BP или вирусного IL-18BP имеет аминокислотную последовательность, по существу, соответствующую последовательности IL-18BP или вирусного IL-18BP. Термин «по существу соответствующая» предназначают для рассматриваемых белков с минорными изменениями в последовательности природного белка, которые не затрагивают основные характеристики природных белков, в особенности, что касается их способности связывать IL-18. Полагают, что тип изменений, которые обычно относят к «по существу соответствующие», являются такими изменениями, которые происходят в результате общепринятых методов мутагенеза ДНК, кодирующих эти белки, приводящие в результате к немногим минорным модификациям, и скринингу требуемой активности по вышеописанному способу. Кроме связывания IL-18 мутеины также модулируют и/или блокируют активность IL-18.

Согласно данному изобретению мутеины включают в себя белки, кодируемые нуклеиновой кислотой, такой как ДНК или РНК, которые гибридизуются с ДНК или РНК, которые кодируют IL-18BP или кодируют вирусный IL-18BP согласно данному изобретению при жестких условиях. Изобретение также включает в себя такую нуклеиновую кислоту, которая также применима в качестве зонда при идентификации и очистке требуемой нуклеиновой кислоты. Кроме того, такая нуклеиновая кислота является основным кандидатом для определения кодирует ли она полипептид, который сохраняет функциональную активность IL-18BP данного изобретения. Термин «жесткие условия» относится к гибридизации и условиям последующего промывания, которые обычны на данном уровне техники и общепринято упоминаются как «жесткие». См. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, supra, Interscience, N.Y., 6.3 и 6.4 (1987, 1992), и Sarobrook et al., supra. Без ограничения примеры жестких условий включают в себя условия промывания 12-20° ниже рассчитанной температуры гибрида при исследовании в, например, 2 x SSC и 0,5% додецилсульфате натрия в течение 5 мин, 2 x SSC и 0,1% SDS в течение 15 мин; 0,1 x SSC 0,5% SDS при 37°C в течение 30-60 мин, а затем 0,1 x SSC и 0,5% SDS при 68°C в течение 30-60 мин. Специалисты в данной области понимают, что жесткие условия также зависят от длины последо-

вательности ДНК, олигонуклеотидных зондов (как, например, 10-40 оснований) или смешанных олигонуклеотидных зондов. Если применяют смешанные зонды, предпочтительно используют хлорид тетраметиламмония (ТМАС) вместо SSC. См. Ausubel, выше.

Далее изобретение относится к нуклеиновым кислотам, которые кодируют IL-18BP согласно данному изобретению, но которые отличаются по последовательности кодона вследствие вырожденности генетического кода. Изобретение также относится к таким ДНК, которые, возможно, не гибридизуются при жестких условиях с последовательностями ДНК, представленными на фиг. с 4 до 7, но тем не менее кодируют IL-18BP по настоящему изобретению.

Термин «гибридный белок» относится к полипептиду, содержащему IL-18BP или вирусный IL-18BP, или их мутеины, слитые с другим белком, который, например, имеет продолжительное время циркуляции в жидкостях организма. Таким образом, IL-18BP или вирусный IL-18BP могут быть слиты с другим белком или полипептидом и тому подобным, например иммуноглобулином или его фрагментом. Он также может быть слит с полиэтиленгликолем (PEG) для пролонгирования времени циркуляции.

Термин «соли», используемый в описании, относится как к солям карбоксильных групп, так и к солям присоединения кислот аминогрупп IL-18BP, вирусного IL-18BP, мутеинов или их рекомбинантных белков. Соли карбоксильной группы, образованные посредством способов, известных в данной области, включают неорганические соли, например соли натрия, кальция, аммония, железа или цинка и подобные, и соли, образованные с органическим основанием, например аминами, такими как триэтиламин, аргинин или лизин, пиперидин, новокаин и подобные. Соли присоединения кислот включают, например, соли минеральных кислот, такие как, например, хлористо-водородная кислота или фосфорная кислота, и соли органических кислот такие как, например, уксусная кислота или щавелевая кислота. Конечно, любые такие соли должны иметь активность, подобную IL-18BP.

Термин «функциональные производные», используемый в описании, подразумевает производные IL-18BP или вирусного IL-18BP и их мутеинов и рекомбинантных белков, которые получают, например, из функциональных групп, существующих в виде боковых цепей на остатках или N- или C-концевых группах, в соответствии с методиками, известными в данной области, и их включают в изобретение, поскольку они остаются фармацевтически приемлемыми, т.е. они не разрушают активность белка, которая, по существу, подобна активности IL-18BP или вирусного IL-18BP, и не придают токсические свойства композициям, содержащим их. Эти производные включают в себя, например, боковые цепи полиэтиленгликоля, которые мас-

кируют антигенные участки и продлевают пребывание IL-18BP или вирусного IL-18BP в биологических жидкостях. Другие производные включают алифатические эфиры карбоксильных групп, амиды карбоксильных групп посредством реакции с аммиаком или с первичными или вторичными аминами, N-ацильные производные свободных аминогрупп остатков аминокислот, образованных с ацильными компонентами (например, алканоильными или карбоциклическими ароильными группами), или O-ацильные производные свободных гидроксильных групп (например, групп остатков серина и треонина), сформированных с ацильными компонентами.

В качестве «активных фракций» IL-18BP или вирусного IL-18BP, мутеинов или рекомбинантных белков в данном изобретении рассматривают любой фрагмент или предшественники полипептидной цепи белковой молекулы одних или вместе с ассоциированными молекулами или связанными с ними остатками, например остатками сахара или фосфата, или агрегатами белковой молекулы, или одними остатками сахара при условии, что названная фракция, по существу, сохраняет способность связывать IL-18.

Термин «преобразованные через циклизацию производные», используемый в описании, относится к линейной молекуле, концы которой соединяют вместе или непосредственно, или через линкер, чтобы образовать кольцевую молекулу, а затем кольцевую молекулу раскрывают в другом участке, чтобы образовать новую линейную молекулу с концами, отличающимися от концов исходной молекулы. Преобразование через циклизацию включает те молекулы, структура которых эквивалентна молекуле, которую циклизуют, а затем открывают. Так, преобразованная циклизацией молекула синтезируется de novo как линейная молекула и никогда не проходит через стадию образования кольца и стадию раскрытия. Получение преобразованных через циклизацию производных описывают в международной заявке WO 95/27732.

Различные рекомбинантные клетки, такие как прокариотические клетки, например *E.coli*, или эукариотические клетки, такие как дрожжи или клетки насекомых, продуцируют IL-18BP или вирусные IL-18BP, способы конструирования подходящих векторов, несущих ДНК, которые кодируют IL-18BP, и приемлемы для трансформирования (например, *E.coli*, клетки млекопитающих и клетки дрожжей) или инфицирования клеток насекомых для того, чтобы продуцировать рекомбинантные IL-18BP или вирусный IL-18BP, хорошо известны в данной области. См. например, Ausubel et al., eds. "Current Protocols in Molecular Biology" Current Protocols, 1993; и Sambrook et al., eds. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2nd ed., Cold Spring Harbor Press, 1989.

Для экспрессии IL-18BP белков или вирусных IL-18BP, ДНК, кодирующие IL-18BP или вирусный IL-18BP, их фрагменты, мутеины или рекомбинантные белки, и оперативно присоединенные регуляторные факторы транскрипции и трансляции, включают в векторы, которые способны интегрировать требуемые генные последовательности в хромосомы клетки-хозяина. Чтобы выбрать клетки, которые стабильно интегрируют введенную в их хромосомы ДНК, используют один или более маркеров, предусматривающие отбор клеток-хозяев, которые содержат экспрессирующий вектор. Маркер обеспечивает прототрофию ауксотрофному хозяину, биоцидную резистентность, например к антибиотикам, или резистентность к тяжелым металлам, таким как медь и подобные. Селектируемый ген-маркер или непосредственно связывают с ДНК последовательности гена, чтобы экспрессировать, или вводят в ту же клетку посредством котрансфекции. Дополнительные элементы также необходимы для оптимального синтеза мРНК одноцепочечного связывающего белка.

Эти элементы включают факторы сплайсинга, а также промоторы транскрипции, энхансеры и сигналы терминации.

Названную молекулу ДНК, чтобы ввести в клетки выбора, предпочтительно включают в плазмидный или вирусный вектор, способный к автономной репликации в реципиенте-хозяине. Предпочтительные прокариотические плазмиды являются производными pBR322. Предпочтительные эукариотические векторы включают в себя BPV (вирус папилломы крупного рогатого скота). Вирус осповакцины, SV40, 2-микронный кольцевой вирус и т.д. и их производные. Такие плазмиды и векторы хорошо известны в данной области (2-5, 22). Если вектор или последовательность ДНК, содержащую конструкцию, получают для экспрессии, экспрессирующий вектор вводят в соответствующую клетку-хозяина с помощью любого из множества приемлемых способов, таких как трансформация, трансфекция, липофекция, конъюгирование, протопластное слияние, электропорация, осаждение фосфатом кальция, прямая микроинъекция и т.д.

Используемые в этом изобретении клетки-хозяева являются или прокариотическими, или эукариотическими. Предпочтительные прокариотические хозяева включают в себя бактерии, такие как *E.coli*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia* и т.д. Наиболее предпочтительные прокариотические хозяева представляют собой *E.coli*. Особенно интересные бактериальные хозяева включают штамм 294 *E.coli* K12 (ATCC 31446), *E.coli* X1776 (ATCC 3157), *E.coli* W3110 F⁻, λ⁻, фототрофные (ATCC 27325). При таких условиях белок не гликозилируется. Прокариотический хозяин должен быть совместимым с репликоном и кон-

трольными последовательностями в экспрессирующей плазмиде.

Однако поскольку природные IL-18BP являются гликозилированными белками, эукариотические хозяева являются предпочтительными по сравнению с прокариотическими. Предпочтительные эукариотические хозяева представляют собой клетки млекопитающих, например человека, обезьяны, мыши, и клетки яичников китайского хомяка (СНО), так как они обеспечивают пост-трансляционные модификации белковым молекулам, включающие правильную укладку, правильное образование дисульфидных связей, а также гликозилирование в правильных сайтах. Клетки дрожжей и клетки насекомых также выполняют пост-трансляционные модификации пептидов, включая высокоманнозное гликозилирование.

Существует ряд технологий рекомбинантных ДНК, которые утилизируют последовательности сильных промоторов и высокое число копий плазмид, которые используют для продукции требуемых белков в клетках дрожжей и клетках насекомых. Клетки дрожжей и насекомых распознают лидерные последовательности на клонированных генных продуктах млекопитающих и выбирают зрелый IL-18BP. После введения вектора, клетки-хозяева выращивают на селективной среде, которую выбирают для выращивания содержащих вектор клеток. Экспрессия клонированной генной последовательности(ей) приводит к продукции IL-18BP, вирусного IL-18BP, рекомбинантных белков или их мутеинов или фрагментов. Указанные способы клонирования, выделения клона, идентификации, характеристики и секвенирования описывают более подробно в дальнейшем в примерах.

Экспрессированные белки затем выделяют и очищают с помощью любых общепринятых методик, включая экстракцию, осаждение, хроматографию, электрофорез или подобное, или с помощью аффинной хроматографии, используя, например анти-IL-18BP моноклональные антитела, иммобилизованные на гелевом матриксе, помещенном в колонку. Неочищенные препараты, содержащие названный рекомбинантный IL-18BP, пропускают через колонку, где IL-18BP связывается на колонке специфическими антителами, тогда как примеси проходят. После промывания, белок элюируют с геля при условиях, обычно применяемых для этих целей, т.е. при высоком или низком pH, например pH 11 или pH 2.

Кроме того, изобретение относится к векторам, которые полезны для экспрессии IL-18BP или вирусного IL-18BP, или их производных у млекопитающих, а точнее у людей. Векторы для кратковременной и долговременной экспрессии генов у млекопитающих хорошо известны по литературе. Исследования показывают, что доставка гена, например, к скелетной мышце, глад-

кой мышце сосудов и печени приводит в результате к системным уровням терапевтических белков. Скелетная мышца является удобной мишенью из-за ее большой массы, кровоснабжения и доступности. Однако успешно используют и другие мишени и, в частности, костно-мозговые предшественники иммунных клеток. В настоящее время доступные векторы для экспрессии белков, например в мышце, включают плазмидную ДНК, липосомы, конъюгаты белок-ДНК и векторы, на основе аденовируса, аденоассоциированного вируса и вируса герпеса. Из них векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV) оказываются наиболее эффективными в отношении продолжительности и уровня экспрессии гена и в отношении безопасности (Kessel, P.D. 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 14082-14087).

Способы конструирования вектора на основе AAV подробно описывают (Snyder et al., 1996, Current Protocols in Human Genetics, Chapters 12.1.1-12.1.17, John Wiley & Sons) и цитируют в этом патенте. Кратко, плазмиду psub201, содержащую геном AAV дикого типа разрезают ферментом рестрикции Xba I и сшивают с конструкцией, состоящей из эффективного эукариотического промотора, например цитомегаловирусного промотора, Kozak согласованной последовательности, последовательности ДНК, кодирующей IL-18BP или вирусный IL-18BP, или их мутеины, или рекомбинантные белки, или их фрагменты, соответствующей 3' не транслируемой области и сигнала полиаденилирования, например сигнала полиаденилирования вируса обезьяны 40. Полученную рекомбинантную плазмиду котрансфицируют с хелпер AAV-плазмидой, например rAAV/Ad, в клетки млекопитающих, например T293 клетки. Затем культуры инфицируют аденовирусом в качестве хелпер-вируса, а культуральные супернатанты собирают через 48-60 ч. Супер-натанты фракционируют осаждением сульфатом аммония, очищают в градиенте плотности CsCl, диализуют, а затем нагревают при 56°C, чтобы уничтожить любой аденовирус, в то время как полученный рекомбинантный AAV, способный экспрессировать IL-18BP или вирусный IL-18BP, или их мутеины, или рекомбинантные белки, остается стабильным на этой стадии.

До сих пор не установлена физиологическая роль растворимых рецепторов цитокинов. Растворимые рецепторы связывают свои специфические лиганда и в большинстве случаев ингибируют их биологическую активность, как показано на системе TNF (фактор некроза опухоли) (11, 12). В очень немногих случаях, например IL-6, растворимый рецептор увеличивает биологическую активность. Показано, что рекомбинантный растворимый рецептор TNF, также известный как TBP (TNF связывающий белок) предотвращает септический шок на моделях животных, тогда как обнаружено, что рас-

творимые формы рецептора IL-1 оказывают полное ингибирование развития *in vivo* аллогенной реактивности у мышей-реципиентов аллотрансплантата.

Аналогично обнаружено, что IL-18BP и вирусный IL-18BP данного изобретения используют в качестве модуляторов активности IL-18, например, при диабете типа I, сепсисе, аутоиммунных заболеваниях, при отторжении трансплантата, ревматоидном артрите, воспалительном заболевании кишечника, сепсисе, хроническом гепатите, псориазе, хроническом гепатите и остром гепатите. Таким образом, их можно применять, например, при любом заболевании, при котором эндогенная продукция или экзогенное введение IL-18 вызывают заболевание или ухудшение состояния пациента.

Кроме того, данное изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим фармацевтически приемлемый носитель и IL-18BP или вирусный IL-18BP изобретения, или их активные мутеины, рекомбинантные белки и их соли, функциональные производные или их активные фракции.

Далее данное изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим фармацевтически приемлемый носитель и, например, вирусный вектор, такой как любой один из названных вирусных векторов на основе AAV, или другой вектор, экспрессирующие IL-18BP или вирусный IL-18BP, или их мутеины, фрагменты или их рекомбинантные белки и приемлемые для введения людям и другим млекопитающим с целью достижения экспрессии *in vivo* IL-18BP или вирусного IL-18BP, или их мутеинов, или фрагментов, или рекомбинантных белков изобретения, т.е. для применения в генной терапии.

Фармацевтические композиции изобретения готовят для введения смешиванием IL-18BP или вирусного IL-18BP, или их производных, или векторов, экспрессирующих их, с физиологически приемлемыми носителями и/или стабилизаторами, и/или наполнителями, и готовят в дозированной форме, например, лиофилизацией в дозированных ампулах. Способ введения представляет собой любой из принятых способов введения для подобных агентов и зависит от состояния, которое лечат, например, внутривенно, внутримышечно, подкожно, посредством локальной инъекции или местной аппликации, или непрерывно посредством вливаний и т.д. Количество активного соединения, которое вводят, зависит от способа введения, заболевания, которое лечат, и состояния пациента. Для локальной инъекции, например, требуется более низкое количество белка на вес тела, чем при внутривенном вливании.

Соответственно, IL-18BP или вирусные IL-18BP, или векторы, экспрессирующие их *in vivo*, показаны для лечения аутоиммунных заболеваний, диабета I типа, ревматоидного арт-

рита, отторжения трансплантата, воспалительного заболевания кишечника, сепсиса, рассеянного склероза, ишемической болезни сердца, включая острый сердечный приступ, ишемического поражения мозга, хронического гепатита, псориаза, хронического и острого панкреатита и подобных заболеваний, при которых имеется aberrантная экспрессия IL-18, ведущая к избытку IL-18, или в случаях осложнений, обусловленных экзогенно введенным IL-18.

Изобретение также включает антитела против IL-18BP или вирусного IL-18BP, а также против их мутеинов, рекомбинантных белков, солей, функциональных производных и активных фракций.

Термин «антитело» означает поликлональное антитело, моноклональное антитело (МАТ), химерных антител, антиидиотипическое (анти-Id) антитело к антителам, которые метят в растворимой или связанной форме, и гуманизованные антитела, а также их фрагменты, обеспеченные с помощью любых известных методов, таких как, но не ограниченных ими, ферментативное расщепление, пептидный синтез или рекомбинантные технологии.

Поликлональные антитела представляют собой гетерогенные популяции молекул антител, полученных из сыворотки животных, иммунизированных антигеном. Моноклональные антитела содержат, по существу, гомогенную популяцию антител, специфических к антигенам, к которым популяция содержит в основном одинаковые эпитопсвязывающие участки. МАТ получают по способам, известным специалистам в данной области. См., например, Kohler and Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975); Патент США № 4376110; Ausubel et al., eds., supra, Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); и Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), содержание которых приводят в полном объеме посредством цитирования. Такие антитела могут принадлежать к любому классу иммуноглобулинов, включая IgG, IgM, IgE, IgA, GILD и любым их подклассам. Гибридом, продуцирующую МАТ данного изобретения, культивируют *in vitro*, *in situ* или *in vivo*. Продукция высоких титров МАТ *in vivo* или *in situ* делает это сейчас предпочтительным способом получения.

Химерные антитела представляют собой молекулы, различные части которых получают от различных видов животных, такие как молекулы, имеющие переменную область, полученную от МАТ мыши, и константную область иммуноглобулина человека. Химерные антитела используют главным образом для восстановления иммуногенности при применении и для увеличения выхода при продукции, например, когда МАТ мыши имеют более высокий выход из гибридом, но более высокая иммуногенность

у людей, так что применяют химерные МАТ человек-мышь. Химерные антитела и способы их получения известны в данной области. (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., заявка на европейский патент 125023 (опубликована 14 ноября, 1984); Neuberger et al., *Nature* 314: 268-270 (1985); Taniguchi et al., заявка на европейский патент 171496 (опубликована 19 февраля, 1985); Morrison et al., заявка на европейский патент 173494 (опубликована 5 марта, 1986); Neuberger et al., PCT международная заявка WO 8601533, (опубликована 13 марта, 1986); Kudo et al., заявка на европейский патент 184187 (опубликована 11 июня, 1986); Morrison et al., заявка на европейский патент 173494 (опубликована 5 марта, 1986); Sahagan et al., *J. Immunol.* 137:1066-1074 (1986); Robinson et al., международная заявка WO 9702671 (опубликована 7 мая 1987); Lie 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); и Harlow & Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, supra. Эти ссылки вводят в описание в полном объеме посредством цитирования.

Антиидиотипическое (анти-Id) антитело является антителом, которое распознает уникальные детерминанты, обычно ассоциированные с антигенсвязывающим сайтом антитела. Id-антитело получают иммунизацией животного того же вида и генетического типа (например, линия мышей) в качестве источника МАТ с МАТ, к которому анти-Id получен. Иммунизированное животное распознает и отвечает на идиотипические детерминанты иммунизирующего антитела посредством продуцирования антител к этим идиотипическим детерминантам (анти-Id-антитело). См., например, патент США № 4699880, который приводят в описании посредством цитирования.

Анти-Id-антитело также используют в качестве «иммуногена», чтобы вызвать иммунный ответ у еще другого животного, продуцирующего так называемое анти-анти-Id-антитело. Анти-анти-Id является идентичным по эпитопу исходному МАТ, которое индуцирует анти-Id. Таким образом, посредством использования антител к идиотипическим детерминантам МАТ возможно идентифицировать другие клоны, экспрессирующие антитела идентичной специфичности.

Соответственно, МАТ, полученные против IL-18BP и родственных белков данного изобретения, используют, чтобы индуцировать анти-М-антитела у соответствующих животных, таких как BALB/c мыши. Клетки селезенки от таких иммунизированных мышей применяют для получения анти-Id гибридом, секретирующих анти-Id МАТ. К тому же, анти-Id МАТ свя-

зывают с носителем таким гемоцианин лимфы улитки (KLH) и применяют для иммунизации дополнительных BALB/c мышей. Сыворотка от этих мышей содержит анти-анти-Id антитела, которые имеют связывающие свойства исходного МАТ специфического относительно эпитопа IL-18BP или эпитопов вирусного IL-18BP.

Анти-Id МАТ, таким образом, имеют собственные идиотипические эпитопы или «идиотопы», структурно подобные оцениваемому эпитопу, такому как IL-18BP или вирусный IL-18BP.

Термин «гуманизированное антитело» означает включение, например антител, которые получают манипулированием с антителами мыши с помощью способов генетической инженерии с тем, чтобы они оказались более совместимыми с организмом человека. Такие гуманизированные антитела характеризуются сниженной иммуногенностью и улучшенной фармакокинетикой у людей. Их получают с помощью технологий, известных в данной области, таких как описывают, например для гуманизированных анти-TNF антител в *Molecular Immunology*, Vol. 30, N 16, 1443-1453, 1993.

Термин «антитело» также подразумевает включение обеих интактных молекул, а также их фрагментов, таких как, например, Fab и F(ab')₂, которые связывают антиген. Фрагменты Fab и F(ab')₂, без фрагмента Fc интактного антитела, более быстро удаляются из циркуляции и характеризуются меньшим неспецифическим тканевым связыванием, чем интактное антитело (Wahl et al., *J. Nucl. Med.* 24:316-325 (1983)). Следует оценить, что Fab и F(ab')₂ и другие фрагменты антител, полезные в данном изобретении, используют для определения и количественной оценки IL-18BP или вирусного IL-18BP, согласно способам, представленным в описании для интактных молекул антител. Такие фрагменты обычно получают посредством протеолитического расщепления, используя ферменты, такие как папаин (для получения фрагментов Fab) или пепсин (для получения фрагментов F(ab')₂).

Как отмечено, антитело является «способным связывать» молекулу, если оно способно специфически взаимодействовать с молекулой, чтобы вследствие этого связать молекулу с антителом. Термин «эпитоп» означает, что часть любой молекулы способна быть связанной антителом, которая также распознается таким антителом.

Эпитопы или «антигенные детерминанты» обычно состоят из химически активных поверхностных группировок молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахаров, и имеют особые характеристики трехмерной структуры, а также определенные характеристики заряда.

«Антиген» представляет собой молекулу или часть молекулы, способную быть связанной антителом, которое дополнительно индуцирует

животное к продукции антитела, способного связывать эпитоп такого антигена. Антиген может иметь один или больше эпитопов. Указанная специфическая реакция предназначается, чтобы указать, что антиген взаимодействует высоко избирательным способом с ему соответствующим антителом и не взаимодействует с множеством других антител, которые вызываются другими антигенами.

Антитела, включая фрагменты антител, полезные в данном изобретении, используют для количественного и качественного определения IL-18BP или вирусного IL-18BP или родственных белков в образце или для определения присутствия в клетках, которые экспрессируют такие белки данного изобретения. Это осуществляют иммунофлуоресцентными методами, применяющими флуоресцентно меченные антитела (см. ниже), в сочетании с световой микроскопией, проточной цитометрией и флуориметрическим определением.

Антитела (или их фрагменты), полезные в данном изобретении, применяют гистологически для иммунофлуоресцентной и иммуноэлектронной микроскопии, для определения *in situ* IL-18BP или вирусного IL-18BP или родственных белков данного изобретения. Определение *in situ* включает взятие гистологического образца у пациента и обеспечение такого образца меченым антителом данного изобретения. Предпочтительно антителом обеспечивают нанесением или присоединением меченого антитела (или фрагмента) к биологическому образцу. Применение такого способа сделало возможным определение не только присутствия IL-18BP или вирусного IL-18BP, или родственных белков, но также определение его распределения в исследуемой ткани. Применяя способ данного изобретения, каждый из специалистов в данной области быстро заметит, что любой из большого разнообразия гистологических методов (таких как процедуры окрашивания) можно модифицировать для проведения подобного определения *in situ*.

Такой анализ для IL-18BP или вирусного IL-18BP, или родственных белков данного изобретения обычно включает в себя инкубацию биологического образца, такого как биологическая жидкость, экстракт ткани, свежеполученные клетки, такие как лимфоциты или лейкоциты, или клетки, которые инкубируют в культуре ткани, в присутствии эффективно меченого антитела, способного идентифицировать IL-18BP или родственные белки, и определение антитела посредством любой из ряда технологий, хорошо известных в данной области.

Биологический образец обрабатывают твердофазной подложкой или носителем, таким как нитроцеллюлоза, или твердой подложкой, или носителем, которые иммобилизуют клетки, клеточные частицы или растворимые белки. Подложку или носитель затем промывают соот-

ветствующим буфером с последующей обработкой эффективно меченым антителом согласно данному изобретению. Твердофазную подложку или носитель затем промывают буфером второй раз, чтобы удалить несвязанные антитела. Количество связанной метки на твердой подложке или носителе определяют общепринятыми методами.

Термины «твердофазная подложка», «твердофазный носитель», «твердая подложка», «твердый носитель», «подложка» или «носитель» подразумевают любую подложку или носитель, способные связывать антиген или антитело. Хорошо известные подложки или носители включают стекло, полистирол, полипропилен, полиэтилен, декстран, нейлон, амилазы, природные и модифицированные целлюлозы, полиакриламиды, габро и магнетид. Для целей данного изобретения носитель может быть растворимым до некоторой степени или нерастворимым. Материал подложки имеет любую возможную структурную конфигурацию такой длины, что сопряженная молекула способна связывать антиген или антитело. Так, конфигурация подложки или носителя является сферической как шарик или цилиндрической как внутренняя поверхность опытной пробирки, или как внешняя поверхность стержня. Альтернативно, поверхность плоская, как лист, тест-полоска и т.д. Предпочтительные подложки и носители включают гранулы полистирола. Специалистам в данной области известны многие другие носители для связывания антитела или антигена, или они смогут установить то же самое посредством обычного экспериментирования.

Связывающую активность данной партии антител согласно данному изобретению определяют в соответствии с хорошо известными способами. Специалисты в данной области устанавливают эффективные и оптимальные условия исследования для каждого определения посредством обычного экспериментирования.

Другие стадии, такие как промывание, перемешивание, встряхивание, фильтрование и подобное, добавляют в исследование, когда необходимо в определенной ситуации.

Одним из способов, по которому согласно данному изобретению антитело эффективно метят, является связывание антитела с ферментом и применение в иммуоферментном анализе (EIA). Этот фермент, в свою очередь, при экспозиции с соответствующим субстратом, взаимодействует с субстратом с образованием химического компонента, который определяют, например, с помощью спектрофотометрического, флуориметрического или визуального способов. Ферменты, которые используют для эффективного мечения антител, включают, но не ограничиваются, малатдегидрогеназу, стафилококковую нуклеазу, дельта-5-стероидизомеразу, алкогольдегидрогеназу, альфа-

глицерофосфатдегидрогеназу, триозофосфатизомеразу, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, аспарагиназу, пиранозооксидазу, бета-галактозидазу, рибонуклеазу, уреазу, каталазу, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, глюкоамилазу и ацетилхолинэстеразу. Определение осуществляют колориметрическими методами, в которых употребляют хромогенный субстрат для фермента. Определение также проводят посредством визуального сравнения степени энзиматической реакции субстрата по сравнению с аналогично приготовленными стандартами.

Определение выполняют, используя любой из целого ряда других иммунологических анализов. Например, радиоактивным мечением антител или фрагментов антител, определяют IL-18BP или вирусный IL-18BP посредством применения радиоиммунного анализа (RIA). Хорошее описание RIA имеется в *Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology*, by Work, T.S. et al., North Holland Publishing Company, NY (1978) с особой ссылкой на главу, озаглавленную "An Introduction to Radioimmuno Assay and Related Techniques" by Chard, T., введенную в описание цитированием. Радиоактивный изотоп определяют с помощью таких средств, как применение гамма-счетчика или сцинтилляционного счетчика, или посредством автордиографии.

Согласно данному изобретению антитело метят флуоресцентным соединением. Когда флуоресцентно меченное антитело подвергают действию света, надлежащей длины волны, его присутствие определяют по флуоресценции. Обычно наиболее используемыми соединениями для флуоресцентного мечения являются флуоресцеин изотиоцианат, родамин, фикоэритрин, фикоцианин, аллофикоцианин, о-фталевый альдегид и флуорескамин.

Антитела также эффективно метят, используя металлы, испускающие флуоресценцию, такие как ^{152}Eu или другие из серии лантанидов. Эти металлы присоединяют к антителу, используя такие металл-хелатирующие группы как диэтилентриаминпентауксусная кислота (ЕТРА).

Антитело эффективно метят связыванием его с биотином. Биотинилированное антитело затем определяют с помощью авидина или стрептавидина, присоединенных к флуоресцентному соединению или ферменту, такому как пероксидаза, или к радиоактивному изотопу и подобным.

Также антитело эффективно метят, присоединяя его к хемилюминисцентному соединению. Присутствие хемилюминисцентно-меченого антитела затем определяют, детектируя люминисценцию, которая возникает в ходе химической реакции. Примерами особенно полезных люминисцентно-меченных соединений являются люминол, изолуминол, тероматический

эфир акридина, имидазол, соль акридина и эфир щавелевой кислоты.

Подобным образом биоломинисцентное соединение используют для мечения антитела данного изобретения. Биоломинисценция представляет собой вид хемилуминисценции, обнаруженной в биологических системах, в которых каталитический белок увеличивает эффективность хемилуминисцентной реакции. Присутствие биоломинисцентного белка определяют по наличию люминисценции. Для мечения важными биоломинисцентными соединениями являются люциферин, люцифераза и экворин.

Молекулу антитела данного изобретения адаптируют для применения в количественном иммуноанализе, также известном как «два-сайта» или «сэндвич-анализ». В типичном количественном иммуноанализе большое количество немеченных антител (или фрагмента антитела) связывают с твердой подложкой или носителем и добавляют эффективно меченные растворимые антитела, чтобы сделать возможным выявление и/или количественный анализ тройного комплекса, образованного между твердофазным антителом, антигеном и меченым антителом.

Типичный и предпочтительный количественный иммуноанализ включает «прямой» анализ, в котором антитело, связанное с твердой фазой, сначала контактирует с тестируемым образцом, чтобы извлечь антиген из образца посредством образования двойного комплекса твердофазное антитело-антиген. После соответствующего периода инкубации твердую подложку или носитель промывают для удаления остатков жидкого образца, включая непрореагировавший антиген, если это вообще требуется, а затем осуществляют контакт с раствором, содержащим неизвестное количество меченых антител, которое функционирует как комплекс твердофазное антитело-антиген. После соответствующего периода инкубации твердую подложку или носитель промывают для удаления остатков жидкого образца, включая непрореагировавший антиген, если это вообще требуется, а затем осуществляют контакт с раствором, содержащим неизвестное количество меченых антител (которое функционирует как «репортерная группа»). После второго периода инкубации, в течение которого меченое антитело образует комплекс с антигеном, связанным с твердой подложкой или носителем посредством немеченого антитела, твердую подложку или носитель промывают второй раз для удаления непрореагировавших меченых антител.

В другом типе иммуноанализа - «сэндвич-анализе», который успешно проводят с антигеном данного изобретения, используют так называемые «одновременный» и «обратный» анализ. «Одновременный» анализ включает в себя одну стадию инкубации, когда антитело, связанное с твердой подложкой или носителем, и меченое антитело - оба добавляют к тестируемому об-

разцу одновременно. После завершения инкубации, твердую подложку и носитель промывают для удаления остатка жидкого образца и меченого антитела, не включенного в комплекс. Присутствие меченого антитела, ассоциированного с твердой подложкой или носителем, определяют с помощью общепринятого «прямого» сэндвич-анализа.

В «обратном» анализе используют ступенчатое добавление сначала раствора меченого антитела к жидкому образцу, за которым следует добавление немеченого антитела, связанного с твердой подложкой или носителем, после соответствующего периода инкубации. После второй инкубации твердую фазу промывают общепринятым способом для удаления остатка исследуемого образца раствора непрореагировавшего меченого антитела. Определение меченого антитела, связанного с твердой подложкой или носителем, осуществляют как в случае «одновременного» и «прямого» анализов.

Данное изобретение также предусматривает молекулы ДНК, кодирующие любые из белков данного изобретения, которые описаны выше, реплицируемые носители экспрессии, содержащие любые такие молекулы ДНК, клетки-хозяева, трансформированные любым таким экспрессирующим носителем, включая прокариотические и эукариотические клетки-хозяева, предпочтительно клетки СНО. Изобретение также включает в себя способ для продукции экспрессирующих векторов, кодирующих любой из белков данного изобретения, с целью их экспрессии у людей и других млекопитающих.

В изобретение также включают способ получения любого из белков данного изобретения посредством культивирования трансформированной клетки, согласно данному изобретению, и возвращение белка, кодируемого молекулой ДНК, и экспрессирующего носителя в такую трансформированную клетку-хозяина.

Кроме использования IL-18BP или вирусного IL-18BP для модулирования активности IL-18, их также применяют для очистки самого IL-18. С этой целью IL-18BP или вирусный IL-18BP связывают с аффинной колонкой и пропускают неочищенный IL-18. Затем IL-18 извлекают с колонки посредством, например элюции при низком pH.

Далее изобретение иллюстрируют следующими неограничивающими примерами.

Пример 1. Выделение белка, связывающего IL-18.

IL-18 E.coli (2,5 мг, Peprotech, NJ) присоединяют к Affigel-10 (0,5 мл, BioRad), в соответствии с инструкциями производителя, и упаковывают в колонку. Неочищенный белок мочи (сконцентрированной в 1000 раз, 500 мл) наносят на колонку при низкой скорости 0,25 мл/мин. Колонку промывают 250 мл 0,5 М NaCl в фосфатном буферном растворе (PBS). Связанные белки затем элюируют 25 мМ лимонной

на колонке Superose 12 (1 x 30 см, Pharmacia, Sweden). Колонку предварительно уравнивают и элюируют фосфатным буферным раствором и азидом натрия (0,02%) при скорости течения 0,5 мл/мин и собирают фракции по 1 мл. Белок, связывающий IL-18, элюируется во фракциях 20-25 как белок ~40000 Да, что устанавливают методом SDS-PAGE и окрашиванием серебром. Образец, содержащий белок ~40000 Да (фракция 23, 50 мкл, 50 нг белка) взаимодействует с N-гликозидазой F (PNGase F, BioRad) согласно инструкции. Кратко, аликвоту денатурируют кипячением в присутствии 5% SDS в течение 10 мин, 10 x 07 буфера (2,5 мкл), 10% NP-40 (2,5 мкл) и PNGase F (1 мкл), 1 ч при 37°C. Образец анализируют методом SDS-PAGE (10% акриламид) при невозможности восстановления условий и сравнивают с негидролизированным IL-18BP из такой же фракции с Superose 12. Показано, что зона 40 кДа IL-18BP исчезает из фракции, обработанной PNGase. Выявляют новые зоны, соответствующие 30 кДа (даже выше зоны PNGase) и 20 кДа. Исчезновение зоны 40 кДа указывает, что эта зона является N-гликозилированным белком.

Пример 5. Блокирование биологической активности IL-18 с помощью IL-18BP.

Способность IL-18BP, выделенного из мочи, блокировать активность IL-18 определяют посредством измерения индуцированной IL-18 продукции IFN- γ в мононуклеарных клетках. IL-18 индуцирует IFN- γ , если добавляют вместе или с низкими концентрациями LPS, IL-12, IL-2, или с другими стимуляторами. Активность IL-18 тестируют в спленоцитах мыши, в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) человека и в линии KG-1 клеток человека. Клетки селезенки получают от здоровых мышей, промывают, суспендируют в среде RPMI 1640, дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой при 5×10^6 клеток/мл, 1,0 мл культуры стимулируют LPS (или 0,5 или 1 мкг/мл) вместе с рекомбинантным IL-18 человека или мыши (или 0,5 или 5 нг/мл). IL-18-связывающий белок человека (0,5 или 50 нг/мл) добавляют к рекомбинантному IL-18 перед добавлением к клеткам селезенки. После культивирования в течение 24 ч, клетки селезенки подвергают трем циклам замораживания (-70°C) и оттаивания (комнатная температура), клеточный дебрис удаляют центрифугированием, а супернатант анализируют в отношении IFN- γ , используя ELISA-наборы для IFN- γ мыши (Endogen). Как показывают на фиг. 3А, IL-18BP блокирует активность huIL-18 (человека) в спленоцитах мыши дозозависимым способом. В отличие от этого используемый в качестве контроля растворимый рецептор интерферона- α/β не оказывает никакого действия. Аналогично, IL-18BP человека ингибирует активность рекомбинантного IL-18 мыши, позволяя предположить, что IL-18BP человека распо-

знает IL-18 мыши (фиг. 3В). В спленоцитах мыши высокие концентрации LPS индуцируют эндогенный IL-18, приводя к продукции IFN- γ . Действительно, индукция INF- γ посредством LPS также ингибируется IL-18BP мочи (фиг. 3С). Конканавалин А (Con A) активирует Т-клетки, чтобы продуцировать IFN- γ в отсутствие IL-18 (13). Действительно, индукция IFN- γ конканавалином Ф не ингибируется посредством IL-18BP даже при высоких концентрациях (фиг. 3Д). Эти данные демонстрируют, что IL-18BP является специфически ингибитором биоактивности IL-18 скорее, чем неспецифическим ингибитором продукции IFN- γ . IL-18BP также ингибирует активность IL-18 человека в KG-1 клетках человека, индуцированную сочетанием IL-18 и TNF- α (фиг. 3Е).

Вышепредставленные данные демонстрируют, что IL-18BP мочи ингибирует активность IL-18 человека, а также мыши, что оценивают посредством коиндукции IFN- γ в мононуклеарных клетках человека и мыши. Концентрация IL-18BP, которая снижает активность IL-18 на >90%, сравнима с концентрацией самого IL-18, позволяя предположить высокое сродство взаимодействия между этими двумя белками.

Пример 6. Выделение клонов кДНК, кодирующих IL-18BP.

Тотальная РНК из юркатных Т-клеток (CRL 8163, American Type Culture Collection) обратнo-транскрибирована с Superscript Rnase H обратнoй транскриптазой (Gibco-BRL) и произвольными праймерами (Promega, Madison WI). Затем полученные фрагменты кДНК амплифицируют посредством PCR, используя Tag-ДНК полимеразу (Sigma) и праймеры, соответствующие нуклеотидам 24-44 (смысловой) и 500-481 (обратный) клона THC12801 TIGR. Амплификацию проводят в 30 циклах отжига (55°C, 2 мин) и элонгации (70°C, 1 мин). Полученные продукты PCR разделяют методом электрофореза в агарозном геле (1%), элюируют и клонируют с pGEM-Teasy TA вектором клонирования (Promega). ДНК из индивидуальных клонов секвенируют с T7 и SP6 праймерами.

Полученный фрагмент 477 пар оснований метят ^{32}P посредством рендом-праймирования. Этот зонд используют для скрининга различных кДНК человека и геномных библиотек. Двойные нитроцеллюлозные фильтры подвергают гибридизации с зондом при 60°C в буфере, содержащем 6 x SSC, 10x раствор Денхардта, 0,1% SDS и 100 мкг/мл ДНК спермы лосося. Фильтры промывают и выдерживают в течение ночи при -80°C на пленке Kodak XAR. Двойные позитивные клоны очищают из колоний. Плазмиды вырезаются из λ -pCEU9 клонов и плазмиды самолигируются. кДНК из других библиотек выделяют согласно инструкциям авторов. Автоматизированный анализ последовательности ДНК из выделенных клонов проводят на секвенаторах

моделей 373А и 377 (Applied Biosystems), используя смысловой и антисмысловой праймеры. Используют стандартные протоколы для этих процедур копирования (33).

Проведен скрининг следующих библиотек: библиотека кДНК моноцитов человека, сконструированная в λ -pCEU9 векторе клонирования (15), любезно предоставленная Т. Мики библиотека кДНК юркатных лейкозных Т-клеток человека, библиотека кДНК лейкоцитов периферической крови человека, все от Clontech (Palo Alto, CA). Геномная библиотека плаценты человека в лямбда- FIX II векторе получена от Stratagene (La Jolla, CA).

Получены и охарактеризованы все клоны кДНК, соответствующие четырем различным вариантам сплайсинга IL-18BP. Все варианты сплайсинга кодируют предполагаемые растворимые секретируемые белки. Наиболее преобладающий вариант (IL-18BP_a) имеет открытую рамку считывания из 192 кодонов, кодирующую сигнальный пептид из 28 аминокислотных остатков с последующим зрелым предполагаемым IL-18BP_a, первые 40 остатков которого (SEQ ID NO: 10) полностью совместимы с N-концевой белковой последовательностью IL-18BP мочи (SEQ ID NO: 2). Положение остатков цистеина позволяет предположить, что этот полипептид принадлежит к супер-семейству иммуноглобулинов (Ig). Каждый из четырех остатков Gln в зрелом IL-18BP_a является возможным участком N-гликозилирования. Другие три варианта сплайсинга IL-18BP имеются в значительно меньшем количестве.

Другая кДНК IL-18BP_b 1 т.п.н. кодирует зрелый белок из 85 аминокислотных остатков (SEQ ID NO: 4). Третий вариант, IL-18BP_c, представляется 2,3 т.п.н. кДНК, кодирующей зрелый IL-18BP из 169 аминокислотных остатков (SEQ ID NO: 6). Четвертый вариант, IL-18BP_d, кодирует зрелый IL-18BP из 133 аминокислотных остатков (SEQ ID NO: 8). Внутриэкзонный сплайсинг происходит в двух сайтах вдоль про-мРНК. Эти явления и дополнительный 5' экзон в IL-18BP_a приводят к 3 различным 5' UTRs в разных клонах кДНК. Поэтому вполне возможно, что различные варианты IL-18BP образуются в ответ на определенные сигналы регуляции транскрипции.

До сих пор не обнаружено ни одной кДНК, кодирующей рецептор с трансмембранным доменом.

Пример 7. Конструкция экспрессирующего вектора млекопитающих, продукция рекомбинантного IL-18BP и оценка биологических активностей рекомбинантного IL-18BP.

Кодирующую область кДНК IL-18BP_a амплифицируют посредством PCR со смысловым праймером

5' TATATCTAGAGCCACCATGAGACACAACCTGGACACCA
и обратным праймером:

5' ATATCTAGATTAAATGATGATGATGATGATGACCTGCTGCTGGACTGC

Продукты PCR вырезают посредством Xba I и клонируют в сайте Xba I pEF-BOS экспрессирующего вектора (25), чтобы получить pEF-BOS-IL-18BP_a. Конструкции подтверждают секвенированием ДНК.

Серии 6×10^7 COS7 клеток в 1,4 мл ТД-буфера, содержащего плазмидную ДНК pEF-BOS-IL-18BP_a (10 мкг) и ДЕАЕ-декстран (120 мкг), инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре, как описывают (35). Клетки затем промывают ДМЕМ-10% фетальная бычья сыворотка, культивируют в течение 4 ч в ДМЕМ-10, промывают и инкубируют в течение 3-5 дней в бессывороточной среде ДМЕМ. Культуральную среду собирают, концентрируют в 6 раз ультрафильтрацией (10 kD cutoff) и выделяют IL-18BP-His₆ на колонке Talon (Clontech) с имидазолом в качестве элюента согласно инструкции авторов.

Иммунологическую перекрестную реактивность мочевого и COS7-экспрессированного IL-18BP оценивают следующим образом: IL-18BP мочи (5 мкг) метят ¹²⁵I по способу с хлорамином Т. Супер-натанты COS7 клеток (250 мкл) смешивают (1 ч, комнатная температура) с антителами к IL-18BP мочи, разбавляют 1:1000 в забуференном фосфатом растворе (PBS), 0,05% твине 20 и 0,5% бычьим сывороточном альбумине (Wash Buffer). Затем добавляют IL-18BP мочи (10^6 импульсов в минуту) и через 1 ч добавляют белок-G-sepharose (20 мкл). Смесь суспендируют (1,5 ч, 4°C), затем гранулы изолируют и промывают 3x Wash Buffer и раз в PBS. Гранулы элюируют буфером для образца, разделяют методом SDS-PAGE (10% акриламид) при восстанавливающих условиях с последующей автордиографией.

IL-18BP_a движется в виде одной зоны на SDS-PAGE с окрашиванием серебром при восстанавливающих и невосстанавливающих условиях и имеет такую же кажущуюся молекулярную массу, как масса IL-18BP мочи (данные не представлены). При анализе последовательности белка этого препарата выявляют такую же N-концевую последовательность как последовательность IL-18BP мочи, указывая, что последний не деградируется на N-конце.

Иммуноблотинговый анализ IL-18BP с антителами, полученными против IL-18BP мочи, выявляет зону с такой же молекулярной массой как масса белка мочи. Кроме того, используя иммунопреципитацию с последующими SDS-PAGE и автордиографией, показывают, что IL-18BP способен вытеснять ¹²⁵I-IL-18BP мочи из комплекса с антителами. Поэтому, IL-18BP_a структурно соответствует IL-18BP мочи.

Исследуют способность неочищенного и очищенного IL-18BP_a ингибировать биологическую активность IL-18. IL-18BP_a ингибирует дозависимым способом индуцирующую IFN- γ активность IL-18 человека и мыши в спленоци-

тах мыши, РВМС и в линии KG-1 клеток человека (фиг. 9).

Результаты различных биоисследований, а также анализ изменения подвижности (пример 8) показывают, что ингибирование активности IL-18 является свойством присущим клонированному IL-18BP, а не свойством сопутствующих примесей в IL-18BP мочи, таких как коэлюирующий фрагмент дефенсина.

Пример 8. Анализ изменения электрофоретической подвижности.

Изучают влияние мочевого и рекомбинантного IL-18BP на индуцированную IL-18 активность NF-kB в KG-1 клетках человека. KG-1 клетки человека (4×10^6 в 1 мл RPMI) стимулируют или huIL-18 (человека) (10 нг/мл), или huIL-18, предварительно смешанным с IL-18BP (20 мин, комнатная температура). После 20 мин при 37°C, клетки три раза промывают охлажденным льдом PBS и немедленно замораживают в жидком азоте. Клеточные осадки повторно суспендируют в трехкратном упаковочном коллоидном объеме буфера А (20 мМ трис pH 7,6, 0,4 М NaCl, 0,2 мМ EDTA, глицерин (20% по объему), 1,5 мМ MgCl₂, 2 мМ дититрейтол (DDT), 0,4 мМ PMSF, 1 мМ Na₃VO₄ 2 мкг/мл каждого из лейпептина, пепстагина и апротинина). Клеточный дебрис удаляют центрифугированием (15000 x g, 15 мин), аликвоты супернатанта замораживают в жидком азоте и хранят при -80°C. Концентрацию белка определяют по методу Бредфорда (Bio-Rad), используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта. Двухцепочечный олигонуклеотид, соответствующий элементу, связывающему NF-kB (10 пмол, Promega), метят [³²P]dCTP (300 Ки/ммоль) и T4 полинуклеотидкиназой (New England Biolabs). Свободные нуклеотиды удаляют центрифугированием с нанесением препарата на спинколонку. Экстракты (10 мкг белка) клеток, обработанные IL-18 или IL-18+IL-18BP, инкубируют (15 мин, комнатная температура) с меченым зондом (3×10^4 импульсов в минуту) вместе с поли dI.dC (500 нг, Pharmacia) и денатурированной ДНК спермы лосося (100 нг, Sigma) в 20 мкл буфера, содержащего HEPES (pH 7,5, 10 мМ), 60 мМ KCl, 1 мМ MgCl, 2 мМ EDTA, 1 мМ DTT и глицерин (5% по объему). Затем смеси наносят на 5% неденатурирующие полиакриламидные гели. Электрофорез проводят при 185 Вт в 0,5 x TBE (40 мМ трис HCl, 45 мМ борной кислоты и 2,5 мМ EDTA). Гели высушивают под вакуумом и проводят автордиографию всю ночь при -80°C. Обнаружено, что IL-18 индуцирует образование гомодимера p50 NF-kB и гетеродимера p65/p50 NF-kB. Мочевой, а также рекомбинантный IL-18BP ингибирует активацию NF-kB, вызванную IL-18, что устанавливают по анализу изменения электрофоретической подвижности с экстрактами KG-1 клеток, связывающими радиоактивный олигонуклеотид, со-

ответствующий согласованной последовательности NF-kB.

Пример 9. Экспрессия IL-18BP в E.coli, клетках дрожжей и насекомых.

IL-18BP также продуцируется другими рекомбинантными клетками, такими как прокариотические клетки, например E. coli, или другими эукариотическими клетками такими как клетки дрожжей и насекомых. Имеются хорошо известные способы для конструирования соответствующих векторов, несущих ДНК, которые кодируют любой IL-18BP, и пригодны для трансформирования E.coli и клеток дрожжей, или инфицирования клеток насекомых для того, чтобы продуцировать рекомбинантный IL-18BP. Для экспрессии в клетках дрожжей, ДНК, кодирующую IL-18BP (пример 6) вырезают и вставляют в экспрессирующие векторы, подходящие для трансфекции клеток дрожжей. Для экспрессии в клетках насекомых, ДНК, кодирующую IL-18BP, вставляют в бакуловирус, а клетки насекомых инфицируют вышеназванным рекомбинантным бакуловирусом. Для экспрессии в E.coli, ДНК, кодирующую IL-18BP, подвергают сайтноправленному мутагенезу с соответствующими олигонуклеотидами с тем, чтобы ATG кодон инициации вставить именно до первого кодона зрелого IL-18BP. Альтернативно, такую ДНК получают посредством PCR с соответствующими смысловым и антисмысловым праймерами. Полученные ДНК-конструкции затем вводят в прокариотические экспрессирующие векторы, соответственно сконструированные посредством технологий, хорошо известных на данном уровне техники (23).

Пример 10. Конструкция экспрессирующего вектора, ассоциированного с аденовирусом, для экспрессии IL-18BP *in vivo*.

Функциональный ген, кодирующий IL-18BP, конструируют на основе плазмидной pcDNA3 (Invitrogen, San Diego CA). κДНК IL-18BP с Kozak-согласованной последовательностью на 5' конце сшивают в сайте Xba pcDNA3 по способу, который разрушает сайт рестрикции. Новые Xba 1 сайты вставляют посредством сайтноправленного мутагенеза до неомициновой кассеты (основание 2151 исходной последовательности pcDNA3) и после сигнала поаденилирования SV40 (основание 3372 исходной последовательности pcDNA3). Эту конструкцию вырезают посредством XbaI и полученный 4,7 т.п.н. миниген вставляют в XbaI-сайт плазмидной psub201 как описывают (Snyder et al., 1996, Current Protocols in Human Genetics, Chapters 12.1.1-12.1.17, John Wiley & Sons). Полученную рекомбинантную плазмиду котрансфицируют с хелпер AAV плазмидой pAAV/Ad в T293 клетки человека. Культуры затем инфицируют аденовирусом в качестве хелпер-вируса и клетки собирают после 48-60 ч инкубации. Клетки подвергают 3 циклам замораживания-оттаивания, клеточный дебрис удаляют центрифугировани-

ем, а супернатант насыщают сульфатом аммония 33% насыщения. Затем смесь центрифугируют, а гААV осаждают из супернатанта сульфатом аммония при 50% насыщения. Далее вирус очищают посредством CsCl, диализуют и, наконец, нагревают в течение 15 мин при 56°C, чтобы уничтожить любой вирус.

Пример 11. Конструкция рекомбинатных белков слияния IL-18BP.

Получение белков, содержащих IL-18BP, слитых с константной областью тяжелой цепи IgG2, проводят следующим образом: ДНК IL-18BP подвергают сайтнаправленному мутагенезу с соответствующими олигонуклеотидами с тем, чтобы ввести уникальный сайт рестрикции непосредственно перед и после кодирующих последовательностей. Плазмиду, несущую константную область тяжелой цепи IgG2, например pRKC042Fcl (6), подвергают подобному сайтнаправленному мутагенезу, чтобы ввести тот же уникальный сайт рестрикции так близко, как возможно к Asp 216 тяжелой цепи IgG1 по способу, который допускает трансляцию в фазе слитого белка. Фрагмент dsDNA, состоящий из 5' нетранслированных последовательностей и кодирующий IL-18BP, получают посредством расщепления в уникальных сайтах рестрикции или, альтернативно, посредством PCR с соответственно сконструированными праймерами. Аналогично расщепляют мутантный pRKC42Fcl, чтобы образовать большой фрагмент, содержащий плазмиду и последовательности IgG1. Затем два фрагмента лигируют с образованием новой плазмиды, кодирующей полипептидный предшественник, состоящий из IL-18BP и приблизительно 227 С-концевых аминокислот IgG1 (область петли и СН2 и СН3 домены). ДНК, кодирующую рекомбинантные белки, выделяют из плазмиды посредством рестрикции соответствующими ферментами рестрикции, а затем вводят в эффективные прокариотические и эукариотические экспрессирующие векторы.

Пример 12. Получение химически модифицированных IL-18BP.

Для увеличения периода полу-жизни IL-18BP в плазме, получают IL-18BP, которые химически модифицируют полиэтиленгликолем (PEG). Модификацию осуществляют поперечным сшиванием PEG с остатком цистеина молекулы IL-18BP. Конструируют мутантные IL-18BP, которые содержат дополнительный остаток цистеина на аминоконцах, в участках гликозилирования и на карбоксильных концах каждого IL-18BP. Мутагенез осуществляют методом PCR, используя олигонуклеотиды, содержащие требуемую мутацию. Эти мутантные белки экспрессируют обычным способом, хорошо известным в данной области. Проводят regulation этих белков и определяют активность.

Пример 13. Получение поликлональных антител к IL-18BP.

Кроликам первоначально вводят подкожно 5 мкг чистого препарата IL-18BP мочи, эмульгированного в полный адьювант Фрейнда. Через три недели им снова вводят подкожно 5 мкг препарата IL-18BP в неполном адьюванте Фрейнда. Две дополнительные инъекции IL-18BP, растворенного в PBS, проводят с 10-дневными интервалами. У кроликов забирают кровь через 10 дней после последней иммунизации. Рост уровня антител определяют с помощью радиоиммуноанализа. ¹²⁵I-меченый IL-18BP (166000 импульсов в минуту) смешивают с различными разведениями (1:50, 1:500, 1:5000 и 1:50000) сыворотки кролика. Суспензию гранул белок-G-агарозы (2С мкл, Pharmacia) добавляют в общем объеме 200 мкл. Смесь оставляют в течение 1 ч при комнатной температуре, затем гранулы промывают 3 раза и считают связанную радиоактивность. Антисыворотку кролика к лептину человека используют в качестве негативного контроля. Титр IL-18BP-антисыворотки оказывается между 1:500 и 1:5000, в то время как отрицательный контроль меньше чем 1:50.

Пример 14. Получение моноклональных антител к IL-18BP.

Самкам Balb/C мышей (в возрасте 3 месяцев) вводят сначала 2 мкг очищенного IL-18BP в эмульсии полного адьюванта Фрейнда, а через три недели подкожно в неполном адьюванте Фрейнда. Три дополнительные инъекции делают с 10-дневными интервалами подкожно в PBS. Конечные бустер-инъекции производят внутривенно за 4 и 3 дня до слияния мышам, показывающим наивысший титр связывания, что определяют посредством IRIA (см. ниже). Слияние проводят, используя NSO/1 линию клеток меланомы и лимфоциты, полученные как из селезенки, так и из лимфатических узлов животных, в качестве сливающихся клеток. Слитые клетки распределяют в многолуночные планшеты для микрокультуры и гибридомы селекционируют в ДМЕМ, дополненной НАТ и 15% сывороткой лошади. Гибридомы, которые, как обнаружено, продуцируют антитела к IL-18BP, субклонировать по методу лимитирующих разведений и вводят Balb/C мышам, которым введен пристан для образования асцита. Изотипы антител определяют, используя коммерчески доступный EUSA-набор (Amersham, UK).

Скрининг гибридом, продуцирующих анти-IL-18BP моноклональные антитела, проводят следующим образом. Гибридомные супернатанты тестируют относительно присутствия анти-IL-18BP антител с помощью инвертного твердофазного радиоиммуноанализа (IRIA). ELISA-планшеты (Dynatech Laboratories, Alexandria, VA) покрывают Talon-очищенным IL-18BPα-His₆ (10 мкг/мл, 100 мкл/лунку). После инкубации в течение ночи при 4°C, планшеты промывают дважды PBS, содержащим BSA (бычий сывороточный альбумин) (0,5%) и твин-20 (0,05%) и блокируют промывающим раствором

в течение, по крайней мере, 2 ч при 37°C. Добавляют гибридные культуральные супернатанты (100 мкл/лунку) и планшеты инкубируют в течение 4 ч при 37°C. Планшеты промывают 3 раза и добавляют конъюгат пероксидазы хрена с антителами козы к антителам мыши (HRP, Jackson Labs, 1:10000, 100 мкл/лунку) в течение 2 ч при комнатной температуре. Планшеты промывают 4 раза, а окраску проявляют посредством ABTS 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфокислота, Sigma) с H₂O₂ в качестве субстрата. Планшеты считывают с помощью автоматического ELISA-планшет-ридера. Образцы, дающие OD, которое, по крайней мере, в 5 раз выше, чем величина негативного контроля, считают позитивными.

Пример 15. Аффинная хроматография IL-18BP с моноклональными антителами.

Антитела против IL-18BP используют для очистки IL-18BP с помощью аффинной хроматографии. Секретируемую гибридной асцитную жидкость, содержащую моноклональные антитела, очищают осаждением сульфатом аммония при 50% насыщения с последующим экстенсивным диализом против PBS. Приблизительно 10 мг иммуноглобулинов связывают с 1 мл Affigel 10 (Bio Rad USA), как рекомендует производитель.

250 мл белков мочи человека (эквивалентных 250 л неочищенной мочи) наносят на 0,5 мл колонку с анти-IL-18BP-антителами при 4°C при скорости течения 0,25 мл/мин. Колонку промывают PBS до тех пор, пока не перестанет определяться белок в промывной жидкости. IL-18BP элюируют 25 mM буфером лимонной кислоты, pH 2,2, (8x1 колонка, объем фракций) и немедленно нейтрализуют 1 M Na₂CO₃. Дальнейшую очистку этого препарата осуществляют с помощью гель-фильтрации.

Пример 16. ELISA-тест (метод твердофазного иммуоферментного анализа).

Титрационные микропланшеты (Dynatech or Maxisorb, by Nunc) покрывают анти-IL-18BP моноклональными антителами (бессывороточный гибридный супернатант или иммуноглобулины асцитной жидкости) в течение ночи при 4°C. Планшеты промывают PBS, содержащим BSA (0,5%) и твин 20 (0,05%) и блокируют тем же раствором в течение, по крайней мере, 2 ч при 37°C. Тестируемые образцы разбавляют блокирующим раствором и добавляют в лунки (100 мкл/лунку) в течение 4 ч при 37°C. Затем планшеты 3 раза промывают PBS, содержащим твин 20 (0,05%) с последующим добавлением анти-IL-18BP сыворотки кролика (1:1000, 100 мкл/лунку) для дальнейшей инкубации в течение ночи при 4°C. Планшеты промывают 3 раза и добавляют конъюгат пероксидазы хрена с антителами козы к антителам кролика (HRP, Jackson Labs, 1:10000, 100 мкл/лунку) в течение 2 ч при комнатной температуре. Планшеты промывают 4 раза, а окраску проявляют посредством

ABTS 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфокислота, Sigma) с H₂O₂ в качестве субстрата. Планшеты считывают с помощью автоматического аппарата для прочтения планшетов.

Пример 17. Негликозилированный IL-18BP человека биологически активен.

Исследуют способность очищенного рекомбинантного IL-18BPа ингибировать биологическую активность IL-18. IL-18BPа ингибирует дозозависимым способом индуцирующую IFN- γ активность IL-18 человека и мыши в спленocyтaх мыши, PBMC и линии KG-1 клеток человека (фиг. 9).

Очищенный IL-18BPа, имеющий His₆ tag на C-конце (1,5 мкг, 50 мкл) приводят к pH 7,5 и смешивают с N-гликозидазой F (3 мкл, 500000 U/мл PNGase F, New England Biolabs). Смесь инкубируют в течение 24 ч при 37°C при невосстанавливающих условиях. Аликвоты из образца и из негидролизованного IL-18BP-His₆ анализируют посредством SDS-PAGE при невосстанавливающих условиях с последующим иммуноблотингом с антителами к IL-18BP. Обнаруживают, что зона 40 кДа IL-18BP-His₆ исчезает в PNGase-обработанной фракции, и выявляют новую зону 20 кДа. Молекулярная масса продукта и специфичность PNGase F указывают, что IL-18BP-His₆ является полностью дегликозилированным.

PNGase-обработанные фракции, негидролизованный IL-18BP-His₆ и контрольный образец, содержащий PNGase в буфере, отдельно адсорбируют на Talon-гранулах, промывают фосфатным буфером и элюируют имидазолом (100 mM). Элюированные фракции подвергают биоанализу, используя IL-18 человека (20 нг/мл), LPS (2 мкг/мл) и спленocyтa мыши. Результаты представляют в следующей таблице

Образец	IFN- γ , нг/мл
Контроль	7,5
Негидролизованный IL-18BP-His ₆	0
Обработанный PNGase IL-18BP-His ₆	0

Сделан вывод, что дегликозилированный IL-18BP биологически активен как модулятор активности IL-18.

Предшествующее описание отдельных направлений выявляет основную сущность изобретения так, что другие, применяя современные знания, легко модифицируют и/или приспособят для различных применений такие конкретные направления без отступления от основных представлений и поэтому такие приспособления и модификации должны быть и предназначаются для включения в значение и область эквивалентов описанных направлений. Понятно, что фразеология и терминология служат для описания, а не ограничения.

Примеры

Часть 1. Примеры 18-25, относящиеся к использованию ингибиторов IL-18 при поражении печени.

Пример 18. Продукция IL-18BP-His-tag.

Очищенный рекомбинантный IL-18BP человека, содержащий his-метку (r-hIL-18BP-His-tag), продуцировали в клетках CHO. Продукция рекомбинантных белков в эукариотических клетках известно специалистам. Существуют хорошо известные методы, которые используются для конструирования соответствующих векторов, несущих IL-18BP-кодирующую ДНК, и которые являются подходящими для трансфекции эукариотических клеток, осуществляемой в целях продуцирования рекомбинантного IL-18BP. Для экспрессии в клетках, ДНК, кодирующую IL-18BP (см., например, Novick et al., 1999), вырезали и встраивали в экспрессирующие векторы, подходящие для трансфекции клеток. Альтернативно, такая ДНК может быть получена посредством ПЦР с использованием подходящих смысловых и антисмысловых праймеров. Затем полученные кДНК-конструкции встраивали в соответствующим образом сконструированные эукариотические экспрессирующие векторы методами, хорошо известными специалистам (Maniatis, 1982). Рекомбинантный белок очищали до чистоты выше 95%, и было обнаружено, что он является биологически активным *in vitro* и *in vivo* и имеет высокую аффинность по отношению к своему лиганду.

Пример 19. Протективное действие IL-18BP против индуцированной эндотоксином гибели клеток в мышинной модели.

Для того чтобы определить, обладает ли IL-18BP, ингибитор IL-18, протективным действием против высокой дозы липополисахаридов (ЛПС) у мышей, использовали мышиную модель. ЛПС вызывает острое поражение печени у мышей с последующей быстрой их гибелью.

4 мг/кг рекомбинантного человеческого IL-18BP (rhIL-18BP-his), содержащего his-метку (полученную путем рекомбинантного продуцирования белка), внутрибрюшинно инъецировали (*i.p.*) мышам C57BL/6. Через 1 ч инъецировали 60 мг/кг ЛПС (летальные дозы). Выживаемость этих мышей сравнивали с выживаемостью группы животных, которые получали только ЛПС (без IL-18BP).

Пять из 7 мышей, которым инъецировали rhIL-18BP-his, выживали после инъекции ЛПС, в отличие от контрольных мышей, которые все погибли в пределах 3 дней.

Пробы крови брали через 5 ч после инъекции ЛПС в отсутствие или в присутствии возрастающих доз rhIL-18BP-his и анализировали с помощью ELISA на содержание IFN γ в кровотоке (фиг. 1). 0,4 и 4 мг/кг rhIL-18BP индуцирова-

ли 2-кратное снижение IFN γ в сыворотке. Такое ингибирование не происходило при более низких дозах rhIL-18BP (0,004 и 0,4 мг/кг).

Пример 20. IL-18BP обладает протективным действием против поражения печени в мышинной модели заболевания.

Для оценки эффекта IL-18BP использовали мышиную модель фульминативного гепатита. После последовательного введения *Propionibacterium acnes* (*P.acnes*) и липополисахарида (ЛПС), у мышей развивалось острое поражение печени.

Мышам инъецировали возрастающие дозы rhIL-18BP-his (4; 0,4; 0,04; 0 мг/кг) через различные промежутки времени (1 ч, 20 мин, одновременно), а затем мышам C57BL/6, сенсibilизированным *P.acnes*, инъецировали ЛПС. При введении, *i.p.*, rhIL-18BP-his одновременно с ЛПС, ни одна из мышей не выживала, а уровни IFN γ и TNF α в кровотоке оставались неизменными. Неожиданно было обнаружено, что rhIL-18BP (4 и 0,4 мг/кг) индуцировал 70% снижение аланинаминотрансферазы в кровотоке (показатель поражения печени) как показано на фиг. 2.

Помимо этого проводили мониторинг выживания мышей (фиг. 3): при введении *i.p.* rhIL-18BP-his за 20 мин перед введением ЛПС, гибель мышей, которым вводили две самые высокие дозы IL-18BP (4 и 0,4 мг/кг), происходила на 10 ч позже по сравнению с контрольными мышами, которые получали NaCl вместо IL-18BP.

Результаты измерения уровней IFN γ в сыворотке представлены на фиг. 4. rhIL-18BP (4 мг/кг) на 90% ингибировал уровни IFN γ в кровотоке и на 80% ингибировал уровни аланинаминотрансферазы в кровотоке (данные не приводятся).

При введении rhIL-18BP-his за 1 ч до ЛПС, кривые выживаемости и уровни IFN γ в кровотоке были аналогичны тем, которые наблюдались при введении rhIL-18BP-his за 20 мин до введения ЛПС, но уровни аланинаминотрансферазы в кровотоке оставались неизменными (данные не приводятся).

Помимо этого, ткань мышинной печени была проанализирована путем окрашивания гематоксилином-эозином, а также с помощью туннельной микроскопии. В печени мышей, у которых предварительно был индуцирован тяжелый гепатит, обнаруживался обширный некроз по сравнению с печенью нормальных мышей. В противоположность этому, ткань мышинной печени, обработанная IL-18BP, обнаруживала значительно меньшие очаги некроза, чем у необработанных мышей.

Пример 21. Антитела против IL-18 защищают от летального эндотоксикоза.

Для того чтобы определить, защищает ли блокирование IL-18 анти-IL-18 антителами от

воздействия летальных доз бактериальных липополисахаридов, мышам C57BL/6J сначала инъецировали нейтрализующее кроличье антитело против мышиноного IL-18 (поликлональное) или нормальную кроличью сыворотку (НКС) в качестве контроля. Через 30 мин после обработки антителом мышам инъецировали летальные дозы ЛПС, происходящих либо от *E.coli* (фиг. 5А), либо от *S.typhimurium* (фиг. 5В). Эксперименты осуществляли с использованием 10-12 мышей на группу, и проводили два раза при двух различных условиях.

Как показано на фиг. 5А, обработка мышей антисывороткой против IL-18 способствовала предупреждению гибели мышей, индуцированной введением 40 мг/кг ЛПС *E.coli*. После обработки анти-IL-18 антителом выживало 100% мышей, в отличие от мышей, обработанных нормальной кроличьей сывороткой, из которых выживало лишь 10% ($p < 0,005$).

На фиг. 5В показано, что мыши, обработанные этим антителом, также были защищены от летального действия *S.typhimurium* (50% выживание в отличие от 0% выживания; $p < 0,05$).

Пример 22. Блокирование IL-18 и TNF- α защищает мышей от ConA- и PEA-индуцированной гепатотоксичности.

Для оценки роли IL-18 и TNF- α в поражении печени использовали две экспериментальные модели гепатотоксичности. Введение конканавалина А (ConA) и *Pseudomonas aeruginosa* (PEA) мышам приводит к индуцированию поражения печени, и такие мыши являются моделями Т-клеточно-опосредованного гепатита.

Мышей C57BL/6J предварительно обрабатывали антисывороткой против IL-18 или растворимым рецептором TNF- α , TNFRp55. Уровни аланинаминотрансферазы в сыворотке (ALT) измеряли как показатель поражения печени (фиг. 6).

Как показано на фиг. 6А, антисыворотка против IL-18 и растворимые TNF-рецепторы значительно снижали ConA-индуцированные уровни ALT в сыворотке по сравнению с контрольной инъекцией только одного носителя (апирогенный физиологический раствор). Совместное введение растворимого TNF-рецептора и антисыворотки против IL-18 приводило к полному ингибированию ConA-индуцированного поражения печени.

Как показано на фиг. 6В, у PEA-инъецированных мышей, нейтрализация ингибиторов TNF- α или антител против IL-18 приводила к 93%-му и 83%-му ингибированию уровней ALT в сыворотке соответственно. Комбинированное блокирование IL-18 и TNF- α приводило к 99%-й защите.

Пример 23. Уровни IL-18-связывающего белка в плазме увеличены у пациентов с хроническим заболеванием печени.

Уровни IL-18BP в плазме измеряли у 133 пациентов с хроническим заболеванием печени (ХЗП) различной этиологии и у 31 здоровых контрольных индивидуумов посредством специфического ELISA с использованием моноклонального антитела против IL-18BP.

Уровни IL-18BP в плазме были значительно выше у пациентов с ХЗП ($12,91 \pm 0,89$ нг/мл; среднее \pm ср.кв.ош.), чем у здоровых индивидуумов ($4,96 \pm 0,43$ нг/мл, $p < 0,001$). Пациенты с циррозом печени имели значительно большие уровни, чем пациенты с нециррозным ХЗП ($19,23 \pm 1,28$ нг/мл, $n=67$, ср. $6,49 \pm 0,51$ нг/мл, $n=66$, $p < 0,001$). Пациенты с заболеванием на стадии В по классификации Чайльда-Пьюга имели более высокие уровни IL-18BP, чем пациенты с заболеванием на стадии А ($22,48 \pm 2,44$ нг/мл, ср. $9,57 \pm 1,25$ нг/мл, $p < 0,001$). Однако какого-либо значимого отличия между этими уровнями на стадиях заболевания В и С по классификации Чайльда ($22,48 \pm 2,44$ нг/мл, ср. $20,62 \pm 4,75$ нг/мл, $p=0,7$) не наблюдалось. Уровни IL-18BP в плазме положительно коррелировали со скоростью осаждения GOT, билирубина и эритроцитов. Была обнаружена отрицательная корреляция с протромбиновым временем.

В итоге, результаты показали, что уровни IL-18BP в плазме были увеличены при ХЗП и коррелировали с тяжестью заболевания независимо от его этиологии. Хотя очевидно, что эндогенный антагонист провоспаления, вызываемого IL-18, увеличивает уровни IL-18BP, однако, это повышение не является достаточным для противодействия подавлению медиаторов провоспаления у пациентов с ХЗП.

Пример 24. Ингибирование алкогольного гепатита под действием IL-18BP.

Четырем группам крыс (5 крыс на группу) вводили этанол и корм, содержащий кукурузное масло, путем внутрижелудочного вливания в течение 4 недель. У контрольных крыс, этанол заменяли декстрозой такой же калорийности. Крысам ежедневно инъецировали мышиный IL-18BP (1 мг/кг) или физиологический раствор. На срезах печени проводили патологоанатомический анализ и измеряли уровни в сыворотке печеночных ферментов, TNF- α , Fas-лигандов и IFN- γ . У крыс, которым вводили этанол и физиологический раствор, наблюдалось некрвоспалительное поражение и экспрессия печеночных ферментов, TNF- α , Fas-лигандов и IFN- γ .

Инъекция крысам мышиноного IL-18BP защищала этих крыс от некрвоспалительного поражения и значительно снижала уровни печеночных ферментов, TNF- α , Fas-лигандов и IFN- γ ($>90\%$).

Пример 25. Ингибирование индуцированного конканавалином А гепатита под действием IL-18BP.

Мышам Balb/c инъецировали 12 мг/кг конканавалина А (ConA) без инъекции мышинового IL-18BP или с инъекцией (1 мг/кг), которую вводили за 2 ч до введения ConA, а затем ежедневно. Поражение печени оценивали путем определения сывороточных уровней печеночных ферментов, TNF- α , Fas-лиганда и IFN- γ . Результаты гистопатологии печени сравнивали с результатами, полученными для мышей, обработанных только конканавалином А.

Предварительная обработка IL-18BP приводила к значительному снижению уровней печеночных ферментов и TNF- α в сыворотке, причем гистопатологическая оценка не выявила какого-либо воспаления у этих мышей по сравнению с контрольными мышами, обработанными ConA.

Часть II. Примеры 26 и 27, относящиеся к использованию ингибиторов IL-18 при артритах.

Пример 26. Продуцирование метки IL-18BP-his.

Для проведения эксперимента, подробно описанного ниже в примере 27, рекомбинантный человеческий IL-18BP, содержащий метку his из 6 остатков (метка rhIL-18BP-his), продуцировали в клетках CHO и очищали как описано Kim et al., 2000. Рекомбинантный белок очищали до чистоты выше 95%, и было установлено, что он является биологически активным *in vitro* и *in vivo* и имеет высокую аффинность к его лиганду.

Продуцирование рекомбинантных белков в других эукариотических системах с меткой или без меток, облегчающих очистку рекомбинантных белков, известно специалистам. Существуют хорошо известные методы, которые используются для конструирования соответствующих векторов, несущих ДНК, кодирующую IL-18BP, и которые являются подходящими для трансфекции эукариотических клеток, осуществляемой в целях продуцирования рекомбинантного IL-18BP. Для экспрессии в клетках ДНК, кодирующую IL-18BP (см., например, Novick et al., 1999), вырезали из клонирующего вектора и встраивали в экспрессирующие векторы, подходящие для трансфекции клеток. Альтернативно, такая ДНК может быть получена посредством ПЦР с использованием подходящих смысловых и антисмысловых праймеров. Затем полученные кДНК-конструкции встраивали в соответствующим образом сконструированные эукариотические экспрессирующие векторы методами, хорошо известными специалистам (Maniatis, 1982).

Пример 27. Блокирование эндогенного IL-18 в мышинной модели артрита.

Методы

Индукция коллаген-индуцированного артрита (КИА).

КИА индуцировали у самцов мышей DBA/1 (8-12 недельных) путем иммунизации нативным бычьим коллагеном типа II (СII), как было описано ранее (Plater-Zyberk et al., 1995). Через 25 дней после СII-иммунизации, мышам ежедневно оценивали на развитие заболевания.

Обработка rhIL-18BP-6his.

Обработку С11-иммунизированных мышей DBA/1 начинали после появления первых клинических признаков заболевания. Для нейтрализации эндогенного IL18 у обработанных коллагеном мышам использовали рекомбинантный человеческий IL-18BP, содержащий метку из 6 гистидинов (rhIL-18BPa-6his). Мышам ежедневно в течение 7 дней внутривенно (i.p.) инъецировали rhIL-18BP-6his при 5 различных концентрациях, 10, 3, 1, 0,5, 0,25 мг/кг/инъекцию. Контрольным мышам давали только носитель, т.е. плацебо, (0,9% NaCl).

Оценка развития заболевания

Клиническая оценка (клинические балльные показатели).

После первого появления клинических симптомов оценка мышам проводилась каждый день исследователем, которому был неизвестен протокол обработки. Каждую конечность оценивали на тяжесть поражения (оценки 0-3,5, максимальная оценка 14/мышь). Прогрессирование отека (воспаления) измеряли на лапах, которые обнаруживали первые признаки заболевания, с использованием точного штангенциркуля (Proctest 2T, Kroeplin Langenmesstechnik).

Прогрессирование заболевания оценивали ежедневно в течение 8 дней от начала эксперимента, а затем всех мышам умерщвляли и проводили гистопатологический анализ лап.

Гистологическая оценка эрозии хряща и микроскопическая оценка воспаления.

После завершения экспериментов, т.е. на 8-й день их начала, мышам умерщвляли, и лапы, на которых обнаруживались первые признаки заболевания, иссекали. Суставы фиксировали, декальцинировали и заливали в парафин. Делали стандартные срезы (5-7 мкм) суставов и окрашивали гематоксилином/эозином/сафранином О. Каждый сустав оценивался 2 исследователями, которым был неизвестен протокол обработки (отсутствие деструкции хряща или кости = 0; локализованная эрозия хряща = 1-2; более обширные эрозии = 3; общая деструкция хряща и наличие эрозии костей = 4). Конечные оценки каждой мыши представляли собой среднее значение из результатов всех оцененных суставов. Микроскопическую оценку воспаления или синовита выражали в баллах от 0 до 4 следующим образом: отсутствие воспаления = 0; небольшое утолщение выстилающего слоя и/или некоторая инфильтрация клеток в субвыстилающем слое = 1-2; утолщение выстилающего слоя и/или более выраженный приток клеток субвыстилающего слоя = 3; присутствие клеток в синовиальном

пространстве и высокая степень инфильтрации синовия множеством воспалительных клеток = 4.

Определение антител против коллагена.

Антитела против бычьего коллагена типа II оценивали с использованием твердофазного иммуферментного анализа (ELISA). Измеряли титры IgG1 и IgG2a. Вкратце, планшеты сенсбилизовали 10 мкг бычьего коллагена, а затем сайты неспецифического связывания блокировали 0,1 М этаноламином (Sigma). Затем добавляли серийные разведения 1:2 сыворотки, после чего инкубировали с козьим антимышиным антителом конкретного изотипа, конъюгированным с пероксидазой (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA) и с субстратом (5-аминосалициловая кислота, Sigma). Планшеты считывали при 492 нм. Титры выражали как среднее \pm ср.кв.ош. разведение, которое давало полумаксимальную величину.

Анализ на IL-6.

Уровни IL-6 определяли с помощью ELISA (R&D systems, Minneapolis, MN, USA). Биологическую активность IL-6 определяли с помощью анализа на пролиферацию с использованием клеток B9. Вкратце, 5×10^3 клеток B9 в 200 мкл среды RPMI 1640 с 5% FCS на лунку высевали в круглодонный микротитрационный планшет и инкубировали в течение 3 дней с использованием человеческого рекомбинантного IL-6 (R&D systems Minneapolis, MN, USA) в качестве стандарта. После завершения инкубирования добавляли 0,5 мкКи ^3H тимидина (NEN-Dupont, Boston, MA, USA) на лунку. Через 3 ч клетки собирали и определяли включение тимидина. Предел детекции для биоанализа IL-6 составлял 1 пг/мл.

Статистический анализ.

Значимые различия оценивали в соответствии с критерием Манна-Уитни с использованием программы для статистического анализа SigmaStat и программы GraphPad Prism.

Результаты

Мышиную экспериментальную модель КИА (коллаген-индуцированного артрита) использовали для оценки эффективности IL-18BP в качестве агента для лечения артрита. Введение коллагена и неполного адьюванта Фрейнда мышам DBA/1 индуцировало развитие эрозивного воспалительного артрита и было использовано как идеальная возможность для исследования терапевтического потенциала IL-18BP. Для достижения этой цели эндогенный IL-18 нейтрализовали с использованием IL-18BP и оценивали влияние на различные патогенные параметры.

Были проведены исследования зависимости от дозы. Три группы мышей DBA/1 с коллаген-индуцированным артритом терапевтически обрабатывали (т.е. после начала заболевания) 5 дозами IL-18BP, i.p. (внутрибрюшинно). На первой клинической стадии заболевания вводили IL-18BP при концентрациях 10, 3, 1, 0,5 или

0,25 мг/кг. Контрольным мышам инъецировали физиологический раствор (хлорид натрия, NaCl). Помимо этого вводили, i.p., 10000 МЕ интерферона β (IFN- β) для оценки эффекта IFN у этих экспериментальных животных с моделью заболевания артритом. Проводили мониторинг его влияния на тяжесть заболевания путем ежедневной визуальной оценки каждой отдельной лапы как описано выше. Мышей умерщвляли на 8-й день после начала эксперимента.

Были измерены следующие величины:

- визуальные клинические оценки (0-3,5 на лапу) (фиг. 7А и В),
- опухание/отек сустава (в мм, измерено с помощью штангенциркуля) в лапе с первым признаком поражения, при условии, что она была задней лапой (фиг. 8),
- число лап, пораженных заболеванием (фиг. 9),
- оценка эрозии лапы с первым признаком поражения (деструкция хряща 0-4),
- гистопатологический анализ лапы с первым признаком развивающегося артрита,
- уровни антител против коллагена типа II,
- уровни IL-6.

Клиническая оценка тяжести заболевания.

Как показано на фиг. 7А и В, клиническая тяжесть заболевания значительно снижалась у групп мышей, обработанных 1 мг/мл ($P < 0,01$) и 0,5 мг/мл ($0,01 < P < 0,05$) rhIL-18BP. Мыши, которые получали низкую дозу rhIL-18BP (0,25 мг/кг) или высокую дозу rhIL-18BP (10 мг/кг), имели клиническую оценку, аналогичную оценке, полученной для группы плацебо. Доза в 1 мг/кг IL-18BP была почти такой же эффективной, как и интерферон β (обозначенный IFN β на фиг. 7А).

Воспаление суставов и опухание лапы (отек).

Макроскопическое воспаление (опухание) исследовали путем измерения отека лапы, начиная с дня 1 после развития заболевания и до дня 8, т.е. окончания эксперимента. Результаты представлены на фиг. 8А и В. Эффективные дозы IL-18BP составляли 1, 3 и 10 мг/кг. Введение более низких доз не оказывало благоприятного воздействия на опухание лап. Как показано на фиг. 8А и 8В, благоприятное воздействие на опухание лапы оказывал интерферон- β (IFN β) при концентрации 10000 МЕ.

Микроскопическую оценку синовита проводили по окончании эксперимента на гистопатологических срезах и выражали в баллах ("балльные показатели синовита"). Результаты оценок воспаления (опухания) и синовита систематизированы в табл. 5. rhIL-18BP-обработка при дозах 1 и 3 мг/кг приводила к снижению опухлости, однако, обработка любыми дозами IL-18BP оказывала лишь ограниченное воздействие на воспалительный синовит (табл. 5).

Таблица 5
Воздействие IL-18BP-обработки на воспаление суставов

Обработка	Опухание (ППК, среднее \pm ср.от.)	Балльный показатель синовита (среднее \pm ср.от.)
RhIL-18BP-6his 3 мг/кг	1,55 \pm 0,64	2,17 \pm 0,5
1 мг/кг	1,53 \pm 0,60	1,98 \pm 0,4
0,5 мг/кг	3,38 \pm 0,70	1,92 \pm 0,5
0,25 мг/кг	3,06 \pm 0,90	2,08 \pm 0,5
Плaцебо	3,11 \pm 0,77	2,23 \pm 0,3

На фиг. 9 показано, что число лап, пораженных заболеванием, снижалось после введения IL-18BP. В частности, терапевтические инъекции IL-18BP при дозах 1 и 0,5 мг/кг снижали число лап, пораженных заболеванием, что указывало на то, что блокирование IL-18 *in vivo* приводит к прекращению распространения артрита на другие суставы. Обработка 1 и 0,5 мг/кг IL-18BP очевидно может даже приводить к восстановлению некоторых пораженных артритом суставов до их нормального состояния.

Защита сустава от разрушения.

Обработка мышей rhIL-18BP обеспечивала защиту суставов от деструкции. Полуколичественная система оценки продемонстрировала, что эрозия костей поддается дозо-зависимому протективному воздействию, которое дает значимые результаты при дозах 10 и 3 мг/кг ($p < 0,05$). У мышей, получавших 1 мг/кг rhIL-18BP, наблюдалась меньшая эрозия, чем у мышей, получавших только носитель. Какого-либо защитного эффекта при дозах 0,5 и 0,25 мг/кг не наблюдалось. Интересно отметить, что защитное действие на суставы при дозах 3 и 10 мг/кг IL-18BP было сравнимым или даже более выраженным, чем защитное действие 10000 МЕ интерферона β (IFN- β).

Показана гистология здорового (А) и пораженного (В) сустава по сравнению с суставом животного, обработанного IL-18BP (С). Срезы брали в конце эксперимента от тех лап, на которых были обнаружены первые признаки развития артрита.

Сустав, взятый от мышей с артритом, обнаруживал тяжелые деструктивные артритные поражения с уменьшением хрящевой массы, а также с эрозиями и многочисленными клетками воспалительного инфильтрата в пораженном синовиальном слое. В суставе мышей, обработанных rhIL-18BP, наблюдался почти нормальный хрящ, несмотря на присутствие воспалительных клеток в синовиальном пространстве. При этом наблюдаемый хрящ имел не только большую массу, но был также более гладким на вид.

Обработка антителами против IL-18 модулирует уровни антител против коллагена типа II.

Мыши с КИА имели более высокие уровни антител IgG1 и IgG2a против коллагена типа II в кровотоке. Антитела изотипа IgG1 ассоциированы с TN2-опосредованными заболеваниями, а антитела изотипа IgG2a и IgG2b ассоциированы

с TN1-опосредованными заболеваниями. Артрит обычно классифицируется как TN1-опосредованное заболевание.

Антитела изотипов IgG-1 и IgG2a против коллагена типа II (СII) определяли в сыворотке животных, обработанных IL-18BP (фиг. 12). Уровни анти-СII антител изотипов IgG-1 и IgG2a не были значительно модифицированы обработкой IL-18BP на 4-й или 8-й дни (D4, D8) клинического заболевания. Однако через 8 дней после rhIL-18BP-обработки наблюдалось 2,6- и 3,4-кратное снижение отношения коллаген-специфических антител IgG1/IgG2a при дозах 1 и 3 мг/кг соответственно. На фиг. 12 проиллюстрирован эксперимент, в котором использовалась доза 3 мг/кг. В основном, те же самые результаты были получены с использованием количества 1 мг/кг IL-18BP. Снижение отношения анти-СII антител IgG1/IgG2a указывало на снижение концентрации антител изотипа IgG2a против коллагена типа II и на повышение концентрации антител изотипа IgG1 против коллагена типа II, что дало основание предположить о тенденции сдвига в сторону TN2-опосредованного заболевания в данной модели артрита.

Снижение уровней IL-6 после нейтрализации IL-18.

Для понимания сущности эффектов блокирования IL-18 измеряли уровни IL-6 в сыворотке животных, обработанных IL-18BP. Показано, что уровни биологически активного IL-6 значительно снижались у животных, подвергаемых IL-18BP-обработке при всех тестируемых дозах, т.е. при 1, 3 и 10 мг/кг, а также обработке интерфероном β (IFN β). Иммуноактивные уровни IL-6, измеренные в сыворотке животных, обработанных 3 мг/кг rhIL-18BP, были значительно снижены ($P < 0,0023$) по сравнению с уровнями животных, обработанных физиологическим раствором. Уровни IL-6 в сыворотке пораженных животных, обработанных 1, 3 или 10 мг IL-18BP или 10000 МЕ IFN β , были аналогичны уровням в сыворотке нормальных мышей (NMS), взятой у здоровых животных, т.е. у животных, не имеющих воспалительного заболевания.

Полученные данные продемонстрировали, что IL-18 регулирует уровни IL-6 в начале развития заболевания. Поскольку IL-6 является маркером воспаления, эти данные показали, что IL-18BP-обработка пораженных мышей приводила к ослаблению воспаления у этих животных.

На основании проведенных выше экспериментов могут быть сделаны следующие выводы:

- введение IL-18BP снижает клиническую тяжесть артрита;
- IL-18BP ингибирует последующее прогрессирование или распространение данного заболевания;
- введение IL-18BP снижает отеки;

- введение IL-18BP снижает деструкцию хряща;

- уровни IL-6 в сыворотке снижаются, а отношения анти-СП антител IgG1/IgG2a снижаются после IL-18BP-терапии.

Данные, приведенные выше, указывают на то, что нейтрализация биоактивности IL-18 после начала заболевания является антиревматической терапией, ослабляющей заболевание. Полученные результаты ясно продемонстрировали, что блокирование IL-18 приводит к снижению клинического прогрессирования артрита и, что более важно, к прекращению прогрессирования деструкции хряща и костей. Поэтому блокирование IL-18 белком IL-18BP, антителом против IL-18 или любым другим IL-18-блокирующим агентом может рассматриваться как новая антиревматическая терапия, ослабляющая заболевание.

Вышеприведенное описание конкретных вариантов осуществления изобретения иллюстрирует общую концепцию настоящего изобретения так, чтобы любые специалисты, опираясь на современные знания, могли легко модифицировать и/или адаптировать различные применения этих конкретных вариантов изобретения, не выходя за рамки основной концепции, а поэтому, такие адаптации и модификации должны входить в объем и серию эквивалентов, описанных вариантов осуществления изобретения. Очевидно, что используемая здесь фразеология или терминология применяется лишь для описания изобретения, а не для его ограничения.

Часть III. Примеры 28 и 29, относящиеся к воспалительному заболеванию кишечника.

Пример 28. Экспрессия IL-18BP эндотелиальными клетками и макрофагами в процессе активной болезни Крона.

Сбор образцов.

Биопсию слизистой кишечника брали из образцов, полученных в результате хирургической операции пациентов с болезнью Крона (БК) или язвенным колитом (ЯК). В эксперименте участвовали четырнадцать пациентов с БК (трое мужчин и одиннадцать женщин), при этом, средний возраст пациентов составлял 37,8 лет (от 20 до 78 лет), а средняя продолжительность болезни составляла 8,3 года (от 1 до 21 года). У восьми пациентов поражения локализовались в подвздошной кишке, а у шести пациентов - в толстой кишке. Двенадцать пациентов принимали иммунодепрессанты. Диагноз активной БК делали на основе гистопатологического анализа и в соответствии со следующими критериями: наличие изъязвлений, повышенное число воспалительных клеток и трансмуральное воспаление. Было идентифицировано семь пациентов с активной БК и семь пациентов, имеющих неактивное заболевание. Каких-либо отличий, зависящих от возраста, локализации заболевания, пола, лекарственной терапии и продолжительности заболевания, между паци-

ентами с активной БК и пациентами с неактивной БК не наблюдалось. Средний возраст 5 пациентов с ЯК (трое мужчин и две женщины) составлял 37,6 лет (от 30 до 44 лет). У всех пациентов заболевание было локализовано в толстой кишке, и все они проходили терапию иммунодепрессантами. Средняя продолжительность заболевания составляла 4 года (от 1 до 9 лет). Контрольные образцы получали от 5 пациентов, подвергшихся хирургической операции по поводу расстройств, не связанных с ВЗК (воспалительным заболеванием кишечника) (трое мужчин и две женщины). Средний возраст этой группы составлял 55,2 года (от 24 до 76 лет). У всех пациентов заболевание локализовалось в толстой кишке.

Полуколичественный ОТ-ПЦР-анализ на человеческие IL-18 и IL-18BP.

Полноразмерную РНК экстрагировали из замороженного биоптата кишечника пациентов с БК, ЯК или контрольных пациентов. Экстракцию РНК осуществляли с использованием тризола (Gibco) в соответствии с инструкциями производителей. Полученные образцы количественно оценивали путем измерения оптической плотности при 260 нМ. Целостность РНК оценивали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. кДНК синтезировали из 1 мкг полноразмерной РНК с использованием системы обратной транскрипции Promega в соответствии с инструкцией производителей. ПЦР-реакции осуществляли в общем объеме 50 мкл в присутствии 1 ед. ДНК-полимеразы AmpliTaq (Perkin Elmer, Roche, USA), 2,5 мМ dNTP (Amersham, USA) и 50 пмоль прямого и обратного ПЦР-праймеров. Реакционные смеси инкубировали в термоблокке PTC-200 Peltier Effect Thermal Cycler (MJ Research, USA) при следующих условиях: денатурация - 1 мин при 94°C, отжиг - 1 мин при 55°C и удлинение - 1 мин при 72°C. Было определено оптимальное число циклов для IL-18BP, IL-18 и β -актина перед насыщением полос (31, 28 и 25 соответственно). На основе опубликованных последовательностей (AF110799, D49950, X00351) были сконструированы следующие ПЦР-праймеры: IL-18, обратный: 5'-GCGTCACTACACTCAGCTAA-3'; прямой: 5'-GCCTAGAGGTATGGCTGTAA-3'; IL-18BP, прямой: 5'-ACCTGTCTACCTGGAGT GAA-3'; обратный: 5'-GCACGAAGATAGGA AGTCTG-3'; β -актин, обратный: 5'-GGAGGAGCAATGATCTTGATCTTC-3'; прямой: 5'-GCTCACCATGGATGATGATATCGC-3'. Для исключения амплификации примесной геномной ДНК, содержащейся в этих образцах, осуществляли ПЦР-реакции в отсутствие кДНК-матрицы. ПЦР-продукты (10 мкл) анализировали с помощью электрофореза на 1%-м агарозном геле в 1 x TAE-буфере. Размер ПЦР-продуктов подтверждали путем сравнения с 1 т.п.н.-лэддером (Gibco) после окрашивания геля.

Относительную количественную оценку полос, окрашенных этидийбромидом, осуществляли при УФ-излучении с использованием аналитической программы Kodak Digital Sciences, и эту оценку выражали как отношение гена-мишени (hIL-18BP, hIL-18) к гену "домашнего хозяйства" (h β -актин).

Генерирование моноклональных антител против hIL-18BP.

Мышам BALB/c подкожно инъецировали в четыре конечности, а также внутривенно, 50 мкг изоформы rhIL-18BP-6his (выделенной и очищенной из клеток яичника китайского хомячка) (Interpharm Laboratories, Nes Ziona, Israel) в PBS с адьювантом (эмульсия MPL + TDM, RIBI Immunochem Research, Inc.) на дни 0, 7 и 28. Через четыре дня после 3-й иммунизации выделяли лимфоциты и гидролизовали 2,4 мкг/мл коллагеназы (коллагеназа IV, Worthington Biochemical Corp.) и 0,1% ДНКазой (Sigma). Затем выделенные клетки подвергали слиянию с клетками миеломы Sp2/0 с использованием ПЭГ 1000 (FLUKA). Эти клетки ресуспендировали в DMEM-F12, 10% FCS (Gibco) в присутствии НАТ (гипоксантин, аминоптерин, тимидин) и распределяли по 96-луночным планшетам при концентрации 5×10^4 клеток/мл. Образцы супернатанта от гибридных культур скринировали на присутствие реактивных антител с помощью прямого скринирующего анализа. Для этого, ELISA-планшеты сенсibilizировали козьими антимышиными антителами F(ab')₂ (Jackson Immuno Research, Milan analytica, Switzerland), затем добавляли супернатанты от гибридных культур с последующим добавлением биотинилированного rhIL-18BP-6his (выделенного и очищенного из клеток COS как описано Novick et al., 1999) вместе с или без rhIL-18BP (выделенного и очищенного из рекомбинантных E.coli, Serono Pharmaceutical Research Institute, Geneva), и наконец конъюгат стрептавидин-пероксидаза хрена (ПХ)(Jackson Immuno Research, Milan analytica, Switzerland) визуализировали с использованием о-фенилендиамина (OPD) (Sigma). Нейтрализующие антитела отбирали и субклонировали. В этом исследовании было использовано мышинное моноклональное антитело IgG1, 95-H20.

Иммуногистохимические исследования на локализацию IL-18BP-положительных клеток.

Образцы тканей быстро замораживали и хранили при -80°C. Получали серийные криосрезы (10 мкм), наносили их на покрытые поли-L-лизинном предметные стекла Superfrost/Plus (Polylabo, Plan-les-Ouates, Switzerland) и фиксировали в охлажденном льдом ацетоне. Локализацию человеческого белка IL-18BP определяли иммуногистохимическим методом с использованием моноклонального антитела (mAb) 95-H20. После кратковременной регидратации в PBS, срезы предварительно инкубировали в течение 30 мин в PBS, содержащем 2% фетальную

телячью сыворотку (FCS) (Cansera, Ontario, Canada), 1% человеческую сыворотку (AB⁺-сыворотку, Transfusion Center, Annemasse, France) и 0,5% альбумин бычьей сыворотки (BSA) (Sigma, St. Louis, MO, USA). Эндогенную пероксидазную активность блокировали путем погружения предметных стекол в раствор PBS, 2% FCS, 1% человеческой сыворотки, 0,5% BSA и 1% перекись водорода (H₂O₂) (Fluka, Switzerland) на 1 ч. После промывки в PBS, срезы инкубировали в течение ночи с супернатантом неразведенной культуры mAb 95-H20. После второй промывки в PBS, срезы инкубировали с биотинилированным козьим антимышиным антителом (Jackson Immuno Research, Milan analytica, Switzerland) (5 мкг/мл) в PBS, содержащем 0,5% BSA, в течение 1 ч. Чувствительность окрашивания возрастала при инкубировании в течение 30 мин с комплексом "авидин/биотинилированная ПХ" (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories, CA, USA). Затем предметные стекла промывали PBS и проявляли с использованием раствора 30% H₂O₂, 3,3-амино-9-этилкарбазола (AEC) (Sigma), N,N-диметилформамида (Merck) в ацетатном буфере, pH 5. После контрастного окрашивания гематоксилином (Sigma), срезы покрывали глицерином и покровными стеклами. В качестве контрольного изотипа использовали мышинное антитело IgG1 (R и D-система).

Для идентификации клеточной локализации человеческого IL-18BP осуществляли двухцветный иммуногистохимический анализ на срезах слизистой кишечника. После 10-минутной регидратации в PBS, срезы предварительно инкубировали в течение 30 мин в PBS, содержащем 2% FCS, 1% человеческую сыворотку и 0,5% BSA. Для определения совместной локализации в эндотелиальных клетках, срезы инкубировали в течение ночи с биотинилированным mAb 95-H20 (20 мкг/мл), смешанным с ФИТЦ-конъюгированным мышинным антителом против человеческого CD31 (1:50) (Pharmingen, CA, USA) в PBS/0,5% BSA. Для определения совместной локализации в макрофагах, срезы инкубировали в течение ночи с биотинилированным mAb 95-H20 (20 мкг/мл), смешанным с ФИТЦ-конъюгированным антителом против человеческого CD68 (1:25) (Dako, Denmark). После промывки в PBS на 1 ч добавляли стрептавидин-техасский красный (Southern Biotechnology Associates, AL, USA). Предметные стекла снова промывали и срезы покрывали мовиолом и покровными стеклами. В качестве контрольного изотипа использовали биотинилированное мышинное антитело IgG1 (Pharmingen), а затем стрептавидин-техасский красный.

Клеточная культура.

Эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC) (Clonetics Corp., San Diego, CA) культивировали с использованием среды для роста эндотелиальных клеток (EGM), в ко-

тую были добавлены рекомбинантный человеческий эпидермальный фактор роста (hEGF) (10 нг/мл), гидрокортизон (1 мкг/мл), гентамицин и амфотерицин В (50 мкг/мл), бычий мозговой экстракт (BBE) (3 мг/мл) и 2% фетальной бычьей сыворотки (FCS) (Clonetics Corp., San Diego, CA) в соответствии с инструкциями производителей. Чашки с тканевыми культурами предварительно покрывали человеческим фибронектином (10 мкг/см²) (Boehringer, Mannheim). Клетки инкубировали в 5% CO₂-инкубаторе с повышенной влажностью и проводили эксперименты с использованием HUVEC при пассаже 3. HUVEC обрабатывали человеческим IL-1β (10 нг/мл), TNF-α (10 нг/мл) и IFNγ (20 нг/мл) (R and D system, Germany) в течение 24 ч. По окончании периода культивирования, клетки собирали, РНК выделяли и подвергали ОТ-ПЦР для анализа мРНК-транскриптов IL-18BP и IL-18. Супернатанты собирали и анализировали на экспрессию белков IL-18BP и IL-18 с помощью ELISA.

Человеческую моноцитарную клеточную линию THP-1 поддерживали в суспензионной культуре в среде RPMI, в которую были добавлены 10% термоинактивированная FCS, L-глутамин (2 мМ), пенициллин-стрептомицин (10 ед./мл) (Gibco BRL, Life Technologies) и β-меркаптоэтанол (50 мкМ) (Fluka). Эту культуру инкубировали в 5% CO₂-инкубаторе с повышенной влажностью и пассировали каждые 5 дней при 1:10. За три дня перед проведением экспериментов человеческие моноциты дифференцировали при плотности 0,4 × 10⁵ клеток/мл с использованием витамина D3 (80 нМ) (Biomol Research Laboratories, USA) и оставляли для адгезии. После дифференциации к клеточным культурам добавляли ЛПС (100 нг/мл) (Calbiochem), человеческий IL-1β (10 нг/мл), TNF-α (10 нг/мл) и IFNγ (20 нг/мл). Через 48 ч, супернатанты собирали и анализировали на экспрессию белков IL-18BP и IL-18 с помощью ELISA.

Измерения уровней продуцирования IL-18BP и IL-18.

Присутствие IL-18BP оценивали с помощью анализа ELISA в бесклеточных супернатантах от клеток HUVEC, нестимулированных или стимулированных в течение 24 ч смесью цитокинов (IL-1β, TNFα, IFNγ), а также от клеточной линии THP-1, нестимулированной или стимулированной в течение 48 ч (ЛПС, IL-1β, TNF-α, IFNγ). Для этого планшеты сенсibilizировали в течение ночи иммобилизованным моноклональным антителом (mAb) (клон 657.27 при 0,5 мкг/100 мкл/лунку, Interpharm Laboratories, Nes Ziona, Israel), направленным против rhIL-18BP (изоформа а). Затем растворимый hIL-18BP детектировали с использованием кроличьего поликлонального антитела (разведенного 1/10000), вырабатываемого против rhIL-18BP-6his (выделенного и очищенного из клеток

яичника китайского хомячка, Interpharm Laboratories, Nes Ziona, Israel), а затем инкубировали с аффинноочищенным козьим антикроличьим антителом IgG, конъюгированным с пероксидазой хрена (разведенным в отношении 1/20000) (Jackson Immuno Research, Milan analytica, Switzerland). Это иммобилизующее mAb, а также кроличье поликлональное антитело тестировали с помощью Вестерн-блот-анализа для подтверждения специфичности к IL-18BP. В качестве стандарта использовали рекомбинантный hIL-18BP-6his. Чувствительность ELISA составляла 100 пг/мл. Параллельно оценивали уровни IL-18 с использованием набора для ELISA-анализа человеческого IL-18 (MBL, Immunotech). Чувствительность ELISA составляла 12,5 пг/мл.

Экспрессия hIL-18BPα-his6 в клетках CHO.

Рекомбинантный человеческий IL-18BP (hIL-18BPα-his6-метка) выделяли из клеток яичника китайского хомячка (Interpharm Laboratories, Nes Ziona, Israel).

Результаты

Экспрессия мРНК-транскриптов IL-18BP в кишечных биоптатах.

Анализ экспрессии мРНК IL-18BP осуществляли с помощью ОТ-ПЦР на тканевых гомогенатах, полученных из хирургических образцов толстой кишки от пациентов с активным БК, неактивным БК или ЯК и от невоспалительной ткани кишечника. Транскрипты IL-18BP и актина детектировали во всех тестируемых кишечных гомогенатах. Аналогичным образом транскрипты для IL-18 были обнаружены во всех тканевых гомогенатах, т.е. от пациентов с БК, ЯК или не-ВЗК-контролей. Отношение уровней мРНК для IL-18BP или для IL-18 к уровням мРНК контрольного актина продемонстрировали статистически значимое увеличение (как описано ниже) количества транскриптов для обоих IL-18BP и IL-18 в биоптатах, полученных от пациентов с активным БК, по сравнению с биоптатами, полученными от пациентов с неактивным БК, с ЯК и от контрольных пациентов с отсутствием ВЗК. Эти данные показали, что IL-18BP подвержен позитивной регуляции в ткани слизистой в процессе активной БК, и это является главным свидетельством того, что уровень экспрессии IL-18BP позволяет четко дифференцировать активную БК от неактивной БК, ЯК и не-ВЗК-контроля.

Статистический анализ экспрессии мРНК-транскриптов IL-18BP в кишечных биоптатах.

После сбора всех имеющихся данных осуществляли дисперсионный анализ. Результат анализа явно выявил резко отклоняющиеся значения, относящиеся к результатам, полученным для одного из пациентов из группы с активной БК (очень высокое OD-отношение для IL-18, а именно 16252, и очень низкое OD-отношение для IL-18BP, а именно 1058). Это единственная и очень нетипичная пара значений не позволяет подтвердить правильность ANOVA-модели (р-

величина критерия Шапиро-Уилкса для нормальности остаточных дисперсий $<0,0001$), а поэтому было принято решение игнорировать эту пару измерений в статистическом анализе.

Используемая ANOVA-модель учитывала фактор-группу (контроль, активная БК, неактивная БК и ЯК), белок (IL-18 или IL-18BP) и число пациентов (23 пациента). Имеется значимое различие внутри группы (p -величина $<0,0001$). Также интересно отметить, что различие в OD-отношениях между IL-18 и IL-18BP является незначимым (p -величина = 0,369). Кроме того, была также проведена корреляция между уровнями экспрессии IL-18 и IL-18BP. Коэффициент корреляции между IL-18 и IL-18BP был равен 0,67, что позволяет предположить тесную взаимосвязь между OD-отношениями, измеренными для IL-18 и IL-18BP. После оценки результатов, касающихся группового эффекта, был использован метод Шеффе для сравнения различных групп. Может быть сделан вывод, что OD-отношение для активного БК значительно выше, чем для контроля (+3280), ЯК (+2590), а особенно для неактивного БК (+4580), как в случае экспрессии IL-18BP, так и в случае экспрессии IL-18.

Иммуногистохимическая локализация IL-18BP в кишечной ткани.

Для оценки клеточной экспрессии IL-18BP *in situ* осуществляли иммуногистохимический анализ на криосрезах, полученных из кишечных тканей от пациентов с активным БК и от не-ВЗК-контролей, с использованием моноклональных антител против hIL-18BP. IL-18BP-положительные клетки детектировали в собственной пластинке слизистой (*lamina propria*), в подслизистом слое и в мышечном слое (данные не приводятся). Позитивно окрашенные мононуклеарные клетки, присутствующие в собственной пластинке слизистой и в подслизистом слое, имели избыточную цитоплазму, везикулярное сетчатое ядро и морфологически соответствовали тканевым макрофагам. В мышечном слое позитивно окрашенные клетки имели избыточную цитоплазму с несколькими открытыми просветами в середине, что позволяет предположить о позитивном окрашивании микрососудов, и эти клетки морфологически соответствовали эндотелиальным клеткам. Крупные сосуды также специфически окрашивались моноклональными антителами против hIL-18BP. Значительное увеличение положительно окрашенных клеток, наблюдаемое в образцах, полученных от пациентов с активным БК, по сравнению с образцами, полученными от контрольных пациентов с отсутствием ВЗК, коррелировало с повышенным уровнем экспрессии IL-18BP, наблюдаемым в ОТ-ПЦР-анализе. Смежные срезы инкубировали с соответствующим мышинным контрольным изотипом.

Идентификация продуцирования IL-18BP клетками, присутствующими в биоптатах слизистой.

IL-18BP-положительные клетки, присутствующие в воспалительных тканях кишечника, были идентифицированы с использованием специфических маркеров макрофагов (анти-CD68 антитела) и эндотелиальных клеток (анти-CD31 антитела) (данные не приводятся). CD68-положительные клетки (зеленая окраска) и IL-18BP-положительные клетки (красная окраска) были обнаружены в собственной пластинке слизистой и в подслизистом слое кишечных тканей от пациентов с активной БК (данные не приводятся). CD31-положительные клетки (зеленая окраска) и IL-18BP-положительные клетки (красная окраска) были обнаружены в подслизистом слое. Для подтверждения того факта, что макрофаги и эндотелиальные клетки были также IL-18BP-положительными, клетки обоих цветов, зеленого от анти-CD68 антитела или анти-CD31 антитела и красного от анти-IL-18BP антитела анализировали вместе, в результате чего было продемонстрировано, что все клетки, которые связываются с антителами против IL-18BP, были либо CD68-положительными, либо CD31-положительными (оранжево-желтая окраска). Двойное иммуномечение продемонстрировало, что эти макрофаги и эндотелиальные клетки являются главным источником окрашивания IL-18BP в воспалительных тканях, полученных от пациентов с БК.

Экспрессия мРНК и белка IL-18BP эндотелиальными клетками.

Для исследования способности человеческих эндотелиальных клеток продуцировать IL-18BP, а также для подтверждения результата, полученного посредством иммуноокрашивания и реакции ОТ-ПЦР на всех биоптатах, осуществляли дополнительные эксперименты с помощью реакции ОТ-ПЦР на эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVEC). Эндотелиальные клетки обрабатывали смесью цитокинов (hIL-1 β , hTNF- α , hIFN γ) и через 24 ч собирали для экстракции РНК и ПЦР-анализа. Отношение уровней мРНК для IL-18BP к уровням мРНК для контрольного актина продемонстрировало увеличение количества транскриптов IL-18BP в обработанных клетках по сравнению с нестимулированными клетками, через 24 ч. Кроме того, очевидно, что мРНК IL-18BP конститутивно экспрессируется в эндотелиальных клетках. Был также проанализирован уровень мРНК IL-18 и было продемонстрировано его небольшое увеличение в обработанных клетках. Однако мРНК IL-18 не экспрессировался в нестимулированных эндотелиальных клетках.

ELISA-анализ супернатантов культуры нестимулированных клеток (среда) и клеток HUVEC, обработанных в течение 24 ч, выявил, что белок IL-18BP присутствовал как в клетках, обработанных средой, так и в стимулированных

клетках, где после 24-часовой стимуляции его уровень увеличивался в 30 раз.

Экспрессия белка IL-18BP моноцитарной клеточной линией (ТНР-1).

Экспрессию IL-18 и IL-18BP анализировали в супернатантах культуры нестимулированных и стимулированных дифференцированных клеток ТНР-1 с помощью ELISA. Этот эксперимент выявил увеличение экспрессии IL-18BP после 48-часовой стимуляции липосахаридами (ЛПС), hIL-1 β , hTNF- α , hIFN γ . Аналогичным образом секреция IL-18 повышалась после стимулирования.

Выводы

В настоящем исследовании проводили характеристику экспрессии IL-18BP и определяли локализацию IL-18BP в ткани слизистой, полученной от пациентов с болезнью Крона (БК) и язвенным колитом (ЯК). В соответствии с протоколом полуколичественного ОТ-ПЦР-анализа, было обнаружено увеличение уровней мРНК-транскриптов IL-18BP в биоптатах слизистой у пациентов с активной болезнью Крона по сравнению с пациентами с язвенным колитом и с пациентами невоспалительного контроля. Иммуногистохимические анализы биоптата слизистой выявили присутствие белка IL-18BP в эндотелиальных клетках и в макрофагах, инфильтрирующих слизистую при болезни Крона. Экспрессия IL-18BP эндотелиальными клетками и активированными макрофагами была подтверждена в первичных эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVEC) и в моноцитарной клеточной линии ТНР1, стимулированной *in vitro*. После стимуляции эти клетки секретируют биоактивный IL-18BP.

Пример 29. Обработка ингибиторами IL-18 приводила к уменьшению интенсивности симптомов экспериментального колита.

Материалы и методы

Мыши и индуцирование колита.

Все эксперименты проводились с разрешения Комиссии по этике исследований, проводимых на животных, при Амстердамском университете, Нидерланды. Мышей BALB/c получали из Harlan Sprague-Dawley, Inc. (Horst, The Netherlands). Мыши содержались в стандартных условиях и получали питьевую воду и корм (AM-II, 10 мм, Hope Farms, Woerden, The Netherlands).

Эксперименты проводили на 8- и 10-недельных самках мышей BALB/c. Колит индуцировали путем ректального введения двух доз (отдельно, через интервал в 7 дней) 2 мг 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислоты (TNBS) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) в 40% этанола (Merck, Darmstadt, Germany) с использованием винилового катетера, который был помещен на расстоянии 3 см от ануса (10 мышей на группу). Во время установления катетера мышью анестезировали изофлураном (1-хлор-2,2,2-трифторэтилизифлурандифторметилловый

эфир, Abbott Laboratories Ltd., Queenborough, Kent, UK) и после установления катетера мышью держали вертикально в течение 60 с. Контрольных мышью подвергали идентичным процедурам, но при этом вводили физиологический раствор. Через 9 дней после первого введения TNBS (т.е. через 48 ч после второго введения TNBS) всех мышью умерщвляли.

Мышью внутрибрюшинно обрабатывали человеческим IL-18BP в 500 мкл 0,9%-го физиологического раствора.

hIL-18BP представляет собой человеческий рекомбинантный белок, содержащий метку из 6 гистидинов, в экспрессионной системе CHO. hIL-18BP являлся биологически активным, поскольку он ингибировал продуцирование IFN γ в клеточной линии KG-1 и снижал продуцирование IFN- γ клетками мышью селезенки (Kim et al., 2000).

Оценка воспаления.

Массу тела регистрировали ежедневно. После умерщвления мышью вырезали селезенку, каудальные лимфотические узлы и толстую кишку. Толстую кишку удаляли посредством срединного разреза и продольного иссечения. После удаления фекальных масс, регистрировали сырую массу дистального 6 см-отдела и использовали как показатель ассоциированного с заболеванием утолщения стенки кишечника. Затем толстую кишку разделяли на две части путем продольного рассечения, и одну часть использовали для гистологического анализа.

Гистологический анализ.

Продольно разрезанную толстую кишку скатывали, фиксировали 4% формалином и заливали в парафин для рутинного гистологического анализа. Два исследователя, работавшие вслепую, т.е. не знавшие о распределении мышью по группам обработки, оценивали мышью по следующим параметрам: 1) процент пораженной площади, 2) гиперплазия фолликулярных агрегатов, 3) отеки, 4) эрозия/изъязвление, 5) отсутствие крипты и 6) инфильтрация моноили полиморфонуклеарных клеток. Процент пораженной площади и отсутствие крипты оценивали по шкале от 0 до 4 баллов следующим образом: 0 = нормальный, 1 = менее чем 10%, 2 = 10%, 3 = 10-50%, 4 = более чем 50%. Эрозию определяли как 0, если эпителий был неповрежденным, оценка 1 означала поражение собственной пластинки слизистой, оценка 2 означала изъязвление подслизистого слоя, а оценка 3 означала изъязвление в трансмуральном слое. Другие параметры оценивались по шкале 0-3 балла следующим образом: 0 - поражение отсутствует, 1 - слабое поражение, 2 - среднее поражение; 3 - сильное поражение. Эта шкала оценок имеет диапазон от 0 до максимум 26 баллов.

Гомогенаты толстой кишки.

Толстую кишку выделяли и получали гомогенаты с помощью тканевого гомогенизатора в 9 объемах буфера для лизиса Greenburger (300 mM NaCl, 15 mM Триса, 2 mM MgCl₂, 2 mM Тритона (X-100), пепстатин А, лейпептин, апрогитин (все по 20 нг/мл), pH 7,4). Ткань подвергали лизису в течение 30 мин на льду, с последующим двукратным центрифугированием (10 мин, 14000 x g). Гомогенаты хранили при -20°C вплоть до использования.

Клеточные культуры и анализ ELISA на цитокины.

Для получения суспензии клеток селезенки и каудальных лимфатических узлов использовали клеточные фильтры (Becton/Dickinson Labware, New Jersey, USA). Клетки суспендировали в среде RPMI 1640 (BioWhittaker-Boehringer, Verviers, Belgium), содержащей 10% FCS и ципроксин (10 мкг/мл) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Клетки селезенки центрифугировали со стерильным фиколлом (Pharmacia, Uppsala, Sweden), моноклеарные клетки переносили в среду RPMI и подсчитывали число клеток в суспензии. Полное число 1×10^5 клеток/мышь инкубировали в 200 мкл RPMI (BioWittaker Europe, A Cambrex Company, Verviers, Belgium), содержащей антибиотика и 10% фетальную телячью сыворотку в лунках с тремя повторностями. Клетки стимулировали путем предварительной сенсibilизации антителом против CD3 (концентрация 1:30; клон 145.2C11) и растворимым антителом против CD28 (концентрация 1:1000; Pharmingen). Супернатанты удаляли через 48 ч и измеряли концентрации IFN γ (Pharmingen) и TNF- α (R&D systems, Abingdon, United Kingdom) с помощью анализа ELISA.

Проточная цитометрия.

Выделенные клетки селезенки промывали буфером FACS (PBS, содержащий 0,5% BSA, 0,3 ммоль/л EDTA и 0,01% азида натрия) и выдерживали на льду для проведения дальнейшей процедуры. 2×10^5 клеток на лунку (96-луночного V-образного микропланшета, Greiner V.V. labor techniek, Alphen aan de Rijn, The Netherlands) инкубировали со следующими антителами (mAb): крысиным антителом против мышинового CD4, конъюгированным с цитохромом, (клон RM4-5), ФИТЦ-конъюгированным крысиным антителом против мышинового CD69 и ФИТЦ-конъюгированным крысиным антителом против мышинового CD25 (Pharmingen, San Diego, CA). Лимфоциты, отобранные на сортере путем прямого и бокового рассеяния с использованием проточного цитометра FASScan в комбинации с программным обеспечением Facscan (Becton Dickinson, Mountain View, USA) и считывали 5000 клеток. Результаты выражали как процент отобранных клеток, которые были положительными по отношению к используемому mAb.

Статистический анализ.

Величины были представлены как среднее значение \pm ср.кв.ош. на группу обработки. Различия между группами были проанализированы с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Изменение массы в зависимости от времени анализировали с использованием одностороннего дисперсионного анализа. $P < 0,05$ рассматривался как уровень значимости. Для всех анализов использовали статистическое программное обеспечение SPSS (SPSS Inc. Chicago, USA).

Результаты

IL-18BP защищает от потери массы у мышей с моделью колита.

Для исследования роли IL-18 в экспериментальном колите, а в частности, протективного эффекта IL-18-связывающего белка (IL-18BP), у мышей BALB/c индуцировали TNBS-колит. Эта модель предусматривает местную обработку тринитробензолсульфоновой кислотой (TNBS) в 40% этаноле. Это вызывает реакцию гиперчувствительности замедленного типа в ответ на аутоантиген, модифицированный гаптенем (тринитрофенилом), и этот ответ представляет собой реакцию Th1-типа с усиленным продуцированием провоспалительных цитокинов.

Мышей каждый день обрабатывали внутрибрюшинно (i.p.) человеческим IL-18BP или контролем.

Суточные внутрибрюшинные дозы, составляющие от 12,5 до 50 мкг hIL-18BP, не влияли на тяжесть заболевания (данные не приводятся). Однако использование ежедневной внутрибрюшинной дозы 200 мкг hIL-18BP было эффективным для снижения потери массы в связи с индуцированием заболевания.

Как и ожидалось, ректальное введение TNBS приводило к диарее и к истощению. Животные в обеих группах обработки теряли 15% от своей исходной массы на 3-й день. Однако по сравнению с контрольными мышами, начиная с 4-го дня после введения TNBS, hIL-18BP-обработанные животные быстро восстанавливали свою первоначальную массу и на 8-й день имели исходную массу. У контрольных мышей, второе введение TNBS на 8-й день снова приводило к значительной потере массы, которая, в основном, предотвращалась введением hIL-18BP. Введение hIL-18BP обработанным физиологическим раствором мышам не давало никакого эффекта (данные не приводятся). Поэтому введение hIL-18BP приводило к значительному уменьшению потери массы, ассоциированной с TNBS-индуцированным колитом ($p < 0,05$).

Влияние на параметры воспаления.

На 10-й день мышей умерщвляли и определяли массу последних 6 см толстой кишки. При TNBS-колите, масса толстой кишки увеличивалась по сравнению с массой толстой кишки мышей, обработанных физиологическим раствором. Это увеличение массы было значитель-

но меньшим у hIL-18BP-обработанных мышей (181,6 мг ± 11,4, а у мышей, обработанных физиологическим раствором - 268 мг ± 27,3 (p<0,05)). Ранее сообщалось, что TNBS-колит ассоциирован с увеличением миграции клеток в каудальные лимфоузлы (Samoglio et al., 2000). IL-18BP-обработка приводила к снижению числа клеток, поражающих каудальный лимфоузел, по сравнению с числом клеток в каудальном лимфоузле у TNBS-мышей, обработанных физиологическим раствором.

Изменение экспрессии CD69, которое является показателем ранней активации Т-лимфоцитов, определяли с помощью анализа Facscan. Процент CD4⁺-клеток селезенки, экспрессирующих CD69, составлял 11,4% у TNBS-обработанных мышей, а у TNBS-мышей, обработанных hIL-18BP, процент CD4⁺/CD69⁺-клеток составлял 7,3% (P<0,05).

Продуцирование цитокинов в клетках селезенки, в клетках каудального лимфоузла и в гомогенатах толстой кишки.

Для исследования влияния hIL-18BP на способность Т-лимфоцитов стимулировать синтез провоспалительных цитокинов после активации Т-клеточного рецептора, клетки выделяли из каудального лимфоузла и селезенки и стимулировали в течение 48 ч антителами против CD3/CD28. В супернатантах измеряли уровень продуцирования IFN-γ и TNF-α. Каких-либо значимых отличий между продуцированием цитокинов у hIL-18BP-обработанных мышей и у контрольных мышей не наблюдалось. Следовательно, нейтрализация IL-18 путем hIL-18BP-обработки не приводила к генерализованному снижению способности Т-лимфоцитов реагировать на активацию Т-клеточного рецептора.

Гомогенаты толстой кишки анализировали на уровни цитокинов, что позволяло, тем самым, определить местное продуцирование цитокинов. Никакого отличия в уровнях IFN-γ в гомогенатах толстой кишки у TNBS-мышей и у TNBS-мышей, обработанных hIL-18BP, не наблюдалось (134 пг/мл ± 7,8 и 139 пг/мл ± 23 соответственно). Однако уровни TNF-α в гомогенатах толстой кишки у hIL-18BP-обработанных мышей значительно снижались от 110 пг/мл ± 3 у TNBS-мышей и до 59 пг/мл ± 2,7 у TNBS-мышей, обработанных hIL-18BP.

Данные гистологического анализа.

Для того чтобы определить, влияет ли hIL-18BP-опосредованное снижение параметров воспаления также на гистологическую оценку, проводили гистопатологический анализ на парафиновых срезах. Общая оценка воспаления, полученная при гистологическом анализе, была значительно ниже у hIL-18BP-обработанных мышей по сравнению с контрольными мышами (15,9±1,1 - у необработанных мышей и 9,8±1,3 - у hIL-18BP-обработанных мышей) (данные не приводятся), что, в основном, обусловлено сни-

жением числа лейкоцитов, инфильтрирующих слизистую (p<0,05). Интересно отметить, что у IL-18BP-обработанных мышей наблюдалось полное отсутствие изъязвлений слизистой (p<0,05). Полученные результаты систематизированы в табл. 6, приведенной ниже. Особенно примечательно, что у IL-18BP-обработанных мышей полностью предупреждалось изъязвление слизистой.

Таблица 6

Различные параметры зоны колита у TNBS-мышей, обработанных физиологическим раствором или hIL-18BPa

	Контрольные TNBS-мышы	hIL-18BP-обработанные TNBS-мышы
% Площади поражения	3,4 ± 0,4	3,2 ± 0,5
Фолликулярные агрегаты	2,0 ± 0,4	1,5 ± 0,4
Отек	2,1 ± 0,3	1,3 ± 0,3
Фиброз	0,85 ± 0,26	0,50 ± 0,2
Изъязвления	2,0 ± 0,3	0,0 ± 0,0*
Отсутствие крипты	1,7 ± 0,3	1,0 ± 0,3*
Полиморфные ядерные клетки	2,6 ± 0,2	1,3 ± 0,2*
Мононуклеарные клетки	1,1 ± 0,1	0,33 ± 0,21*

Данные представлены как среднее значение ± ср.кв.ош. по шкале оценок 0-4,

* означает значимое отличие.

Поликлональные антитела против mIL-18 защищают от заболевания у мышей с моделью колита, индуцированного натрийсодержащим сульфатом декстрана.

В этой модели натрийсодержащий сульфат декстрана (DSS), id, давали мышам вместе с питьевой водой, начиная со дня 0 и вплоть до момента умерщвления животных. Поликлональные антитела против IL-18BP вводили i.p. на дни 0, 4 и 8. Дозы кроличьей сыворотки составляли 200 и 400 мкл. Наиболее высокая доза (400 мкл) давала значительное снижение потери массы, клинической оценки, кровотечения из прямой кишки и укорачивания толстой кишки (данные не приводятся). Обработка кроличьим антителом против mIL-18 приводила к замедлению начала заболевания и к предотвращению прогрессирования заболевания (данные не приводятся).

Выводы

В вышеописанном примере 29 продемонстрировано, что нейтрализация IL-18 путем введения либо hIL-18BP, либо поликлональной антисыворотки против IL-18 приводит к эффективному снижению тяжести экспериментально индуцированного колита у мышей.

У мышей, которым ежедневно внутрибрюшинно вводили hIL-18BP, по сравнению с контрольными мышами быстро восстанавливалась их первоначальная масса. Оценки других параметров воспаления толстой кишки, таких как масса толстой кишки и приток клеток в каудальные лимфоузлы, снижались у hIL-18BP-обработанных мышей. Гистопатология обработанных мышей указывала на снижение тяжести деструкции тканей (изъязвлений) и на значи-

тельное снижение количества инфильтрирующих клеток. Эффект hIL-18BP был системным, на что указывала пониженная экспрессия CD69 клетками селезенки.

Локальное продуцирование TNF α , измененное в гомогенатах толстой кишки, было значительно снижено у TNBS-мышей, обработанных hIL-18BP. Это свидетельствует о том, что TNF α играет важную роль в прогрессировании заболевания. Уровни IFN γ у TNBS-мышей и у TNBS-мышей, обработанных hIL-18BP, были сравнимыми, что может быть объяснено избыточностью IFN γ -индуцирующих стимуляторов.

В заключение можно сделать вывод, что представленные выше данные демонстрируют благоприятный эффект ингибиторов IL-18 при лечении воспалительных заболеваний кишечника.

Литература

- Anderson, D.M., et al., A homologue of the TNF receptor and its Ugand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 1997. 390(6656): p. 175-179.
- Bollon, D. P., et al. (1980) *J. Clin. Hematol. Oncol.* 10:39-48.
- Botstein, D., et al. (1982) *Miami Wint. Symp.* 19:265-274.
- Broach, J. R., in "The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Life Cycle and Inheritance", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp. 445-470 (1981).
- Broach, J. R., (1982) *Cell* 28:203-204.
- Byrn R. A. et al., 1990, *Nature (London)* 344:667-670.
- Car, B. D., V. M. Eng, B. Schnyder, L. Ozmen, S. Huang, P. Gally, D. Heumann, M. Aguet, and B. Ryffel. 1994. Interferon γ receptor deficient mice are resistant to endotoxic shock. *J. Exp. Med.* 179:1437-44 issn: 0022-1007.
- Chater, K. F. et al., in "Sixth International Symposium on Actinomycetales Biology", Akademiai Kiado, Budapest, Hungary (1986), pp. 45-54.
- Conti, B., J. W. Jahng, C. Tinti, J. H. Son, and T. H. Joh. 1997. Induction of interferon- γ inducing factor in the adrenal cortex. *J. Biol. Chem.* 272:2035-2037.
- Dao, T., K. Ohashi, T. Kayano, M. Kurimoto, and H. Okamura. 1996. Interferon- γ -inducing factor, a novel cytokine, enhances Fas ligand-mediated cytotoxicity of murine T helper 1 cells. *Cell-Immunol.* 173:230-5 issn: 0008-8749.
- Engelmann, H., D. Aderka, M. Rubinstein, D. Rotman, and D. Wallach. 1989. A tumor necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity. *J. Biol. Chem.* 264:11974-11980.
- Engelmann, H., D. Novick, and D. Wallach. 1990. Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors. *J. Biol. Chem.* 265: 1531-1536.
- Fantuzzi, G., et al., IL-18 regulation of IFN-g production and cell proliferation as revealed in interleukin-1b converting enzymedeficient mice. *Blood*, 1998. 91: p. 2118-2125.
- Gryczan, T., "The Molecular Biology of the Bacilli", Academic Press, NY (1982), pp. 307-329.
- Gutkind, J.S. et al., A novel c-fgr exon utilized in Epstein-Barr virus-infected B lymphocytes but not in normal monocytes. *Molec. Cell. Biol.*, 1991. 11: p. 1500-1507.
- Heremans, H., J. Van Damme, C. Dillen, R. Dijkmans, and A. Billiau. 1990. Interferon γ , a mediator of lethal lipopolysaccharide-induced Shwartzman-like shock reactions in mice. *J. Exp. Med.* 171:1853-69 issn: 0022-1007.
- Izaki, K. (1978) *Jpn. J. Bacteriol.* 33:729-742.
- John, J. F., et al. (1986) *Rev. Infect. Dis.* 8:693-704.
- Kendall, K.J. et al. (1987) *J. Bacteriol.* 169:4177-4183.
- Kohno, K., J. Kataoka, T. Ohtsuki, Y. Suemoto, I. Okamoto, M. Usui, M. Ikeda, and M. Kurimoto. 1997. IFN- γ -inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. *J. Immunol.* 158:1541-1550.
- Maliszewski, C. R., T. A. Sato, T. Vanden Bos, S. Waugh, S. K. Dower, J. Slack, M. P. Beckmann, and K. H. Grabstein. 1990. Cytokine receptors and B cell functions. I. Recombinant soluble receptors specifically inhibit IL-1- and IL-4-induced B cell activities in vitro. *J. Immunol.* 144:3028-3033.
- Maniatis, T., in "Cell Biology: A Comprehensive Treatise, Vol. 3: Gene Expression", Academic Press, NY, pp. 563-608 (1980).
- Maniatis et. al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- Micallef, M. J., T. Ohtsuki, K. Kohno, F. Tanabe, S. Ushio, M. Namba, T. Tanimoto, K. Torigoe, M. Fujii, M. Ikeda, S. Fukuda, and M. Kurimoto. 1996. Interferon- γ -inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon- γ production. *Eur-J-Immunol* 26:1647-51 issn: 0014-2980.
- Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acid Res.* 18:5322-5328.
- Nakamura, K., H. Okamura, K. Nagata, T. Komatsu, and T. Tamura. 1993. Purification of a factor which provides a costimulatory signal for γ interferon production. *Infect-Immun* 61:64-70 issn: 0019-9567.
- Nakamura, K., H. Okamura, M. Wada, K. Nagata, and T. Tamura. 1989. Endotoxin-induced

serum factor that stimulates γ interferon production. Infect-Immun 57:590-5 issn: 0019-9567.

28. Novick, D., B. Cohen, and M. Rubinstein. 1994. The Human Interferon α/β Receptor - Characterization and Molecular Cloning. Cell 77:391-400.

29. Novick, D., B. Cohen, and M. Rubinstein. 1992. Soluble Interferon- α Receptor Molecules Are Present in Body Fluids. FEBS Lett 314:445-448.

30. Novick, D., H. Engelmann, D. Wallach, and M. Rubinstein. 1989. Soluble cytokine receptors are present in normal human urine. J. Exp. Med. 170:1409-1414.

31. Okamura, H., H. Tsutsui, T. Komatsu, M. Yutsudo, A. Hakura, T. Tanimoto, K. Torigoe, T. Okura, Y. Nukada, K. Hattori, K. Akita, M. Namba, F. Tanabe, K. Konishi, S. Fukuda, and M. Kurimoto. 1995. Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells. Nature 378:8 8-91.

32. Rothe, H., N. A. Jenkins, N. G. Copeland, and H. Kolb. 1997. Active stage of autoimmune diabetes is associated with the expression of a novel cytokine, IGIF, which is located near Idd2. J-Clin-Inves.t 99:469-74 issn: 0021-9738.

33. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and M. T., Molecular Cloning: A laboratory manual. 2nd ed. ed. 1989, Cold Spring Har-bor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

34. Simonet, W.S., et al., Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell, 1997. 89(2): p. 309-319.

35. Sompayrac, L.H. and K.L. Danna, Efficient infection of monkey cells with DNA of simian virus 40. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 1981. 78: p. 7575-7578.

36. Sparks, C.A., et al., Assignment of the nuclear mitotic apparatus protein NuMA gene to human chromosome 11q13. Genomics, 1993.17: p. 222-224.

37. Tsutsui, H., K. Nakanishi, K. Matsui, K. Higashino, H. Okamura, Y. Miyazawa, and K. Kaneda. 1996. IFN- γ -inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones. J. Immunol. 157:3967-73 issn: 0022-1767.

38. Ushio, S., M. Namba, T. Okura, K. Hattori, Y. Nukada, K. Akita, F. Tanabe, K. Konishi, M. Micallef, M. Fujii, K. Torigoe, T. Tanimoto, S. Fukuda, M. Ikeda, H. Okamura, and M. Kurimoto. 1996. Cloning of the cDNA for human IFN- γ -inducing factor, expression in Escherichia coli, and studies on the biologic activities of the protein. J. Immunol. 156:4274-4279.34. Okayama, H. and Berg, P. (1983) A cDNA cloning vector that permits expression of cDNA inserts in mammalian cells. Mol. Cell. Biol. 3:280-289.

39. Yasuda, H., et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. Endocrinology, 1998. 139: p. 1329-1337.

Список последовательностей

```

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

<120> Белки, связывающие интерлейкин-18, их получение и применение

<130> IL-18 Rubinstein

<140>
<141>

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

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

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

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

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

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 1348
<212> ДНК
<213> человек

<400> 1
gagaagggga cgttgtcaca gataaaagac caggtccacc agctcccgac gcatgcata 60
tgaccatgag acasaactgg acaccagacc tcagcccttt gtgggtctcg ctccctgtgtg 120
ctccagctcgt cactctctctg gtcagagcca cactctctctc gcagaccacc acagctgcca 180
ctgcccagtg tagaagcaca aaggaccctt gccctcccca gcccccagtg ttcccagca 240
ctaaagcagtg tccagcattg gaagtaccct ggccagaggt ggaagtgcca ctgaaatgga 300
gctcgagctt atctctgtgt gctctgagcc gcttcccpaa ctccagcacc ctctactgac 360
tgggcaatgt ttctctcatt gagcaccctc cagggccact gtggaggggg agcaccagcc 420
ggaaactctg gagcaacaggt acgcagctgt gcaaggcctt ggtctggag cagctgacc 480
ctgcccctgca cagcaaccaac ttctctctgt tgctgtgga ccttgaacag gttgtccagc 540
gtccactgct cctggcccaag ctctctggctg ggtctgaggg aaccttgccc cccaccacaag 600
aaagccctgcc ctccagccac agcagctccac agcagcaggg ttaagactca gccaccagcc 660
agcagcagca caacctgac cagagctctg gctctacctg tctactctga gtagaacatc 720
ctcagctgcc tgcaggtctg gtagagcagc aacacacccc ctctctctct gcttgggtc 780
ccttctccca caaatcca actccattcc cactactcca gaaactcaac gctctctat 840
aatgctctct cctctgcca ttctctctcc acctatccat tagctctctt aactgctacc 900
tctctcaact gctctactgc tcaagaacca ccaagactgt tgatgcttta gcttgcact 960
ccaggccctt acctgcattt cccacatgac ttctctggaag cctcccaact atctctgctt 1020
ttccagaca cctcccaact ccatgtctct gctcatttag tcccgtcttc ctccaccgcc 1080
cagcagggga agctcaagc ctggttgaaa tgctgctctt tcagtgaaat catctctctt 1140
cagctctctc cgcattctgc agacttccca tctctgtgct gtagtctttt tttctccccc 1200
ttcaactcaa tggactgttc cagggaaagg atggggccac cagctgcttc ggatccaacc 1260
tgtatctgtg tcatccccc atgggcccct ataaaggatt attcaatgga aaaaaaaaaa 1320
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa 1348

<210> 2
<211> 192
<212> PRT Белок
<213> человек

<220>
<221> SIGNAL сигнальный пептид
<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

```



```

atcgcccat ttggagatg aagtgcagg aaataaagt actagccca atcacactg 6480
ctaggaaata tcagagctgg ggttagggcc catgtctct gactagtca gctcatcca 6540
cagctctctg tgctccctag tcaaaccttc caggccctct accatgttcc agaacttccc 6600
ccaaactctt ggtagcagg ggcaccctaa acacacaggt cccccctgt gtaccagggg 6660
ccccctctcc cctctcccca aacctccccc tcaagatgtg gaaacaagg caagggctgt 6720
cagctcttca ggcagctcca tgggcagcaa caatgcctct cagctgcatg gggcagctgt 6780
ggagggcaca gatgggctgc agcttcgcca cgttctctcc ctccacctg cacaggctca 6840
gtgctacgca tgyagaaga gctagccta gtcaggaggo agggatctaa tcttagacct 6900
gctttttct tcagaagtgc ccttaaccaa gtcactgccc tttttaagac ctctcagctt 6960
tcccactgta acatggactg gctgctcctc cctccctgtg cctgactgag tgcccagctg 7020
aaagatgccc ttgagagaa gtaggaattg ctgacctgtc gac 7063

```

```

<210> 6
<211> 197
<212> PRT белок
<213> Человек

```

```

<220>
<221> СИГНАЛЬНЫЙ ПЕПТИД
<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 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 Leu
180 185 190

```

```

Cys Gln Ser Ser Leu
195

```

```

<210> 7
<211> 1360
<212> ДНК
<213> человек

```

```

<400> 7
gccccccgt cgaccagca gctaaacaca gctaacttga gctttggagc tcttaaaggg 60
aagctctctg aaaggaaggc tcttcaggac ctcttaggag ccaaaagaaga ggaagtgttc 120
acagataaag agccagggctc accagctcctc gacgcatgca tcatgacctc gagacacaa 180
tggacaccaa acctcagccc ttgtgggttc ctgctctctg gteccacgt cgtcaactcc 240
ctggcagagc ccaacacctg ctgagagacc accacagctg ccaactgctc agttagaagc 300
acaaaggacc cctgcccctc ccaaccacca ggtttccagc cagctaagca gttatcaga 360
ttggaagtga cctggccaga ggtggaagt ccaactgaat gaactgtag ctatctctgt 420
gtggcctgca gccgcttccc caactcagc atctctact gctgggcaaa tggttccttc 480
atggcaccct tcccagggc actgtggagg gggagcacca gccgggaaag tgggagacca 540
ggctgggctg agggcaacct tgcaccacca ccaagaagcc ctgcccctca gccacagcag 600
tccacagcag caggyttaag actcagcaca gggccagcag cagcacaacc ttgaccagag 660
cttgggtctc acctgctcac ctggagtcaa cagtccctga ctgctctgag cgtctctgga 720
tgcgcaaac accccctctc tctctgtttt ggttcccttc tctccacaaa tccaactccc 780
attccacctc acctagaaaa tcaagccttc ctataatgc ctctccctcc tgcacttctc 840
tctccacctc tcaattagcc tctcaactgt cctactcttc acactgctct actgctcaga 900
aaccaccag actgtgtgat ccttagcctt gcactccag gcaactcctg cacttccacc 960
atgactttct ggaagcctcc caactatct tgcatttccc agacagctcc cactccatg 1020
tctctgctca tttagctcag tctctcacc cgcaccagca ggggaaagct caagctgtgt 1080
tgaatgctg cctctcagc gaagtctacc tcttccagct ctggccgcat tctgcaagct 1140
tctatctctc gtcctgtatg tttttttttt cccctctcac tcaactggac tgttcaagg 1200
aagggatggg ggaagcagct gcttcggatc caactgtat ctgctctcct cccacatggg 1260
tctctcaaa gqattatcca atggagggat cctgcaatct gctccattag gcttcagctc 1320
ctcccaccag aactttgctt gttcccagag ggaagtggg 1360

```

```

<210> 8
<211> 161
<212> белок
<213> человек

```

```

<220>
<221> СИГНАЛЬНЫЙ ПЕПТИД
<222> (1)..(28)

```

```

<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 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> 7912
<212> ДНК
<213> человек

```

```

gctcagccta cccccgggaa agatcttaata ctacccacta tagggcggga cagaattgat 60
ctctcagccta cctctcagct tctatcccca gctgccccty ggggtggcat gggggcagat 120

```

```

tagagatccc agtctggat cctctggaga gtaggagctc caggagctga aggtttctgt 180
ccactgaact ttgctaaag cagaggtgtc acagctgtct aagattccct ggtaaaaaag 240
tgaagtgaaa atagagggctc ggggcagctc ttcccagaa ggaattgctc gcatctgcc 300
ctcccagaaa gcagctctgt tctgaaagag agcacagctc cctctgtgta ctgggtgagt 360
ccatattctc tctttggctc tcaatttgc ctcccataa gaagggttaa gattgactca 420
gtaagcacc ttacaacct ttgtgtctc gagagctgg gttgggaagg attgtcact 480
gcccccccca gctctgttcc taagtgtgca aagagctcca gctatgctc cgggagagaa 540
agccagctac tgaggaaaa cagctactg aqaaaaagc ggaagctgtt accattctcc 600
tccccacctc tccaccagag aagagagctt gctcacactc aaagagccag gctcaccagc 660
tcttagccta gctatctga ccatgagaca caactggaca ccaagtaggc cttggggcta 720
cgatgggcca ggggggtag ggtgaggtct atgacagaa tggagcaatg ggtaaccgcc 780
gagcctccac tccaaagcaa accaccagc gcaactgtgt ctgtgtcttt aagaacctgt 840
gagatactg tagctctggc tccagctaaa agctctctgt tactctctgt aataaagggc 900
taagggctgg gtcgtgagg gctccctctc ccgctctgat tctctgtgta gaaccagac 960
atctctgggc tggagtaca tcttaccgc ggcagccacc tctgtctcca gaccgctga 1020
ctgttaactg tcttctctc agctccagc cctttgtggg tctgtctct gctgcccacc 1080
gtctcactc tctgtctcag agccacacct gctctcaga ccaaccagc tgcacctgcc 1140
tcaagttaga gcaaaaagga cccctgccc tcccagccc cagtgtccc agcagctaa 1200
cagctccag cattggagt gacctgcca gaggtggaag tgcactgag taagaagcac 1260
agtgtggag ggtggctat gggccagag gctcccagg tccgggtgac tctcagcgc 1320
cgtcccctt ctgcccagt accaccagc gagccagct ggtgagcag caccactct 1380
ccctcccaca cccagctca tgggtgcaag ctggccagc ctcccagat gctccctacc 1440
aaataggaca gagaactcaa gacataagta atggtcagc gactcccag agctttggt 1500
cagatggcc ccaagccag cctctccac cagaactgc tgcctctgt ccatctcaga 1560
ggagagcag ccatccaga ctgctctgt cactgggct ccaagctac cagagctgg 1620
cactagaaa ggtatctgt aggagacag tcaagaagag gattctcac gtaaccag 1680
gaccattct caacttccc gcttttagg ctgagggctc tggagacaa ctgcactct 1740
gtacagcag tcccacctc ggtggtgag agagcagtc cttagggctc aagtgcatgg 1800
ggactgggg gagctggag agagggcaca gacagcagc gtaggggag ggcctgctct 1860
tctgaaagc taactgctgc ctgtctctc agatggaac ctgagcttat cctgtgctgc 1920
ctgagcagc tcccacaact cagcatctc ctactggct ggcactggt cctctatga 1980
gcacctcca ggcagactg gggagggag caccaggtga ggtctcagc agccaggtg 2040
gtgggaagga agctctctg ggcctctca tgaacttcc tcccctcag ctcccagct 2100
gaagctgga gcaaggtac gcaactgtgc aagccttg tctggagca gctgacct 2160
gcctgcaca gcaaacact ctctctgtgt ctctggacc ctgaaacagt tctcagct 2220
caagtctct tggccagct ctgggtgag agcccagga gaggacctc gaaacagag 2280
gagctctct tccatagt ggggaaag ggtggctct gccagagca cctgtgact 2340
aagctccagc atctccag gtcagcaga caaaaagaa cttagctct ggcagagga 2400
ggtgtagct ggggcaagt gatgagatg cctctctc cttggctga tcttctct 2460
cttccactc ctaggctgg gctgaggyca accctgccc ccaccagaa agcctgccc 2520
tccagccaca gcactccca cagcagggc taagactcag caaggggccc cagcagcag 2580
aacctgccc agagctggg tctactctgt ctactctgag tgaacagctc ctgactgct 2640
gtagctgag tgaatgcca acacacccc tctctctgt cttgggtcc ctctctcag 2700
caattcaaa ctccattccc acctactag aaatcacag cctctctata atgctctc 2760
ctctgcatc tctctcca ctatctatt agctctata agctctact cctcactct 2820
ctcactgctc agaaacccc caaaatgtt gatgctcag cctgctcacc caggcccta 2880
ctccactccc cagtctctgt cctatttag cccgtctccc tccagcccc agcaggggaa 3000

```

```

cgctcaagcc tggttgaaat gctgcctctt cagtgaaatc atcctctctt agctctggcc 3060
gcattctgca gacttccat cctcgtgctg tatgttttt ttctccccc tcaactata 3120
ggactgttcc agggaaagga tgggggagc agctgctccg gatcccaact gatatctgtg 3180
caccoccaca tgggtcctca taaaagatta tcaaatggag gcatcctgac gctatcttcc 3240
ctagctctca gttccactcc cagaaacttt gctctgccca cggagggagt tgggagaagt 3300
ggactgccac acagaagctt aaacaacaac ctgcttcaag ggaacacagg cgttgaaa 3360
agaaagaga gaacagccca taatgctccc cgggagcaga gggcactaat ggagagtgg 3420
aagagcctgg aaagatgtgg cctcagaaa agggatgaga gaaaggaggt ggtatggaa 3480
actcagcagg aacaagtagt cctcaaaaga gcttatattc ctcttttcc cacaccgatc 3540
aagtcaactc agtactcaag ggaaaaaat agactttatt tacaagtaat aacatttaga 3600
aaagatccat ccccgccctc taaaacctt cccatcactc caaatccca cccagtgcaa 3660
gtctggggaa gtaggtgtgt gagctgctgc tgaaggctgt ccccaaaccc cactcctgag 3720
acacagggcc catccgtcct ggaaaagagc atcctctggc aggtgtctcc accaggtcag 3780
accagctcct ggaactcaag agtggggccc cctgctgggc ccagccacca ggacagcagg 3840
aaccagggcc tactcctctt atggtccctt ctatagccag aggctaagag gaagactggc 3900
caggcccagg gaccagacca tcaaaaccag cctcaaatct ggttgtgatg gagaagtgc 3960
ttgtcttaa gaaaaagga ggcaagtag ggagagcacc cacactgtcc atgctccagg 4020
acccttggcc cagctccagc aaggcgccag tgaagagca ggaaccaagg cagggtgccc 4080
cgagccatca ctgtctctag gggtttggct actgttggcc tgggagctga gagaagggcc 4140
tgaaggggag agtaggcgga gkaccagtg acggagcat cggggacaca ggtggggcca 4200
ctcactggta ctgccccttt agtctcttgc ctgaagaga cacagtcaca tggccagatg 4260
agaaactggg atactagcct gcaaccactg gctgggaa ga tctctctgct ctcccaagct 4320
cctgctggta tccccctctt tgtgagcccc aggttatca cttctggctt gtcctgago 4380
agctctgggt gctctccatg agaatggggc cactgtctct gctccctgg ajagggacta 4440
ccaggacagg gacacctctt accccaacc ccccaagcag cttggctggc cccactttgg 4500
atgctacttg tggggggcgt cggggggggt ccaatgctct catcgggttt cccctcccca 4560
tctctggcgt gctctacct tgccttggc tgaaggggtg gcaaccaatgg cggagctgac 4620
ggcgccctgt gctgtgggtg tggcaatgag cggagaacgg cgggttccca tggcaagtgt 4680
gggggaaagg ttggacaggg cctctcttga gctcccccgc cgcagaaggc tgtccctgag 4740
ctctctgggt ggtctgagga tgcgaaggc catcagctgg ccgcccctag cctgcaagga 4800
agggctgtca gaccggagat cccaatgctc cctcccaagg ccagcgtgtc gtgccactga 4860
gtaccagcaa ggtccgcca gggcgtctct tcatccccc tcaagcccaag cctcaactgt 4920
ttagtagaag ctggagctgc tttctctgct gctcagtag tgcctgttt ggcctctca 4980
gtctggcctc gggagctcat gggcgctggg aaacagctgg tggccctct agactatgga 5040
gaagagagca gtaggcaga gactagcaag agggatcaca tctgaagca ggtgtctgt 5100
cctctcagag ctgagtggac cttgtaagt aacgtgcaac ctgctccccc tcccaactct 5160
gggcacatc cttccctccc caacagttcc catccatggg tcaggccctt ggaagaggg 5220
aaagagaggg ggaagtagg gaagagaga gaagctccc tttagctctt gctgagctgg 5280
gctcagctgt agcagcagtg tgaagtaca cccaggaacc acccgccca cctcagaggt 5340
tccagggccc tgggtgggct ctgagggagc cggtttggc tgtctccggg tggtagtgc 5400
agtcgccctg gctatctgga ttgctgcat gctggctcag cgcagggctt cttgggggct 5460
tccagtttcc atctccatc ctgtgagtg gccagagctc agggaaaggt gcactgggtg 5520
aaagagtggt cagtgaccac tagctgatg gagatggagg aggacctggg gctgttccag 5580
aaactctaac tcccccagca cctatgtctg ggaaccttcc tgcctacag gtagaagac 5640
ccaaagccct tttctcttcc tgcctctacc ctaagccctg ggcaaatggc acaagcagtg 5700
cagctcagac cagattctct ctgagctccc tgcctaccce cagggaactc acccctgagt 5760
gccccagc tctctgttcc accctgaaac tgaagaagtc accccttccc ctctctggcc 5820
agtcagtgat ccaggggcct agctcagag ctatagcagc aggtgggatc ccaaggaagg 5880
gcagggatgg gaggccctgc acagtagccc caggccctac cctggaactc agggatagca 5940
ggctctcaga tgtggggggc acactcgatt gcgctgctgc agctctgcaa tggcgttcca 6000
gtcatccagg tctcagggct catctgggca agtgcctatg tagaagctgt tccctctgtg 6060
ggaagcaggg gaagtggaaa caaatgagcc tggagctggc aggtcaactc ctggcccctg 6120
catcttgcca gcttttggct ccaactacc cataaacttg aagcccggcb caccagctgt 6180
atcagtgccc gcaagtgtag gagtacggca cacagactat tctatctca tgggctctgt 6240
caccaccttc tccctggaga gggcagaaga gttcacagc agagactgct actactctt 6300
atcaccctgc caagcttgg tggccaacac ccagaggaac aaatagga ccgggaaata 6360
atcccaaggg gctcctggt gcccaagga caagagcttc caagagaggt ctggccagc 6420
tggccttcc agcagcccat caccgctgca gaagggctat gaggactccc cacagctaa 6480
tctcaaat gtctggaaa tcccggggcc ttaactctgg ctaagagtc ccccaacaca 6540
gccaagccct agatgggag gtaaggaag cctcagggct gcaagaaaga gggcgaggtg 6600
gagctggatg gtagcaagga tcccgccctt ggattttaa aaagcttcc ttttttccc 6660
gtgccagat ccacttcca gctcaatttt ggggtatagt aaagctctgt agtcccctca 6720
ctggaggggg ccccaactga caccocggcc tgggaacgac gaggcaaac gcgagtggtg 6780
ggcggttagc caggcaagct gaggagggct ggttggcat aatcgggag acccagagca 6840
gctagagact gagttagga ggtgctctgc aggttagctt cggtaagcag agcagaccgc 6900
gtgctgtag acgataggt gggcgtctgc ggtcttcca cctatagct ctggaagca 6960
gagtgaaact gttgagctg acagctccgt gcaactgaca gaagctccc atctccctcc 7020
gaaagccctca gatcccaag cacatccatg tattccaac tgccttgcaa aggtccttaa 7080
agtgctgtc tgaagaaat gggcctgtc gacagaagcc ctcaagaggt ggtgctgatg 7140
tctcaagac cctctcagc attttttcca tggagctctat ctaataatgt ttgagtagg 7200
gaatcgzag tgtttatcgg ccatttttgg agatgaagt caaagaata aagtgcactg 7260
ccccaaatca cactgtagg aagtctaga gctggggcta gcccactgt ctctgacta 7320
gtcagctca tcccagcc tctgctgccc ctcaagcaca acttccagg cccttaact 7380
gtccagaac tcccccaac tcttggtag cagggggac cctaacaca caggtcccc 7440
ctgctgccc agggggcccc tctccctccc tcccaaacct cccctcaag atgtggaac 7500
aaagcgaag gctcagacc tctcagggag tcaactggc agcaacaatg cctctcagct 7560
gcatggggca tgcctgggag cacagagtag gctcagctt cggccagctt tctccctca 7620
ccctgcacag gctcagctg acgatggag agaatgctag ccttagctag gaggcagga 7680
tctaatctca gcccctgctt tttctcaga agtgccctta accaagtcc tgcctcttt 7740
aaagccctcc agctttccca ctgcaacatg gactggctgc tcatccctcc ctgctcctga 7800
ctgagtgccc ag

```

```

<210> 10
<211> 40
<212> белок
<213> человек

```

```

<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

```

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный полипептид, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

(а) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из AA1-AA192 SEQ ID NO: 2, AA29-AA192 SEQ ID NO: 2, AA1-AA197 SEQ ID NO: 6 и AA29-AA197 SEQ ID NO: 6,

(б) мутина любой последовательности, указанной в подпункте (а), где аминокислотная последовательность указанного мутеина обладает, по крайней мере, 70%-й идентичностью, по крайней мере, с одной последовательностью, указанной в подпункте (а);

где полипептид, охарактеризованный в подпункте (а) или (б), связывается с IL-18.

2. Полипептид по п.1, где любые изменения аминокислотной последовательности мутеина, охарактеризованного в подпункте (б) п.1, представляют собой аминокислотные замены в аминокислотных последовательностях, охарактеризованных в подпункте (а) п.1.

3. Полипептид по п.1, где аминокислотная последовательность содержит AA1-AA192 SEQ ID NO: 2 или AA29-AA192 SEQ ID NO: 2.

4. Полипептид по п.1, где полипептид гликозилирован в одном или нескольких положениях.

5. Полипептид по п.1, где полипептид негликозилирован.

6. Полипептид по п.1, где полипептид дополнительно содержит, по крайней мере, один радикал, присоединенный к одной или нескольким функциональным группам, которые являются одной или несколькими боковыми цепями аминокислотных остатков N- или C-концевых групп.

7. Полипептид по п.1, где полипептид пертерпел циклическую перестановку.

8. Полипептид по п.1, где полипептид представляет собой невирусный белок.

9. Полипептид по п.1, где полипептид представляет собой человеческий белок.

10. Полипептид по п.1, где полипептид представляет собой слитый белок.

11. Полипептид по п.10, где полипептид содержит Ig.

12. Полипептид по п.1 или 10, где полипептид является растворимым.

13. Полипептид по п.1, где полипептид модифицирован ПЭГ.

14. Полипептид по п.6, где указанный, по крайней мере, один радикал представляет собой полиэтиленгликолевый радикал.

15. Выделенный полипептид, включающий аминокислотную последовательность AA1-192 SEQ ID NO: 2 или AA29-AA192 SEQ ID NO: 2 или их варианты, содержащие консервативные аминокислотные замены.

16. Выделенный полипептид, включающий аминокислотную последовательность AA1-112 SEQ ID NO: 4 или AA29-AA112 SEQ ID NO: 4 или их варианты, содержащие консервативные аминокислотные замены.

17. Выделенный полипептид, включающий аминокислотную последовательность AA1-197 SEQ ID NO: 6 или AA29-AA197 SEQ ID NO: 6 или их варианты, содержащие консервативные аминокислотные замены.

18. Выделенный полипептид, включающий аминокислотную последовательность AA1-161 SEQ ID NO: 8 или AA29-AA161 SEQ ID NO: 8 или их варианты, содержащие консервативные аминокислотные замены.

19. Выделенный полипептид, который включает аминокислотную последовательность AA29-40 SEQ ID NO: 10 или AA1-AA40 SEQ ID NO: 10, где полипептид связывается с IL-18 и модулирует или блокирует биологическую активность IL-18.

20. Полипептид по п.19, где полипептид содержит Ig-домен.

21. Очищенный IL-18-связывающий белок (IL-18BP), где белок характеризуется следующим:

(a) белок обладает молекулярной массой приблизительно 40 кДа по данным ДСН-ЭПАГ в исходной гликозилированной форме;

(b) белок связывается с IL-18 и модулирует или блокирует активность IL-18 и

(c) белок обладает N-концевой последовательностью, которая включает аминокислотную последовательность AA29-40 SEQ ID NO: 10 или AA1-AA40 SEQ ID NO: 10 или их варианты, содержащие консервативные аминокислотные замены.

22. Активный фрагмент белка IL-18BP по п.1 или 21, где активный фрагмент связывается с IL-18 и модулирует или блокирует активность IL-18.

23. Выделенный полипептид IL-18BP, обладающий N-концевой последовательностью, которая включает аминокислотную последовательность AA29-40 SEQ ID NO: 10 или AA1-AA40 SEQ ID NO: 10 или их варианты, содержащие консервативные аминокислотные замены, и Ig-домен, где полипептид связывается с IL-18 и модулирует или блокирует активность IL-18.

24. Смесь любых полипептидов, охарактеризованных в пп.1, 15-19, 21 и 22.

25. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

(a) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из AA1-AA192 SEQ ID NO: 2, AA29-AA192 SEQ ID NO: 2, AA1-AA112 SEQ ID NO: 4, AA29-AA112 SEQ ID NO: 4, AA1-AA197 SEQ ID NO: 6, AA29-AA197 SEQ ID NO: 6, AA1-AA161 SEQ ID NO: 8 и AA29-AA161 SEQ ID NO: 8,

(b) мутеина любой последовательности, указанной в подпункте (a), где аминокислотная последовательность указанного мутеина обла-

дает, по крайней мере, 70% идентичностью, по крайней мере, с одной последовательностью, указанной в подпункте (a).

26. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

(a) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, кодирующей AA1-AA192 SEQ ID NO: 2 или AA29-AA192 SEQ ID NO: 2;

(b) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3, кодирующей AA1-AA112 SEQ ID NO: 4 или AA29-AA112 SEQ ID NO: 4;

(c) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5, кодирующей AA1-AA197 SEQ ID NO: 6 или AA29-AA197 SEQ ID NO: 6;

(d) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 7, кодирующей AA1-AA161 SEQ ID NO: 8 или AA29-AA161 SEQ ID NO: 8;

(e) нуклеотидной последовательности, комплемент которой связывается в условиях высокой жесткости с любой из нуклеотидных последовательностей, охарактеризованных в подпунктах (a)-(d), и которая кодирует аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из AA1-AA192 SEQ ID NO: 2, AA29-AA192 SEQ ID NO: 2, AA1-AA112 SEQ ID NO: 4, AA29-AA112 SEQ ID NO: 4, AA1-AA197 SEQ ID NO: 6, AA29-AA197 SEQ ID NO: 6, AA1-AA161 SEQ ID NO: 8 и AA29-AA161 SEQ ID NO: 8.

27. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 9 или нуклеотидную последовательность, комплемент которой связывается с ней в условиях высокой жесткости.

28. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7, или область SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7, кодирующую зрелый белок.

29. Способ определения, выделения или амплификации нуклеотидной последовательности, кодирующей IL-18BP, предусматривающий применение нуклеиновых кислот, охарактеризованных в любом из пп.25-28, в качестве праймера или зонда.

30. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, охарактеризованную в любом из пп.25-28.

31. Вектор по п.30, дополнительно содержащий промотор, оперативно связанный с указанной молекулой нуклеиновой кислоты.

32. Штамм эукариотических клеток, генетически модифицированных для продуцирования полипептида, охарактеризованного в любом из пп.1-23.

33. Штамм прокариотических клеток, генетически модифицированных для продуцирования полипептида, охарактеризованного в любом из пп.1-23.

34. Штамм по п.32 или 33, где клетки генетически модифицированы вектором по п.30.

35. Штамм по п.32, где клетки представляют собой клетки млекопитающего.

36. Способ получения полипептида, охарактеризованного в любом из пп.1-23, предусматривающий культивирование штамма клеток, охарактеризованного в любом из пп.32-35, в условиях, обеспечивающих экспрессию указанного полипептида.

37. Моноклональное антитело, иммуноспецифично связывающееся с полипептидом, охарактеризованным в любом из пп.1-23.

38. Антитело по п.37, где антитело представляет собой гуманизированное антитело.

39. Способ определения IL-18BP в образце, предусматривающий взаимодействие указанного образца с антителом, охарактеризованным в п.37, и дальнейшее определение наличия связанного антитела.

40. Способ очистки полипептида IL-18BP, предусматривающий взаимодействие образца IL-18BP с антителом против IL-18BP, охарактеризованным в п.37, удаление несвязавшегося белка из образца с последующей элюцией связанного IL-18BP.

41. Способ выделения или очистки IL-18BP, охарактеризованного в любом из пп.1-23, предусматривающий

(а) пропускание образца через хроматографическую колонку, с которой связывается IL-18;

(б) промывание колонки для удаления несвязавшегося белка из образца и

(с) элюцию связанного IL-18BP.

42. Способ выделения или очистки IL-18BP, охарактеризованного в любом из пп.1-23, предусматривающий взаимодействие образца с субстратом, с которым связан IL-18, удаление несвязавшегося белка из образца с последующей элюцией связанного IL-18BP.

43. Способ получения производного IL-18BP, предусматривающий получение ДНК-конструкта, который кодирует полипептид, охарактеризованный в любом из пп.1, 15-19 и 21-23, лигированный с нуклеиновой кислотой, кодирующей второй полипептид, где при экспрессии указанный ДНК-конструкт кодирует слитый белок, содержащий полипептид, охарактеризованный в любом из пп.1, 15-19 и 21-23, слитый со вторым полипептидом.

44. Способ по п.43, где указанным вторым полипептидом является Ig.

45. Способ получения производного IL-18BP, предусматривающий химическую модификацию полипептида, охарактеризованного в любом из пп.1 и 15-19, с включением, по крайней мере, одного модифицирующего радикала.

46. Способ по п.45, где модифицирующий радикал представляет собой полиэтиленгликолевый радикал.

47. Композиция, содержащая полипептиды, охарактеризованные в любом из пп.1-24, и фармацевтически приемлемый носитель.

48. Композиция, содержащая нуклеиновую кислоту, охарактеризованную в любом из пп.25-28, и фармацевтически приемлемый носитель.

49. Композиция, содержащая антитело, охарактеризованное в п.37 или 38, и фармацевтически приемлемый носитель.

50. Набор, содержащий в одном или нескольких сосудах фармацевтическую композицию, охарактеризованную в п.47.

51. Набор, содержащий в одном или нескольких сосудах фармацевтическую композицию, охарактеризованную в п.48.

52. Набор, содержащий в одном или нескольких сосудах фармацевтическую композицию, охарактеризованную в п.49.

53. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, включающая нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

(а) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из AA1-AA192 SEQ ID NO: 2, AA29-AA192 SEQ ID NO: 2, AA1-AA197 SEQ ID NO: 6 и AA29-AA197 SEQ ID NO: 6;

(б) мутеина любой последовательности, указанной в подпункте (а), где аминокислотная последовательность указанного мутеина обладает, по крайней мере, 70% идентичностью, по крайней мере, с одной последовательностью, указанной в подпункте (а);

где указанная молекула нуклеиновой кислоты кодирует полипептид, который связывается с IL-18.

54. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, включающая нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

(а) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, кодирующей AA1-AA192 SEQ ID NO: 2 или AA29-AA192 SEQ ID NO: 2;

(б) нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5, кодирующей AA1-AA197 SEQ ID NO: 6 или AA29-AA197 SEQ ID NO: 6;

(с) нуклеотидной последовательности, комплемент которой связывается в условиях высокой жесткости с любой из нуклеотидных последовательностей, охарактеризованных в подпунктах (а)-(б);

где указанная нуклеиновая кислота кодирует полипептид, который связывается с IL-18.

55. Рекомбинантная молекула ДНК, включающая молекулу нуклеиновой кислоты, охарактеризованную в п.53 или 54, лигированную со второй нуклеиновой кислотой, кодирующей второй полипептид, где при экспрессии указанная рекомбинантная молекула ДНК кодирует слитый белок, содержащий полипептид, охарактеризованный в любом из пп.1, 15-19 и 21-23, слитый со вторым полипептидом.

56. Применение IL-18BP по любому из пп.1-24 для производства лекарственного сред-

ства для лечения и/или предупреждения поражения печени.

57. Применение по п.56, где поражение печени является острым.

58. Применение по п.56, где поражение печени является хроническим.

59. Применение по любому из пп.56-58, где поражение печени представляет собой алкогольный гепатит, вирусный гепатит, иммунный гепатит, фульминативный гепатит, цирроз печени и первичный билиарный цирроз печени.

60. Применение по п.59, где поражение печени представляет собой фульминативный гепатит.

61. Применение IL-18BP по любому из пп.1-24 для производства лекарственного средства для лечения и/или предупреждения артрита.

62. Применение по п.61, где артрит представляет собой воспалительный артрит.

63. Применение по п.62, где воспалительный артрит представляет собой ревматоидный артрит.

64. Применение IL-18BP по любому из пп.1-24 для производства лекарственного средства для лечения и/или предупреждения деструкции хряща.

65. Применение IL-18BP по любому из пп.1-24 для производства лекарственного средства для лечения и/или предупреждения воспалительного заболевания кишечника.

66. Применение по п.65, где воспалительное заболевание кишечника представляет собой болезнь Крона.

67. Применение по п.65, где воспалительное заболевание кишечника представляет собой неспецифический язвенный колит.

68. Применение по любому из пп.56-67, где указанное лекарственное средство предназначено для подкожного введения.

69. Применение по любому из пп.56-67, где указанное лекарственное средство предназначено для внутримышечного введения.

70. Применение по любому из пп.56-69, где указанное лекарственное средство назначается ежедневно.

71. Применение по любому из пп.56-69, где указанное лекарственное средство назначается через день.

72. Применение вектора по п.30 или 31 для производства лекарственного средства для лечения и/или предупреждения поражения печени.

73. Применение вектора по п.30 или 31 для производства лекарственного средства для лечения и/или предупреждения артрита.

74. Применение вектора по п.30 или 31 для производства лекарственного средства для лечения и/или предупреждения воспалительного заболевания кишечника.

75. Применение по любому из пп.72-74 для генной терапии.

76. Применение вектора по п.30 или 31 для индукции и/или увеличения эндогенной продукции IL-18BP в клетке для производства лекарственного средства для лечения и/или предупреждения поражения печени.

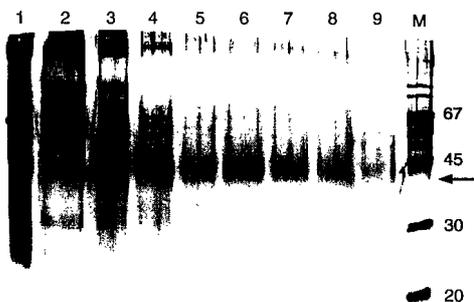
77. Применение вектора по п.30 или 31 для индукции и/или увеличения эндогенной продукции IL-18BP в клетке для производства лекарственного средства для лечения и/или предупреждения артрита.

78. Применение вектора по п.30 или 31 для индукции и/или увеличения эндогенной продукции IL-18BP в клетке для производства лекарственного средства для лечения и/или предупреждения воспалительного заболевания кишечника.

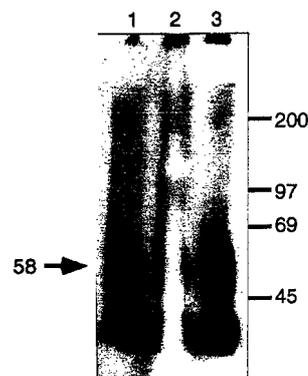
79. Использование штамма клеток по любому из пп.32-35 для производства лекарственного средства для лечения и/или предупреждения поражения печени.

80. Использование штамма клеток по любому из пп.32-35 для производства лекарственного средства для лечения и/или предупреждения артрита.

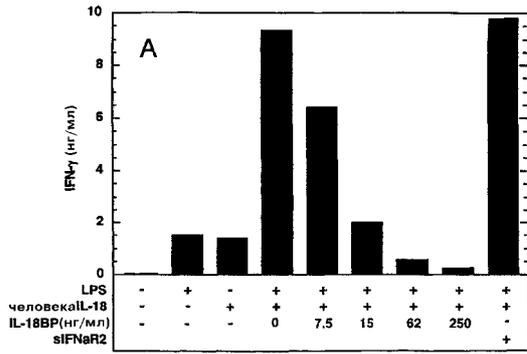
81. Использование штамма клеток по любому из пп.32-35 для производства лекарственного средства для лечения и/или предупреждения воспалительного заболевания кишечника.



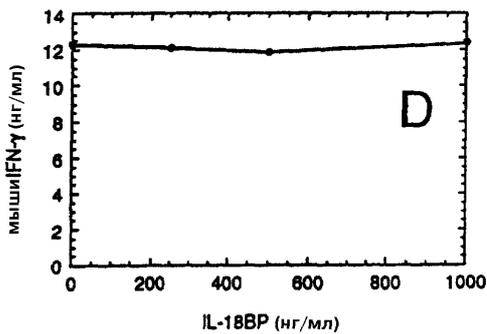
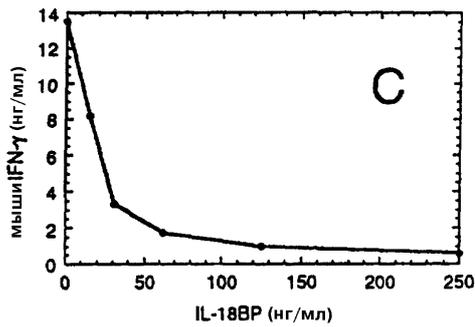
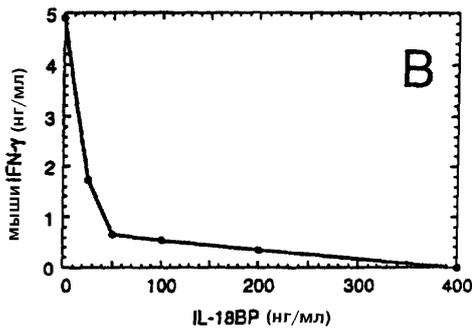
Фиг. 1



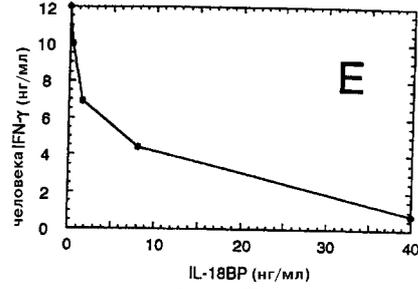
Фиг. 2



Фиг. 3а



Фиг. 3В-Д



Фиг. 3Е

IL-18Вра, последовательность ДНК:

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

```

1 GAGAAGAGGA CGTTGTCACA GATAAAGAGC CAGGCTCACC AGCTCCTGAC
51 GCATGCATCA TGACCATGAG ACASAАСТGG ACACСAGACC TCAGCCSTTT
101 GTGGGTCCTG CTCCTGTGTG CCCACGTCGT CACTCTCCTG GTCAGAGCCA
151 CACTGTCTC GCAGACCACC ACAGCTGCCA CTGCCCTAGT TAGAAGCACA
201 AAGGACCCCT GCCCCTCCCA GCCCCCAGTG TTCСCAGCAG СТАAGCAGTG
251 TCCAGCATTG GAAGTGACCT GGCCAGAGGT GGAAGTGCCA CTGAATGGAA
301 CGCTGAGCTT ATCCTGTGTG GCCTGCAGCC GCTTCCСCАА CTTСAGCATC
351 CTCTACTGGC TGGGCAATGG TTCCTTCATT GAGCACCTCC CAGGCCGACT
401 GTGGGAGGGG AGCACCAGCC GGGAACTGG GAGCAGAGGT ACGCAGCTGT
451 GСAAGGCTT GGTGCTGGAG CAGTGACCC CTGCCCTGCA CAGCACCАAC
501 TTCTCCTGTG TGCTCGTGGA CССТGAACAG GTTGCCAGC GTCAGCTCGT
551 CCTGGCCСAG CTCTGGGCTG GGCTGAGGGC AACCTTGCCС CCCACCСAAG
601 AAGCCCTGCC CTCCAGCCAC AGCAGTCCAC AGCAGCAGGG TTAAGACTCA
651 GCACAGGGCC AGCAGCAGCA CAACTTGAC CAGAGCTGG GTCCTACTCG
701 TCTACTGGA GTGAACAGTC CСTGACTGCC TGTAGGCTGC GTGGATGGCC
751 AACACACCCC CTCCTCTCT GCTTGGGTC CTTCTCTCA CСAAATTCАА
801 ACTCCATTCC CACTACCTA GAAАATCACA GCCTCCTTAT AATGCCCTCT
851 CCTCCTGCCA TTCTCTCTCC ACCTATCCAT TAGCCTTCST AACGTCTAC
901 TCCTCACACT GCTCTACTGC TCAGAAACCA CСAAGACTGT TGATGCCTTA
951 GCCTTGCACT CCAGGGCCCT ACCTGCATT CCCACATGAC TTCTGGAAG
1001 CCTCCCAACT ATTCTTGCTT TTCСCAGACA GTCСCСACTC CСATGTCTCT
1051 GCTCATTAG TCCCGTCTC CTCACC GCCC CAGCAGGGGA ACGCTCAAGC
1101 CTGGTTGAAA TGCTGCCTCT TCAGTGAAGT CATCCTCTTT CAGCTCTGGC
1151 CGCATTCTGC AGACTTCCTA TCTCGTGCT GTATGTTTT TTTTCCСCC
1201 TTCACCTAA TGGACTGTT CAGGGAAGGG ATGGGGCAC CAGCTGCTTC

```

Фиг. 4

```

1251 GGATCCACAC TGATCTGTG TCATCCСCAC ATGGGTCCTC ATAAAGGATT
1301 ATTCAATGGA АAAAAAAAAA АAAAAAAAAA АAAAAAAAAA АAAAAAAAAA

```

(SEQ ID NO:1)

IL-18Вра; белковая последовательность:

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

```

1 MRHNWTPDLS PLWVLLCAH VVTLLVRATP VSQTTAATA SVRSTKDPСP
51 SQPPVFPAAK QCPALEVTWP EVEVPLNGTL SLSCVACSRF PNFСILYWLG
101 NGSFIEHLPG RLWEGSTRE RGSTGTQLCK ALVLEQLTPA LHSTNFСCVL
151 VDPEQVQRH VVLAQLWAGL RATLPPTQEA LPSSHSPQQ QG

```

(SEQ ID NO:2)

Фиг. 4А

IL-18BPb; последовательность ДНК

Длина: 1038 June 19, 1998 14:10 Type: N Check: 8005 ..

1 GAGAAGAGGA CGTGTTCACA GATAAAGAGC CAGGTCACC AGCTCCTGAC
51 GCATGCATCA TGACCATGAG ACASAACTGG ACACCAGACC TCAGCCCTTT
101 GTGGGTCCTG TCCTGTGTG CCCAGTGTG CACTCTCTG GTCAGAGCCA
151 SACCTGTCTC GCAGACCACC ACAGCTGCCA CTGCCTCAGT TAGAAGCACA
201 AAGGACCCCT GCCCCTCCCA GCCCCAGTG TCCCAAGCAG CTAAGCAATG
251 TCCAGCAATG GAAAGTACCT GCCCAGAGGT GGAAGTGCCA CTGAGCTGGG
301 CTGAGGGCAA CCTTGCCCCC SACCCAGAA GCCCTGCCCT CCAGCCACAG
351 CAGTCCACAG CAGCAGGGTT AAGACTCAGC ACAGGGCCAG CAGCAGCACA
401 ACSTTGACCA GAGCTTGGGT CTAACCTGTC TACCTGGAGT GAACAGTCCC
451 TGACTGCCTG TAGGCTGCTG GGATGGCAGC ACACCCCTCC CTTCTCTGTC
501 TTTGGGTCCC TTCTCTCACC AAATTCACAA TCATTCCCA CCTACCTAGA
551 AAATCAGACG CTCCTTATAA TGCCCTCTCC TCTGCTCATT CTCTCTCCAC
601 CTATCCATTA GCCTCTCTAA CGTCTACTC CTCACACTGC TCTACTGCTC
651 AGAAACCACC AAGACTGTTG ATGCCTTAGC CTTGCACTCC AGGGCCCTAC
701 CTGCATTTCC CACATGACTT TCTGGAAGCC TCCCAACTAT TCTTGCTTTT
751 CCCAGACAGC TCCCACTCCC ATGTCTCTGC TCATTTAGTC CCGTCTTCTC
801 CACCGCCCA GCAGGGGAAAC GCTCAAGCCT GGTGAAATG CTGCTCTTCC
851 AGTGAAGTCA TCCTCTTCA GCTCTGGCCG CATTCTGAG ACTTCTATC
901 TTCGTGCTGT ATGTTTTTTT TTCCCCCTT CACTCTAATG GACTGTTCCA
951 GGGAAAGGAT GGGGCCACCA GCTGCTCGG ATCCACACTG TATCTGTGTC
1001 ATCCCCACAT GGGTCTCAT AAAGGATAT TCAATGGA

(SEQ ID NO:3)

Фиг. 5

человек IL-18BPb
клон-м7
пептид

1 MRHNWTPD LSPLVLLLC AHVVTLLVRA TPVSTTTAA TASVRSKDP
49 CPSQPPVFP AAKQPALEVT WPEVEVPLSW AEGNLAPHPR SPALPQQST
99 AAGLRLSTGP AAAQP*

(SEQ ID NO:4)

Фиг. 5A

IL-18BPc человека, последовательность, длина 7063 July 16, 1998 19:47 Type: N Check: 9314 ..

1 GAATTCGCGG CCGCGTGCAC GCCAGAGGGG CTAGGATGAG AGACAGAGGG
51 TGTGATGGTG GGTGCTGGGA AATGTACCCG ACCTTGGGGC TGGTGGCTGG
101 GGGAGTGGGT AGCCTGGGAA AGGCCAGGAT GTGACGGGAC TGGTATGGCA
151 TTGAGCCTGA AGTGTGCCAA CTTGGGGTTC CCCAGTGCCT AGGAAAGTTG
201 TCCCTTGAA TGTCAAGTGT AAGGTGAAGG AGGAAGCAGA TGCCTGTTC
251 TATGAAACA AAGACTGGC TGTGAAGAGG GGAGGGCGAC ACCAAAGTCC
301 TGACACTTGG GCGGGACAGA ATTGATCTGT GAGAGACTCA TCTAGTTCAT
351 ACCCTAGGTG ACCCTGGGGG TGGCATGGGG GTAGATTAGA GATCCAGATC
401 TGGTATCCTC TGGAGAGTAG GAGTCCSAGG AGCTGAAGGT TTCTGGCCAC
451 TGAACCTTGG CTAAGAGCAGA GGTGTACAG CTGCTCAAGA TTCCTGGTT
501 AAAAAGTGA AGTGAATAG AGGGTCGGGG CAGTGTCTTC CCAGAAGGAT
551 TGCTCGGAT CCTGCCCTTC CCAGAAGCAG CTCTGTGCT GAAGAGAGCA
601 CTGCCCTCCT GTGTGACTGG GTGAGTCCAT ATTCTCTCT TGGGTCTCAA
651 TTTTGCCTC CTAATGAAG GGGTAAGATT GCACTAGGTA AGCATCTTAC
701 AACCATTTGT GGTGATGAGA GCTGGGTGG GGAAGGATTG TCACTTGACC
751 CCCCAGCTC TGTTCSTAAG TGCTGAAAGA GCTCCAGGCT ATGCTACGGG
801 AGGAGAAAGC AGCTACTGAG GAAAGCCAG CTAAGAGAA AAAAGCGGGAG
851 TGGTTTACCA TTCTCTCCC CCACCTTTCA CCAGAGAAGA GGACGTTGTC
901 ACACATAAAG AGCCAGGCTC ACCAGCTCCT GACGATGCA TCATGACCAT
951 GAGACACAAC TGGACACCAG ACCTCAGCCC TTTGTGGGTC CTGCTCTGT
1001 GTGCCACGT CGTCACTCTC CTGGTCAGAG CCACACCTGT CTCGACAGCC
1051 ACCACAGCTG CCACTGCCTC AGTTAGAAGC ACAAGGACC CCTGCCCTC
1101 CCAGCCCCCA GTGTCCAGC CAGCTAAGCA GTGTCCAGCA TTGGAAGTGA
1151 CCTGGCCAGA GGTGGAAGTG CCACTGAATG GAACGCTGAG CTATCTCTGT
1201 GTGGCTGCA GCGCTTCCC CAACTCAGC ATCTCTACT GGCTGGGCAA

Фиг. 6

1251 TGGTTCCTTC ATTGAGCACC TCCCAGGCCG ACTGTGGGAG GGGAGCACCA
1301 CCGGGAAACG TGGGAGCACA GGTACGCAGC TGTGCAAGGC CTTGTGCTG
1351 GAGCAGCTGA CCCCTGCCCT GCACAGCACC AACCTCTCCT GTGTGCTGCT
1401 GGACCTGAA CAGGTTGTCC AGCCTCACGT CGTCTGGCC CAGCTCTGGG
1451 TGAGGAGCCC AAGGAGAGGC CTCAGGAAC AGGAGGAGCT CTGCTTCCAT
1501 ATGTGGGGAG GAAAGGTTGG GCTCTGCCAG AGCAGCCTGT GAACTAATGC
1551 CCAGCATTC CTAAGGTGAG CCAGACAAAA AGGAACTTAG GTCTTGGGCA
1601 GAGGAGGTGT AGCCTGGGCC AAAGTGATGA GATGTCCCTC CTTTCTTGG
1651 CCTGATCCTT GTCTGCCTC ACTTCCCTAG GCTGGGCTGA GGGCAACCTT
1701 GCCCCCCACC CAAGAAGCCC TGCCCTCCAG CCACAGCAGT CCACAGCAGC
1751 AGGGTAAAG CTCAGCAGAG GGCAGCAGC AGCACAACCT TGACCAGAGC
1801 TTGGGTCTA CCGTGTACC TGGAGTGAAC AGTCCCTGAC TGCTGTAGG
1851 CTGCGTGGAT GCGCAACACA CCCCTCCTT CTCTGCTTTG GGTCCCTTCT
1901 CTCACCAAAT TCAAATCCA TCCCACCTA CCTAGAAAA CACAGCCTCC
1951 TTATAATGCC TCCCTCCTC GCCATCTCT CTCCACCTAT CCATTAGCCT
2001 TCCTAACGTC CTAAGCTCA CACTGCTCTA CTGCTCAGAA ACCACCAAGA
2051 CTGTGATGC CTTAGCCTTG CACTCCAGGG CCTACCTGCT ATTTCCCA
2101 TGACTTCTG GAAGCTCCC AACTATTCTT GCTTTCCCA GACAGCTCCC
2151 ACTCCCATGT CTCTGCTCAT TTAGTCCCGT CTTCTCACC GCCCAGCAG
2201 GGGAAAGCCT AAGCCTGTTT GAAATGCTGC CTCTCAGTG AAGTATCCT
2251 CTTTCAGCTC TGGCCGATT CTGCAGACTT CCTATCTCG TCCTGTATGT
2301 TTTTTTTTTC CCCCTTCACT CTAATGGACT GTTCCAGGGA AGGGATGGGG
2351 GCAGCAGCTG CTTCCGATCC ACAGTGTATC TGTGTATCC CCACATGGGT
2401 CCTCATAAAG GATTATTCAA TGGAGGCATC CTGACATCTG TCACTTAGG
2451 CTTCACTTCC ACTCCAGGA ACTTGCCTG TCCCAGCAGG GAGTATGGGA
2501 GAGATGGACT GCCACACAGA AGCTGAAGAC AACACCTGCT TCAGGGGAAAC

Фиг. 6A

2551 ACAGGCGCTT GAAAAAGAAA AGAGAGAACA GCCCATAATG CTCGCCGGGA
2601 GCAGAGGCCA CTAATGGAGA GTGGGAAGAG CCTGGAAAGA TGTGGCCTCA
2651 GGAAGAGGGA TGAGAGAAAG GAGGTGGTAT GGAAGACTCA GCAGGAACAA
2701 GGTAGGCTTC AAAGAGCCTA TATTCCTCTT TTTCCACAC CGATCAAGTC
2751 AACTCAGTAC TCACGGGAGA AAAATAGACT TTAATTTACA GTAATAACAT
2801 TTAGAAAAGA TCCATCCCCG GCCCTAAAA ACCTTCCCAT CACTCCTAAT
2851 CCCACCCAGC TGCAAGTCTG GGAAGGTAG GGTGTGAGCT GCTGCTGAA
2901 GCTGTCCCCC AACCCACTC CTGAGACACA GGGCCCATCC GTCTGGGAA
2951 AGAGCATCCT CTGGCAGGTG TCCCACCAGC GTCAGACCCA GTCTGGACT
3001 TCAAGAGTGA GGGCCCTGC TGGGCCAGC CACCAGGACA GCAGGAACCA
3051 GGGCCTACTC CTCTTATGGT CCCTTCTAGA TCCAGAGGCT AAGAGGAAGA
3101 CTGGCCAGGC CCAAGGACCC AGCCATCAA ACCAGCCTCA AATCTGGTTG
3151 TGATGGAGAA GTGACTTTGC TTTAAGAAAA AAGGAGGCAA GGTAGGGAGA
3201 GCGCCACAC TGTCCATGCT CCAAGCCCCC TGGGCCAGCT CCGAGAAGGC
3251 GCCAGTGAAG GACCAGGGAC CAGGCCAGGG TCGGGCAGG CATCACTGT
3301 TCTAGGGGTT TGGCTACTGT TGGCTGGGA GCTGAGAGAA GGCAGTGA
3351 GGGACAGTAG GCGGAGGACC AGGTGACGGC AGCATCGGG ACACAGGTTG
3401 GGCCACTCAC TGGTACTGGC CTTTAGTGC TTTGCCTGAA AGAGACACAG
3451 TCACATGGCC AGATGAGAAC TTGCGTACT AGCCTGCACC CACTGGCTGG
3501 GAAGATCTCT TCTGTCTCCC ACGCCCTGT CTGGATCCCC TCCCTTGTGA
3551 GCCCCAGGGT TATCAGTTGC TGGCTGTGCC TGAGCAGCTC TGGGTGCTCT
3601 CCATGAGAAT GGGGCCATCT GTCTTCTCT CTTGGAGAGG AGTACCAGG
3651 ACAGGGACAC CTCTTACCCC ACACCTCCA GCAGCCTGGC GTGGCCCAT
3701 CTTGGATGCT ACTTGGTGGG GCGGTCTGGG GGTGCCCCAT GCTCTCATCG
3751 GGTTCCTCCT CCCCATCCTG CCAATGCCTC TACCTTGCCT TTGGCTCGAG
3801 GGGTGGCACC AATGGCGGCA GCAGTGGCGG CGTGGCTGT GGTGTGGCA

Фиг. 6B

3851 ATGCGCGGAG AACGGCGGGT TCCACTGCGA GTGTTGGGGG AAGCCTTGA
3901 CAGGGCCTTC TTTGAGGCTC CCCGCCGAC AAGGCTGTTT CTAAGTTCT
3951 TGGGTGTGTT GAGGATGCTG AAGGCCATCG ACTGGCGCCG GTCAGCCTGC
4001 AAGGAAGGGC TGTCAGACCG GGAGACCCAA TGCTGCCTTC CCAGGCCAGC
4051 GTGCTGTGCC ACGCTGTACC AGCAAGTCC CGCCAGGGCG TCGTTTCATC
4101 CCCCTTCAGC CCCAGCCTCA CCTGTTTAGT AGAAGCTGGA GCTGCTTCT
4151 TCTGGGCTC AGTAGTCTC TGTTCGCGC CTTCATGTCG GTCTCGGGGA
4201 GTCATGGGGC GTGGAAACA GCTGTGGGCC TTCTTAGACT ATGGAGAAGA
4251 GGACAGTTAG GCAGACAGTA GCAAGAGGAG TCACATCTGA AGCCAGGTGT
4301 CTTGTCCTCT CAGAGCTGAG TGGACCTTG AAGTCAACGT GCAACTGTCT
4351 CCCCTTCCA ACTCTGGGCC AGATCCTTCC TTCCCAACA GTTCCCATCC
4401 ATGGGTCAGG CCTTGGAGA GAGGAAAGA GAGGGGAAG TGAGGGAAGG
4451 AGAGAGAAGG CTCCTTTAG TCCTTGGTGA GCTGGGCTG ACCTGAGCAC
4501 AGTGCTGGAG TAACACCCAG GAGCCACCGC GCCTACCTCA GGAGTCCAG
4551 GGCCCTGGTG GGGCTTAGG GAGACCCGTT TCGCTGCTG CCGGTGGTG
4601 ATGCCAGTGC CTTGGGCTA CTGGATTGG TGCATGCTG CTCGGCGCAG
4651 GGTCTCTGG GGGTCTCCAG TTTTATCTC CTCATCTGTG ATGGTGCCA
4701 GGCTCAGGA AGGCTGCATG GTGGGAAGAG GTGGTCAGTG GACCATAGCT
4751 GTATGGAGAT GGAGGAGGAC CTGGGCTGT TCCAGAACTC TACACTGCC
4801 CGACACTTAT GGTGGGAGC CTCTGCTC ACGAGGTAGA AAGACACAAG
4851 CCTCTTCC TGTTCTGCTT TCACTAAG CCCTGGCAA ATGGACAAG
4901 CAGTGCAGTC CTGACCAGAT TCTCTCTGA GCTCCTGCT ACCCCAGGG
4951 ACTTCACCC TGAGTGCCT CAGCTGTCT GTTCCACCTG GAACATGAGA
5001 AGGTCACCC TTCCCTCTT CGGCCAGTCA GTGATCCAG GCCCTAGTGC
5051 TCAGGCTAGA TCAGCAGGTG GGATTCGAAG GAAGGGCAGG GATGGAGGCT
5101 CCTGCACAGT GACCCAGGC CTCACCTGG ACTCCAGGA TAGCAGGTCT

Фиг. 6С

5151 TCAGATGTGG GGGGCACACT CGATTGCGCT GCTGCAGTTC TGCAATGCGG
5201 TTCCAGTCAT CCAGTGTCTC AGGCTCATCC TGGCAAGTGC CCATGTAGAA
5251 GCTGTTCTT CTTGGAAGC QCAGGGAAGT GGGAAACAAT GAGCCTGGAG
5301 TCGGCAGGTC ACCTCTGGC CTTGGCATCT TGCCAGCCTT TGCTGCCACC
5351 TACCCATAA ACTTGAAGCC CGGCACACCA GTCTGATCA GTGCGCAGG
5401 TGCAGGAGTA CGGCACACAG ACTATTCTA TCCTAGGGGC TTGCTCACCA
5451 CCTTCTCCT GGAGAGGGCA GAAGAGGTCA CACGCAGAGA CTGCTACTAC
5501 ATCTTATCA CTTGCAAGG CTGTGGGCC AACACCCAGA GGAACAAT
5551 AAGGACCGGG AATTAATCC CAGGGGCTCC CTGTGCCCA AAGGACAAGA
5601 GCTTCAAGA AGAGTCTGGC CAGCTGGCC TTCCAGCAG CCCATCACCG
5651 CCTGAGAAGG GCATGGAGGA CTCGCCACAG CTAAGTGTCA CAATTGTGCT
5701 GGGAAATCCG GGCCTTAAC TCTGGCTAAG AGTGCCCA ACACAGCCAG
5751 CCCCTAGATG GGCAGGTAAG GAAGGCCCTG AGGCTGCAGG AAGGAGGGG
5801 AGGTGGAGCT GGATGTGAGC AAGGAGGCCA GCCTGGATT TTTAAAAGC
5851 TTTCTCTTT TCCCTGTGCC ACGATCCACC TTCCAGTCTA ATTTTGGGT
5901 ATAGTAAGTC CTTGTAGTCC CTTCACTTG AGGGGCCCA CTGGACACC
5951 CGGCCTGGGA ACGACGACCA GAACTGCGAG TGGTGGGGCG GTAGCCAGCC
6001 AAGCTGAGCA GGGCTGAGTT GCCATAATCG GGAGAACCCA GGCAGCTAG
6051 AGACTGAGTA GAGGAGGTGG CTCGCAGGCT AGCCTGGGAA GCAGGAGCAG
6101 ACCGCGTCT GTAGAACGAT GAGTGGCGC TGTCTGGCTC TTCCACATCT
6151 AGCTTCTGGA AGACAGAGTG AATCTGTTG AGTGTACAGT CCCTGGCACT
6201 GTACAGAAGC TTCCATTCCT CTCGGAAGC CCTCAGATCC CACGGCACAT
6251 CCAATGATTC CCAACTGCTT TGCAAAAGTCT CTTAAAGTGT GTGTCTGCA
6301 GAAATGGGCC TTGTCGACAG AAGCCCTCAC AAGGTGGTGC TGATGTTGTC
6351 AAGACTTTC TACGCAITTT TTTCATGGAG TCTAATCATA ATGCTTTGAG
6401 GTAGGGAATG CAGAGTGTAT ATCCGCCCAT TTTGGAGATG AAGTGCAAA

Фиг. 6D

6451 AAATAAAGTG ACTAGCCCCA AATCACACTG CTAGGAAGTA TCAGAGCTGG
6501 GGCTAGGCC CATGTCTCT GACTAGTCAG GCTCATCCA CAGCCTCTGC
6551 TGCCCTCAG TCCAACTTC CAGGGCCCTT ACCATGTTC AGAATTCCC
6601 CCAACTTCTT GGTAGCAGG GGCACCTAA ACACACAGT CCCCCTGTCT
6651 GTACCAGGG CCCCCTCTCC CCTCTCCA AACCTCCCT TCAAGATGTG
6701 GAAACAAGG CAAGGGCTG CAGCCTGTC GGCAGTCCA TGGGCACGA
6751 CAATGCCTCT CAGCTGCATG GGGCATGCTG GGAGGCACAG GATGGCTGC
6801 AGCTTCGCCA CGTTCTCTCC CTTCACCTG CACAGGCTCA GTGCTACGA
6851 TGGAGAGAAT GCTAGCCTTA GTCAGGAGC AGGGATCTAA TCTAGCCCT
6901 GCCTTTTCT TCAGAAGTGC CCTAACCA GTCAGTCCC TTTTAAAGC
6951 CTCTCAGCTT TCCACTGTA ACATGGACTG GCTGCTCATC CCTCCCTGCT
7001 CCTGACTGAG TGCCAGTGC AAAGATGCC TTGAGAGGAA GTGGGAATTG
7051 CTGACCTGTC GAC

(SEQ ID NO:5)

IL-18BPc; белок

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

1 MRHNWTPDLS PLWVLLCAH VVTLVLRATP VSQTTAATA SVRSTKDCPC
51 SQPPVFAAK QCPALEVTP EVEVPLNGTL SLSVCACSRF PNFILYWLG
101 NGSFIEHLPQ RLWEGTSRE RGSTGTLQCK ALVLEQLTPA LHSTNFSCVL
151 VDPEVQVQRH VVLAQLWVRS PRRGLQEQUE LCFHMWGGKG GLCQSSL

(SEQ ID NO:6)

Фиг. 6E

IL-18BPc; ДНК

Длина: 1360 June 19, 1998 14:55 Type: N Check: 8757 ..

1 GCGGCCGCGT CGACCACGCA GCTAACACA GCTAACTGA GTCTTGAGC
51 TCTTAAAGGG AAGCTTCTGG AAAGGAAGGC TCTTCAGGAC CTCTTAGGAG
101 CCAAGAAGA 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 CAGCCCCCA GTGTTCCAG CAGCTAAGCA
351 GTGTCCAGCA TTGGAAGTGA CTTGGCCAGA GGTGGAAGT CCACTGAATG
401 GAACGCTGAG CTTATCTGT GTGGCTGCA GCCGCTTCCC CAACTCAGC
451 ATCTCTACT GGCTGGCAA TGTTCCTTC ATTGAGCACC TCCAGGCCG
501 ACTGTGGGAG GGGAGACCA GCCGGGAACG TGGGAGCACA GCCTGGGCTG
551 AGGGCAACT TGCCCCCAC CCAAGAAGCC CTGCCCTCA GCCACAGCAG
601 TCCACAGCAG CAGGGTTAAG ACTCAGCACA GGGCCAGCAG CAGCACAACC
651 TTGACCAGAG CTTGGTCTCT ACCTGTCTAC CTGGAGTGA CAGTCCCTGA
701 CTGCTGTAG GCTGCGTGA TGCGCAACAC ACCCCCTCT TCTCTGCTTT
751 GGGTCCCTC TCTACCAA TTTCACTCC ATTCCACCT ACCTAGAAAA
801 TCACAGCTC CTTAATAGC CTCTCTCTCC TGCCATTCTC TCTCCACCTA
851 TCCATTAGCC TTCTAACGT CTACTCTCC ACATGCTCT ACTGCTCAGA
901 AACCACCAAG ACTGTTGATG CCTTAGCCTT GCACTCCAGG GCCCTACCTG
951 CATTTCACAC ATGACTTCTT GGAAGCTCC CAACTATTCT TGCTTTTCCC
1001 AGACAGCTCC CACTCCATG TCTCTGCTCA TTAGTCCCG TCTTCTCAC
1051 CGCCCCAGCA GGGGAACGCT CAAGCCTGTT TGAATGCTG CCTCTCAGT
1101 GAAGTATCC TCTTTCAGCT CTGGCCGAT TCTGACAGT TCCTATCTTC
1151 GTGCTGTATG TTTTTTTTTT CCCCCTTCC TCTAATGGAC TGTCCAGGG

Фиг. 7

3801 AGTGAGGGCC CCTGCTGGCC CCAGCCACCA GGACAGCAGG AACCCAGGCC
 3851 TACTCCTCTT ATGGTCCCTT CTAGATCCAG AGGCTAAGAG GAAGACTGGC
 3901 CAGGCCCAAG GACCCAGCCA TCAAAACCAAG CCTCAAATCT GGTGTGATG
 3951 GAGAAGTGAC TTTGCTTAA GAAAAAGGA GGCAAGGTAG GGAGAGCGCC
 4001 CACACTGTCC ATGCTCCAGG CCCCCTGGC CAGCTCCGAG AAGGCCCCAG
 4051 TGAAGGACCA GGGACCAGGC CAGGGTGGG GCAGGCATCA CTGTCTCTAG
 4101 GGGTTTGGCT ACTGTGGCC TGGGAGCTGA GAGAAGGCAC TGAGAGGGAC
 4151 AGTAGCCGGA GGACCAGGTG ACGGCAGCAT CGGGACACA GGTGGGCCA
 4201 CTCACTGGTA CTGGCCCTT ATGCTTTGGC CTGAAAGAGA CACAGTCACA
 4251 TGGCCAGATG AGAAGTGGC ATACTAGCCT GCACCCACTG GCTGGGAAGA
 4301 TCTCTTCTG CTCCCAGCC CTTGCTGGA TCCCCTCCT TGTGAGCCCC
 4351 AGGGTTATCA GTTCTGGCT GTGCCTGAGC AGCTTGGGT GCTCTCCATG
 4401 AGAATGGGGC CATCTGTCT CTCTCTTGG AGAAGGACTA CCAGGACAGG
 4451 GACACCTCT ACCCCACACC CTCCAGCAGC CTGGCTGGC CCCATCTTGG
 4501 ATGCTACTTG GTGGGCGGT CTGGGGGTG CCCATGCTT CATGGGTTT
 4551 CCTCCCCCA TCCTGCCAGT GCCTCTACT TGCCCTTGGC TCGAGGGGTG
 4601 GCACCAATGG CGGCAGCAGT GCGGCGCTG GCTGTGGTG TGGCAATGGC
 4651 CGGAGAACGG CGGTTCAC TCGCAGTGT GGGGGAAGCC TTGGACAGGG
 4701 CCTTCTTGA GGTCCCGCC CGCAGAAGC TGTCCCTAG CTCTTGGGT
 4751 GTGTGAGGA TGCTGAAGGC CATCGACTGG CCGCGTCA GCTGCAAGGA
 4801 AGGGCTGTA GACCCGGAGA CCCAATGCTG CCTTCCAGG CCAGCCTGCT
 4851 GTGCCACGCT GTACCAGCAA GGTCCGCCA GGGCGTGGT TCATCCCCCT
 4901 TCAGCCCCAG CCTCACCTGT TTAGTAGAAG CTGGAGCTGC TTTCTCTGG
 4951 GCCTCAGTAG TGCTGTGTT GCGCCCTCA TGTGGTCTC GGGGAGTCAT
 5001 GGGGCGTGG AAACAAGTGG TGGCCCTT AGACTATGGA GAAGAGGACA
 5051 GTTAGGCAGA CAGTAGCAAG AGGAGTSCA TCTGAAGCCA GGTGTCTGT

Фиг. 8С

5101 CCTCTCAGAG CTGAGTGGAC CTTGTAAGTC AACGTGCAAC CTGCTCCCT
 5151 TCCAACTCT GGGCCAGATC CTCCCTCC CAACAGTTCC CATCCATGGG
 5201 TCAGGCCCTT GGAGAGAGGG AAAGAGAGGG GGAAGTGAAG GAAGAGAGGA
 5251 GAAGGCTCCC TTTAGTCTT GGTGAGCTGG GCCTGACCTG AGCACAGTGC
 5301 TGGAGTAACA CCCAGGAGCC ACCGCGCTA CCTCAGGAGT TCCAGGGCCC
 5351 TGGTGGGGCT CTAGGGAGAC CCGTTTGGC TGCTGCCGGG TGGTGTGACC
 5401 AGTGCCCTCG GCTATCTGGA TTGGCTGCAT GCTGGCTCGG CGCAGGGTCT
 5451 CTTGGGGGT CCAAGTTTC ATCTCCTCAT CTGTGATGGT GCCCAGGCTC
 5501 AGGGAAGGCT GCATGGGTGG AAGAGTGGT CAGTGGACCA TAGCTGTATG
 5551 GAGATGGAGG AGGACCTGGG GCTGTCCAG AACTCTACAC TCGCCGACA
 5601 CTATAGGTCG GGACCTTCC TGCCTACGAG GTAGAAAGAC ACAAGCCTCC
 5651 TTTCTGTTC TGCTTTTAC STAAGCCCTG GGCAATGGC ACAAGCAGTG
 5701 CAGTCTGAC CAGATTCCTC TCTGAGCTCC TGCCTACCC CAGGGACTTC
 5751 ACCCTGAGT GCCCTCCAGC TGTCTGTCC ACCTGGAACA TGAGAAGGTC
 5801 ACCCTTCCC CTCTCGGC AGTCAGTAT CCAAGGCCCT AGTGTGAGG
 5851 CTAGATCAGC AGGTGGGATT CCAAGGAAGG GCAGGGATGG GAGGCCCTGC
 5901 ACAGTGACCC CAGGCTCAC CCTGGACTCC AGGGATAGCA GGTCTTACA
 5951 TGTGGGGGC AACTCGATT GCGCTGCTG AGCTCTGCAA TGCGTTCCA
 6001 GTCATCCAGC TGCTCAGGCT CATCTGGCA AGTGCCCATG TAGAAGCTGT
 6051 TCCTCTGTG GGAAGGCAGG GAAGTGGGA CAAATGAGCC TGGAGTCGGC
 6101 AGGTCACTC CTGGCCCTGG CATCTTCCA GCCTTGTCT CCACTACCC
 6151 CATAAATTG AAGCCCGCA CACCAGTCTG ATTCAGTGCC GCAGGTGACG
 6201 GAGTACGGCA CACAGACTAT TTCTATCCTA GGGGCTTGT CACCACCTTC
 6251 TCCCTGGAGA GGGCAGAAGA GGTACACGC AGAGACTGCT ACTACATCT
 6301 ATTCACCTGC CAAGGCTTGG TGGCCAACAC CCAGAGGAAC AAATTAAGGA
 6351 CCGGAATTA ATCCAGGG GCTCCCTGGT GCCCAAAGGA CAAGAGCTTC

Фиг. 8D

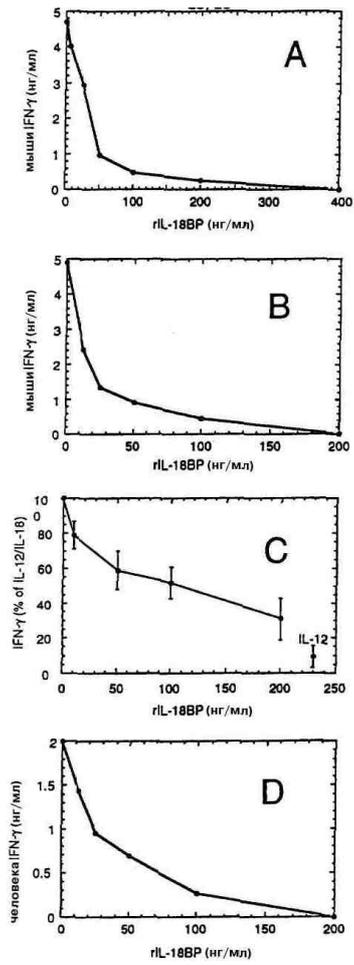
6401 CAAGAAGAGT CTGGCCAGCC TGGCCTTCC AGCAGCCCAT CACCCCTGA
 6451 GAAGGGCATG GAGGACTCCC CACAGCTAAG TGTCACAATT GTGCTGGGAA
 6501 TCCCGGGCCC TTAACCTGCG CTAAGAGTGC CCCCACACA GCCAGCCCT
 6551 AGATGGGCAG GTAAGGAAGG CCCTGAGGCT GCAGGAAGGA GGGCAGGTG
 6601 GAGCTGGATG GTAGCAAGGA GGCACGCTT GGATTTTTAA AAAGCTTCC
 6651 TCTTTCCT GTGCCACGAT CCACCTCCA GTCTAATTTT GGGTATAGT
 6701 AAGTCCCTGT AGTCCCTCA CCTGGAGGGG CCCCAGTGA CACCCGGCC
 6751 TGGGAACGAC GAGCAGAAT CCGAGTGGTG GGGCGGTAGC CAGGCAAGCT
 6801 GAGCAGGCT GAGTGGCAT AATCGGGAGA ACCCAGGCGA GCTAGAGACT
 6851 GAGTAGAGGA GGTGGCTGC AGGCTAGCT GGGAAAGCAGG AGCAGACCCG
 6901 GTGCTGAGA ACGATGAGT GGCCTGTCT GGCTCTCCA CATCTAGCTT
 6951 CTGGAAGACA GAGTGAATCT GTTGAGTGT ACAGTCCCTG GCATGTACA
 7001 GAAGCTTCCC ATCCCTTCC GAAGCCCTCA GATCCACGG CACATCCATG
 7051 TATTCCCAAC TGCTTTGCAA AGGTCTTAA AGTGTGTGT TGCAAGAAAT
 7101 GGGCTTGTG GACAGAAGCC CTCACAAGT GGTGTGTGT TGTCAAGAC
 7151 TCTTCTACCG ATTTTTTCA TGGAGTCTAT TCATAATGT TTAGGTTAGG
 7201 GAATGCAGAG TGTTATCGG CCTATTTGG AGATGAAGTG CAAAGAAATA
 7251 AAGTACTAG CCCCAAATCA CACTGCTAGG AAGTATCAGA GCTGGGGCTA
 7301 GGGCCATGT CTCTGACTA GTCAGGCTCA TCCCACAGCC TCTGTGTCC
 7351 CTCAGTCAA ACTTCCAGG CCGTACCAT GTTCCAGAAC TTCCCCAAC
 7401 TTCTGTGTA GAGGGGCA CCTAAACACA CAGGTCCCC CTGCTGTACC
 7451 AGGGGCCCC TCTCCCTCC TCCAAACCT CCGCTCAA AGTGTGAAAC
 7501 AAAGGCAAG GCTGACGCC TGTGAGGCG TCCACTGGG AGCAACAATG
 7551 CCTCTCAGT GCATGGGCA TGCTGGGAGG CACAGGATGG GCTGAGCTT
 7601 CGCCACGTT TCTCCCTCA CCGTGCAGG GCTCAGTGT ACAGTGGAG
 7651 AGAATGCTAG CCTTGTGAG GAGGCAAGGA TCTAATCCTA GCGCTGCTT

Фиг. 8E

7701 TTTCTCAGA AGTGCCCTA ACCAAGTCA TGCCTTTTT AAGACCTCTC
 7751 AGCTTCCCA CTGTAACATG GACTGGCTGC TCATCCCTCC CTGCTCCTGA
 7801 CTGAGTGCCC AG

(SEQ ID NO:9)

Фиг. 8F



Фиг. 9A-D

