



(12) PATENT

(19) NO

(11) 327240

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 5/16 (2006.01)

C12N 5/22 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

Med flere

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20000700	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1998.08.13 PCT/IL98/00379
(22)	Inng.dag	2000.02.11	(85)	Videreføringsdag	2000.02.11
(24)	Løpedag	1998.08.13	(30)	Prioritet	1997.08.14, IL, 121554 1997.08.27, IL, 121639 1997.09.29, IL, 121860 1997.11.06, IL, 122134 1998.07.22, IL, 125463
(41)	Alm.tilgj	2000.04.14			
(45)	Meddelt	2009.05.18			
(73)	Innehaver	Yeda Research and Development Company Ltd, P O Box 95, 76100 REHOVOT, IL			
(72)	Oppfinner	Daniela Novick, Hanassi Harishon Street 40, 76302 REHOVOT, IL Menachem Rubinstein, 1 Hohit Street, 76329 REHOVOT, IL Charles Dinarello, 333 15th Street, CO80302 BOULDER, US Soo Hyun Kim, Rehovot, IL			
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua, 0306 OSLO			

(54)	Benevnelse	Interleukin-18-bindende protein, DNA som koder for dette, vektor og celle inneholdende slikt DNA, fremgangsmåte for fremstilling av proteinet, antistoffer som reagerer mot proteinet samt anvendelse av proteinet for fremstilling av medikamenter.		
(56)	Anførte publikasjoner	EMBL database Accession No: AA010059 EMBL database Accession No: AA297872 EMBL database Accession No: AA311795 EMBL database Accession No: Z11583 EMBL database Accession No: Z14229		
(57)	Sammendrag			

Interleukin-18 bindingsproteiner som er i stand til å binde IL-18 og/eller modulere og/eller blokkere IL-18-aktivitet er fremskaffet. Fremgangsmåter ved deres isolasjon og rekombinant produksjon, DNAer kodende dem, vektorer uttrykkende dem, vektorer nyttig ved deres ekspressjon i mennesker og andre pattedyr, antistoffer mot dem er også fremskaffet.

Foreliggende oppfinnelse vedrører et interleukin-18 bindende protein, heretter kalt IL-18PB av den type som er nevnt i krav 1's karakteriserende del og som er i stand til å binde IL-18. Mer spesielt vedrører foreliggende oppfinnelse en oppløselig IL-18PB som finnes i kroppsvæsker, en oppløselig IL-18PB som fremskaffes ved ekspresjon av egnede DNA-vektorer som angitt i krav 11 i vertsceller, vektorer som angitt i krav 19 som uttrykker de ulike IL-18BP, samt vektorer nyttige for ekspresjon av IL-18BP hos mennesker og andre pattedyr, til antistoffer som angitt i krav 27 mot IL-18-BP, en terapeutisk anvendelse av nevnte ekspresjonsvektorer til fremstilling av medikamenter i modulering og/eller blokkering av IL-18 aktivitet og ved anvendelse av antistoffene som angitt i krav 36-49 samt til genterapi som angitt i krav 50.

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

I 1989 ble det beskrevet en endotoksintilført serumaktivitet som tilførte interferon- γ (IFN- γ) funnet i miltcellene hos en mus (27). Denne serumaktivitet fungerte ikke som en direkte tilfører av IFN- γ , men derimot som et medstimulerende middel sammen med IL-2 eller mitogener. Et forsøk på å rense aktiviteten ved post-endotoksinserumet fra mus avslørte et tilsynelatende homogent 50-55 kDa protein (26). Siden andre cytokiner kan opptre som medstimulanter ved fremstilling av IFN- γ , ble det mislykte forsøk med å nøytralisere antistoffer til IL-1, IL-4, IL-5, IL-6 eller TNF for å nøytralisere serumaktiviteten foreslått til en distinkt faktor. I 1995 demonstrerte samme forskere at den endotoksintilførte medstimulant for IFN- γ fremstilling var å finne i ekstrakter av lever fra mus forbehandlet med P.-akner (31). I denne modell utvides populasjonen av levermakrofag (Kupffer-celler) og i disse mus blir en lav dose bakteriell lipopolysakkarid, som i ikke-forbehandlede mus ikke er dødelig. Faktoren, kalt IFN- γ -tilførende faktor (IGIF) og senere designert interleukin-18 (IL-18) ble rensset til homogenitet fra 1.200 gram av P.aknebehandlet muselever.

Degenererte oligonukleotider avledet fra aminosyresekvenser av rensset IL-18 ble anvendt til kloning av et murint IL-18 cDNA (31). IL-18 er et 18-19 kDa protein av 157 aminosyrer, som ikke har noen innlysende likheter med noe annet peptid i databasene. Messenger-RNA for IL-18 og interleukin-12 (IL-12) oppdages enkelt i Kupffer-celler og i aktiverte makrofag. Rekombinant IL-18 induserer IFN-gamma kraftigere enn IL-12, antakelig gjennom en separat reaksjonsvei (31). I likhet med den endotoksininduserte serumaktivitet induserer ikke IL-18 IFN- γ av seg selv, men virker primært som en medstimulant med mitogener eller IL-2. IL-18 forbedrer T-celleformering, antakelig gjennom en IL-2-avhengig reaksjonsvei, og forbedrer Th1 sytokinproduksjon *in vitro* og utøver synerisme når kombinert med IL-12 i forbindelse med forbedret fremstilling av IFN- γ . Nøytraliserende antistoff til muse IL-18 viste seg å hindre dødelighet av lave doser LPS i P.akne forbehandlede mus. Andre hadde rapportert viktigheten av IFN- γ som et bindeledd for LPS-dødelighet i forbehandlede mus. For eksempel beskyttet nøytralisering av anti-IFN- γ antistoffer mus mot Shwartzman-liknende sjokk (16), og galaktosaminbehandlede mus mangelfulle i IFN- γ reseptor ble motstandsdyktige mot LPS-indusert død (7). Videre var det ikke uventet at nøytralisering av antistoff til murint IL-18 beskyttet P.akne-forbehandlede mus mot dødelig LPS (31). Antimurint IL-18-behandling beskyttet også overlevende mus mot alvorlig hepatisk cytoforgiftning. Etter at murinformen ble klonet, ble den menneskelige cDNA-sekvens for IL-18 rapportert i 1996 (38). Rekombinant menneskelig IL-18 utøver naturlig IL-18 aktivitet (38). Menneskelig rekombinant IL-18 er uten direkte IFN- γ -induserende aktivitet i menneskelige T-celler, men opptrer som en medstimulant for fremstilling av IFN- γ og andre T-hjelpeselle-1 (Th1) cytokiner (38). Til dags dato er IL-18 primært sett på som en medstimulant for Th1 cytokinfremstilling (IFN- γ , IL-2 og granulocytmakrofag kolonistimulerende faktor) (20) samt en medstimulant for FAS ligandmediert cytoforgiftning av murine naturlige drapsellekloninger (37). Ved kloning av IL-18 fra affekteerte vev og ved studering av

IL-18 genekspressjon, ble det funnet nær assosiasjon av disse cytokiner med en autoimmun sykdom. Den magre diabetiske (NOD) mus utvikler spontant autoimmun insulitt og diabetes, som kan akselereres og synkroniseres med en enkelt injeksjon av syklofosfamid. IL-18 mRNA ble demonstrert ved revers transkriptase-PCR i NOD-musens bukspyttkjertel under en tidlig fase av insulitt. Nivå av IL-18 mRNA økte hurtig etter syklofosfamidbehandling og fortsatte i en økning av IFN- γ mRNA, og følgelig diabetes. Det er interessant at disse kinetikker etterligner den som i IL-12-p40 mRNA, resulterende i en nær korrelasjon med individuelle mRNA-nivåer. Kloning av IL-18 cDNA fra bukspyttkjertel-RNA fulgt av en sekvensering avslørte identitet med IL-18-sekvensen klonet fra Kuppfer-celler og *in vivo* foraktiverede makrofag. Også makrofag fra NOD-mus reagerte på syklofosfamid med IL-18 genekspressjon, mens makrofag fra Balb/c-mus parallellt behandlet ikke reagerte. Derfor er IL-18-ekspressjon abnormt regulert i autoimmune NOD-mus og nært assosiert med utvikling av diabetes (32). IL-18 spiller en viktig rolle i immunoregulering eller i betennelse ved forsterkning av den funksjonelle aktivitet til Fas-ligand på Th1-celler (10). IL-18 er også uttrykt i binyremargen og kan derfor være en skjult nevroimmunmodulator, som spiller en viktig rolle i føringen av immunsystemet som følger en påkjennende opplevelse (9). *In vivo* er IL-18 dannet ved spalting av pro-IL-18, og dets endogene aktivitet ser ut til å telle som IFN- γ -fremstilling i P.akner og LPS-mediert dødelighet. På grunn av dets aktivitet, er blokkering av biologisk aktivitet av IL-18 ved humane sykdommer en terapeutisk strategi ved mange sykdommer. Dette kan oppnås ved anvendelse av oppløselige reseptorer eller blokkering av antistoff til den cellebundne IL-18-reseptor. Cytokinbindende proteiner (oppløselige cytokinreseptorer) korresponderer med de extracellulære domener av ligandbinding i deres respektive celleoverflatecytokinreseptorer. De stammer enten fra alternativ spleising av et pre-mRNA, vanlig med celleoverflatereseptor, eller fra proteolytisk spalting av celleoverflatereseptoren. Slike oppløselige reseptorer har blitt

beskrevet før, inkluderende blant andre oppløselige reseptorer av IL-6 og IFN- γ (30), TNF (11, 12), IL-1 og IL-4 (21), IFN- α/β (28, 29) og andre. Et cytokinbindende protein, kalt osteoprotegerin (OPG, også kjent som osteoklasthemmende faktor-OCIF), et medlem av TNFR/Fas-familien, ser ut til å være det første eksempel på en oppløselig reseptor som eksisterer kun som et skjult protein (1, 34, 39).

SAMMENDRAG AV OPPFINNELSEN

Foreliggende oppfinnelse frembringer IL-18-bindende proteiner som angitt i krav 1 og viralt kodede IL-18BP-homologer (heretter viralt IL-18BP) og sammensmeltede proteiner, muteiner, funksjonelle derivater, aktive fragmenter og sirkulært premuterte derivater derav, i stand til å binde seg til IL-18. De aktuelle proteiner kan fremstilles ved isolering av IL-18BP fra humane fluider, eller fra rekombinante midler. Oppfinnelsen fremskaffer også ekspresjonsvektorer av IL-18BP, egnede for ekspresjon av IL-18BP hos mennesket og andre pattedyr. Spesifikke IL-18BP, viralt kodede IL-18BP-homologer, fusjonsproteiner, muteiner, funksjonelle derivater, aktive fragmenter og sirkulære derivater derav er nyttige for modulering og/eller blokkering av de biologiske aktiviteter av IL-18. Reproduserbare ekspresjonsvektorer inneholdende DNA egnede til ekspresjon av de ulike IL-18BP i vertsceller, vertsceller omdannet hermed og proteiner og polypeptider fremstilt ved ekspresjon av slike vertsceller er også fremkaffet. Oppfinnelsen tilveieskaffer videre farmasøytiske sammensetninger som angitt i krav 34 og 35 bestående av egnede midler og IL-18BP, eller virale IL-18BP, eller vektorer for uttrykking av samme hos mennesker og andre pattedyr for behandling av sykdommer eller tilstander som krever modulering eller blokkering av IL-18-aktivitet. Oppfinnelsen skaffer videre til veie antistoffer mot IL-18BP og de virale IL-18BP, egnede for affinitetsrensing og immunoprøving av samme.

BESKRIVELSE AV FIGURENE

Figur 1 viser SDS-PAGE (natriumdodecylsulfatpolyakrylamid-gelelektroforese) av ligandaffinitetsrensede IL-18-bindende proteiner. Råurinproteiner (konsentrert ved ultrafiltrering av 500 l normal human urin) ble lagret i en IL-18-agarosekolonne. Kolonnen ble vasket og bundne proteiner ble vasket ut ved 2,2 pH. Utvaskede fraksjoner ble nøytralisert og aliquoter ble analysert med SDS-PAGE (10% akrylamid) under ikke-reduserende forhold og sølvfarging. Feltene er: 1: råurinproteiner (1,5 µg, lastet på gelen); 2-9: elu-sjoner 1-8, respektive, fra IL-18-agarosekolonnen; 10: molekylære vektmarkører, i kD, som indikert på høyre side. En pil indikerer båndet som korresponderer med IL-18BP.

Figur 2 viser et audiogram av SDS-PAGE (7,5% akrylamid) av komplekser bestående av ¹²⁵I-IL-18 (angivelig molekylvekt 19kD), kryssbundet til følgende fremstillinger av oppløselig IL-18-bindende protein: felt 1: vask av IL-18-affinitetsspaltingen. Felt 2: Elusjon 2 av IL-18-affinitetsspaltingen. Felt 3: Elusjon 3 av IL-18-affinitetsspaltingen. molekylære vektmarkører er indikert på høyre side (i kD). En pil indikerer det kryssbundne produkt (58kD).

Figur 3 viser hindring av IL-18-indusert fremstilling av IFN-γ ved IL-18BP. (A)-musmegali ble stimulert (24 t, 37°C) med de indikerte kombinasjoner av LPS (1µg/ml) og humant IL-18 (5 ng/ml) tilført enten direkte eller etter forblanding (1 t, 37°C) med urin-IL-18BP. Nivået av mus-IFN-γ i kulturen ble anslått etter 24 t. (B)-musmegali ble inkubert (24 t) med LPS (1µg/ml) sammen med murint IL.18 (10ng/ml) forblandet (1 t, 37°C) med økende konsentrasjoner av humant IL-18BP. (C) mus-megali ble inkubert (24 t) med LPS (10µg/ml) sammen med økende konsentrasjoner av humant IL-18BP. (D) musmegali ble inkubert (24 t) med TNF-α (20 ng/ml) og huIL-18 (25 ng/ml), tilført enten alene, eller etter forblanding (1 t, 37°C) med urin-IL-18BP.

Figur 4 viser sekvensen av humant IL-18Bpa-cDNA og protein. Signalpeptid er understreket.

Figur 5 viser sekvensen av humant IL-18Bpb-cDNA og protein. Signalpeptid er understreket.

5 Figur 6 viser sekvensen av humant IL-18Bpc-cDNA og protein. Signalpeptid er understreket.

Figur 7 viser sekvensen av humant IL-18Bpd-cDNA og protein. Signalpeptid er understreket.

Figur 8 viser sekvensen av humant IL-18BP-gen. Sekvensen av
10 en human genomisk kloning (7,1 kb) ble anslått og sammenliknet med den av ulike cDNA-kloninger isolert fra 3 cDNA-biblioteker. Den vanlige translasjon-startkodon er nukleotider 683-685. NuMa1-genet er lokalisert ved den negative kjede, fra nukleotid 3578 til slutten.

15 Figur 9 viser effekten av rekombinant IL-18BP på IL-18-aktivitet hos mennesker og mus. His₆-merket IL-18BPa ble transient uttrykt i COS7-celler og renset. (A) humant IL-18 (5 ng/ml) ble forblandet med enten His₆-merket IL-18BPa eller RPMI og tilført til miltceller hos mus sammen med LPS (20
20 1 µg/ml). IFN-γ -fremstillingen ble målt etter 24 t. (B) IL-18 fra mus ble forblandet med enten His₆-merket IL-18BPa eller RPMI og tilført til miltceller hos mus sammen med LPS (1 µg/ml). IFN-γ-fremstillingen ble målt etter 24 t. (C) humant IL-18 (25 ng/ml) ble forblandet med enten COS7-IL-18BPa eller RPMI og tilført til humant PBMC ved nærvær av
25 IL-12 (10 ng/ml). (D) humant IL-18 (25 ng/ml) ble forblandet med enten COS7-IL-18BPa eller RPMI og tilført til humane KG-1-celler ved nærvær av TNF-α (20 ng/ml).

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

30 Foreliggende oppfinnelse vedrører ulike IL-18BP og virale IL-18BP som binder seg til IL-18. Slike IL-18BP kan være i

stand til å modulere og/eller blokkere de biologiske aktiviteter hos IL-18. Begrepet "IL-18BP og virale IL-18BP" inkluderer det mature protein (uten signalsekvensen), proteinet omfattende signalsekvenser, muteiner av IL-18BP og virale IL-18BP, derivater av IL-18BP og virale IL-18BP og avkortede former av IL-18BP og virale IL-18BP og salter derav. Oppfinnelsen vedrører også reproduserbare ekspressjonsmidler, egnede for ekspresjon av ulike IL-18BP eller virale IL-18BP i vertceller og vertbakterier. Oppfinnelsen vedrører også ekspresjonsvektorer, egnede for ekspresjon av ulike IL-18BP eller virale IL-18BP hos mennesker og andre pattedyr. Oppfinnelsen vedrører også DNA som koder for ulike IL-18BP, virale IL-18BP, muteiner, fusjonsproteiner, funksjonelle derivater, aktive fraksjoner og blandinger derav. Nevnte DNA kan være et genomisk DNA, et cDNA, et syntetisk DNA, et PCR-produkt eller kombinasjoner derav. Disse DNAer kan settes inn i reproduserbare ekspressjonsmidler for ekspresjon av ulike IL-18BP eller virale IL-18BP i vertceller. DNAer som er i stand til å overføres til ovennevnte DNAer under stringente betingelser og kodende proteiner eller polypeptider som også er i stand til å binde IL-18 kan også anvendes. Et slikt DNA koder et IL-18BP inkludert aminosyresekvensen av Sekvens-ID nr.10 og forsynt med en stoppkodon ved sin 3' ende. Ekspresjonsvektorene, egnede for ekspresjon av ulike IL-18BP eller virale IL-18BP i mennesker og andre pattedyr, dvs. for genterapi, kan være virale vektorer eller andre typer vektorer hvor et IL-18BP-gen eller et IL-18BP-cDNA eller et DNA kodende et viralt IL-18BP ble innsatt på en måte som muliggjør effektiv ekspresjon av et IL-18BP eller virale IL-18BP i mennesker og andre pattedyr. DNA-molekyler som overføres til ovennevnte DNAer under stringente betingelser og kodende proteiner og polypeptider som er i stand til å binde IL-18 er også anvendbare. Isolasjon av IL-18BP kan utføres i samsvar med oppfinnelsen, f.eks. ved passering av et humant fluid, så som urin eller serum, gjennom en kromatografisk kolonne hvor IL-18 bindes, og deretter vasker ut det bundne IL-18BP. De ulike IL-18BP og virale 18BP kan også fremstil-

les ved rekombinante midler, dvs. ved å uttrykke IL-18BP i en egnet vert, etter operativt å knytte forsterkere, ekspresjonsforbedrere, regulatorsekvenser osv., egnede for den spesielt benyttede vert som f.eks. tillater ekspresjon i

5 den korrekte orientering. De ulike IL-18BP og de virale IL-18BP og vektorer for uttrykking av IL-18BP hos mennesker og andre pattedyr kan anvendes ved behandling og lindring av lidelser assosiert med eksogent administrert eller endogent produsert IL-18. Slike forhold er f.eks. autoimmune sykdom-

10 mer, type I diabetes, revmatoid artritt, implantasjonsutstøting, inflammatorisk tarmsykdom, sårbetennelse, multipel sklerose, iskemiske hjertesykdommer (inkludert hjerteinfarkt), iskemisk hjerneskade, kronisk hepatitt, psoriasis, kronisk betennelse i bukspyttkjertel, akutt betennelse

15 i bukspyttkjertel og liknende. I følge foreliggende oppfinnelse ble IL-18BP isolert fra normal human urin ved et kromatografisk trinn. En fremstilling av rå humane urinproteiner konsentrert fra 500 l normal human urin ble lagret i en kolonne omfattende human IL-18 bundet til agarose. Kolonnen

20 ble vasket og bundet protein ble eluert ved lav pH. Eluerte fraksjoner ble nøytralisert og aliquoter ble analysert ved SDS-PAGE (10% akrylamid) under ikke-reduserende forhold og sølvfarging. Et proteinbånd på ~40kD ble spesifikt utvunnet fra de eluerte fraksjoner (figur 1). Proteinet på ~40kD ut-

25 vunnet i første trinn ble identifisert som et IL-18 bindende protein ved dets egenskap til å spesifikt kryssbinde med ¹²⁵I-IL-18 (figur 2). Proteinet på ~40kD ble videre karakterisert ved N-terminal proteinsekvensanalyse. Aliquoter fra det eluerte protein ble utsatt for SDS-PAGE, elektroover-

30 ført til en PVDF membran og utsatt for proteinmikrosekvensanalyse. I begge tilfeller ble to polypeptidsekvenser funnet. En større sekvens og en mindre sekvens, den sistnevnte korresponderende med et fragment av human defensin (akseksjonsnummer p11398), begynnende på aminosyre 65. Subtraksjon av den kjente defensinsekvens fremskaffet følgende

35 sekvens:

sekvens identifisert ved THC123801 er imidlertid kun en "EST" (expressed sequence tag), dvs. en tilfeldig utvalgt cDNA-kloning. Det har ikke blitt analysert hvorvidt denne EST inneholder en åpen leseramme, hvorvidt et protein er uttrykt fra genet korresponderende til EST eller fra EST i seg selv. Det har heller ikke blitt identifisert noen funksjon lik et protein kodet med THC123801. Ingen informasjon var tilgjengelig som tyder på at THC123801 inneholder en åpen leserammekoding for et IL-18BP. Det affinitetsrensede urin-IL-18BP gjenvant egenskapen til å binde dets merkede ligand (^{125}I -IL-18), og følgende kovalente kryssbinding, et kompleks med molekylær vekt på 58 kD ble dannet. Molekylærvekten til disse komplekser korresponderte til et 1:1 forhold av ~40kD IL-18BP og 19kD IL-18 (figur 2). Det affinitetsrensede urin-IL-18BP blokkerte den biologiske aktivitet ved humant så vel som mus-IL-18. For når IL-18BP ble tilført til IL-18 hos enten menneske eller mus, blokkerte det evnen til IL-18 å indusere produksjonen av interferon- γ når det ble ført sammen med lipopolysakkarid (LPS) til kulturer i miltceller hos mus (figur 3). For hensikten ved foreliggende beskrivelse refererer uttrykket "biologisk aktivitet hos IL-18" *inter alia* til minst en av følgende biologiske egenskaper:

- (i) induksjon av IFN- γ , primært som en medstimulant med mitogener, IL-1, IL-12, TNF- α , LPS i ulike celletyper, så som mononukleære celler, murine splenocytter, humane perifere blodmononukleære celler, den humane KG-1-celletråd og T-celler,
- (ii) forbedring av T-celle-formeringen,
- (iii) forbedring av Th-1 cytokinproduksjon *in vitro*, primært som en medstimulant,
- (iv) synergisme med IL-12 med henblikk på forbedret IFN- γ -produksjon, medstimulerende handling for

produksjon av IFN- γ og andre T-hjelpecelle-1 cy-
tokiner,

(v) medstimulerende handling for FAS ligand-mediert
cytoforgiftning av murine naturlige dapselle-klo-
5 ninger,

(vi) induksjon av aktiviseringen av NF- κ B i humane KG-
1-celler, angivelig ved å indusere formasjonen av
50 NF- κ B-homodimer og p65/p50 NF- κ B heterodimer,

(vii) induksjon av IL-8.

10 Som anvendt her brukes uttrykket " å binde seg til IL-18"
om evnen IL-18BP har til å binde IL-18, f.eks. som bevist
ved dets binding til merkede IL-18 når affinitetsrenset som
i eksempel 2. Som anvendt her brukes uttrykket "å modulere
aktiviteten hos IL-18" om evnen IL-18BP har til å modulere
15 enhver IL-18-aktivitet utenom blokkering, f.eks. delvis
hindring, forbedring og liknende. Som anvendt her refererer
uttrykket " å blokkere aktiviteten hos IL-18" til aktivi-
teten hos IL-18BP som blokkerer minst en av de ovennevnte
biologiske aktiviteter hos IL-18. Den IL-18-blokkerende ak-
20 tivitet eksemplifiseres ved evnen IL-18BP har til å blokk-
ere IL-18-assosiert IFN- γ -ekspresjon i murine splenocytter.
Som vist mer detaljert nedenfor forårsakes moduleringen el-
ler blokkeringsaktiviteten hos IL-18 delvis av det faktum
av IL-18BP hindrer aktivering av NF- κ B ved IL-18. Videre
25 blokkerer IL-18BP minst en av de følgende akti- viteter hos
IL-18, nemlig induksjon av IFN- γ i celler hos menneske og
mus, induksjon av IL-8 og aktivering av NF- κ B. En DNA-prøve
for å undersøke cDNA biblioteker ble fremstilt ved revers-
transkripsjon PCR med spesifikke sense- og antisense pri-
30 mere og RNA fra de humane Jurkat T-celler med primere fra
TIGR-sekvensen. Det resulterende PCR-produkt ble bekreftet
av DNA sekvensanalyse. Dette PRC-produkt ble merket med
³²[P] og anvendt som en prøve for undersøkelse av fire hu-
mane cDNA biblioteker avledet fra perifere blodmonocytter,

fra Jurkat T-cellelinjen, fra PBMC og fra human milt. De ulike uavhengige cDNA-kloninger korresponderte med fire IL-18BP spleisevarianter (Sekvens-ID nr. 1, 3, 5 og 7). Alle spleisevarianter kodet for forsøksvist oppløselige skjulte proteiner. Den mest fremtredende (IL-18BPa) hadde en åpen leseramme på 192 kodoner, koding for et signalpeptid som her av og til omtales som en "ledersekvens" på 28 aminosyrerester fulgt av et modent forsøksvist IL-18BPa, hvis 40 første residuer passet perfekt med N-terminal proteinsekvensen fra urin-18PB (sekvens-ID nr.2). Posisjonering av cystinrester foreslo at dette polypeptid hører til immunoglobulin-(Ig)-superfamilien. Hvert av de fire Gln-residuer innen modent IL-18BPa var et potensielt N-glykosylasjonssted. De tre andre varianter av IL-18BP var mindre fremtredende enn IL-18BPa. De inkluderte en kortere 1 kb IL-18BPb-cDNA, koding for et signalpeptid av 28 aminosyre-residuer fulgt av et modent protein av 85 aminosyreresiduer (sekvens-ID nr.4). En tredje variant, IL-18BPc ble representert av et 2,3 kb cDNA, koding for et signalpeptid av 28 aminosyreresiduer fulgt av et modent IL-18BP av 169 aminosyrerester (sekvens-ID nr.6). Den fjerde variant, IL-18BPd, kodet for et signalpeptid av 28 aminosyreresiduer fulgt av et modent IL-18BP av 133 aminosyreresiduer (sekvens-ID nr. 8). For videre å studere den mulige eksistens av ytterligere IL-18BP spleisevarianter, ble et humant genomisk bibliotek silt med en prøve korresponderende til full lengde IL-18BP-cDNA. Fem genomiske kloner, ulike av lengde ble identifisert i dette bibliotek. Klonene ble utsatt for DNA-sekvensanalyse med eksterne og interne primere. Tilsammen ble en 7,8 kb sekvens sammenføyet fra disse klonene (sekvens-ID nr.9). Ingen eksonkoding for en transmembranreseptor (TM) ble identifisert innen sekvensen på 7,8 kb. Alle varianter delte et felles startsted for translasjon, kodet for samme signalpeptid på 28 aminosyreresiduer og oppløselige modne proteiner av varierende størrelser og C-terminalsekvenser. IL-18BP-lokusen inneholder et ytterligere gen, som koder for det nukleære celledelende apparat protein 1 (NUMA1), plassert på minussiden. Dette funnet loka-

liserer IL-18BP-genet ved det humane kromosom 11q13 (36). En homologisøk ble foretatt av den komplette proteinsekvens hos IL-18BPa og GenPect-database ved anvendelse av Smith Watermann-algoritme. Det ble funnet at homologer av IL-18BP er uttrykt i flere Poxvirus som skjulte protein med en tidligere ukjent funksjon. Det er tidligere rapportert at virus koder for ulike cytokinreseptorer og at slike viralt kodete molekyler fungerer som lokkerreseptorer som hindrer immunresponser ved å nøytralisere deres korresponderende cytokin (omtalt av "Spriggs, MK, 1994, Curr. Opin. Immunol., 6, 526-529"). Derfor vedrører foreliggende oppfinnelse også viralt kodete homologer av IL-18BP som også kan fungere som blokkerere eller modulerere av den biologiske aktivitet hos IL-18. Eksempler på viruskodete homologer av IL-18BP er vist i tabell 1. I følge foreliggende oppfinnelse kan den viruskodete homolog av IL-18BP uttrykkes i en prokaryot eller eukaryot vert. Som anvendt her referer uttrykket "viruskodet homolog IL-18BP" til en likhet på minst 50% i en sekvens bestående av minst 70 aminosyreresiduer. Fortrinnsvis har den minst 50%, minst 60%, minst 70% , minst 80%, eller alle helst minst 90% likhet med en sekvens av 100 aminosyreresiduer.

Tabell 1. Viruskodete proteiner, som viser høy homologi til humant IL-18BP.

GenPept Sekvens	Virustype
MCU60315_54	U60315 Molluscum contagiosum virus subtype 1
MCU60315_53	U60315 Molluscum contagiosum virus subtype 1
SWPHLSB_12	L22013 Swinepox virus
CV41KBPL_14	Cowpox virus
VVCGAA_5	Variola virus
U01161_3 174	Extromelia virus (mus Poxvirus)
VVU18340_6	Variola virus
VVU18338_7	Variola virus
VVU18337_7	Variola virus
VARCG_7 173	Variola major virus
MCU60315_51	Molluscum contagiosum virus
HNABV_1	New Hepatitis non-A, non-B assosiert virus

IL-18BP_a ble uttrykt i COS7-*a*peceller. Av denne hensikt ble cDNA hos IL18BP_a satt inn i ekspresjonsvektoren pEF-BOS hos pattedyr. En kassettkoding for en (His)₆-sekvens ble lagt til 3'-enden av IL-18BP OFRs i ramme, for å kunne foreta

5 opprensing av det rekombinante protein, ble COS7-celler transient transfektert med ekspresjonsvektoren og det serumfrie medium fra cellene (150 ml) ble konsentrert og renset med metallchelatkromatografi. IL-18BP_a ble kjørt som et enkeltbånd på SDS-PAGE med sølvfarging under reduserende og

10 ikke-reduserende forhold og hadde den samme observerte molekylvekt som den av urin-IL-18BP. Proteinsekvensanalyse av denne fremstilling avslørte den samme N-terminalsekvens som den av urin-IL-18BP. Immunofargingsanalyse av IL-18BP_a med antistoffer fremskaffet mot urin-IL-18BP avslørte det samme

15 molekylvektbånd som det av urinprotein. Videre, ved anvendelse av immunopresipitasjon fulgt av SDS-PAGE og autoradiografi, var IL-18BP_a i stand til å hindre urin-¹²⁵I-IL-18BP i å binde seg til antistoffet. Derfor korresponderer IL-18BP_a strukturelt med IL-18BP isolert fra urinen. Rå og

20 rensede IL-18BP_a ble testet for deres evne til å hindre biologisk aktivitet hos IL-18. IL-18BP_a hindret aktivitet i IL-18 hos menneske og mus i murine splenocytter, PBMC og den humane KG-1 cellelinje (figur 9). Disse resultater bekrefter identiteten til IL.18BP_a-cDNA som den som koder for

25 biologisk aktivt IL-18BP. Begrepet "muteiner" som brukes her refererer til analoger ved et IL-18BP, eller analoger ved et viralt IL-18BP, hvori en eller flere av aminosyre-residuene fra et naturlig IL-18BP eller viralt IL-18BP er byttet ut med andre aminosyreresiduer, eller er slettet,

30 eller en eller flere aminosyreresiduer er lagt til den naturlige sekvens for et IL-18BP, eller et viralt IL-18BP, uten større endring av hos det resulterte produkt i forhold til villtype IL-18BP eller viralt IL-18BP for binding til IL-18. Disse muteiner er fremstilt av kjent syntese

35 og/eller ved seterettede mutageneseteknikker, eller annen egnet kjent teknikk. Ethvert slikt mutein har fortrinnsvis en sekvens med aminosyrer tilstrekkelig likt dem hos et IL-18BP, eller tilstrekkelig likt dem hos et viralt IL-18BP,

et slikt som har vesentlig lik aktivitet som IL-18BP. En aktivitet hos IL-18BP er dets evne til å binde IL-18. Så lenge muteinet har vesentlig lik bindingsaktivitet med IL-18 kan det anvendes i rensingen av IL-18, ved bruk av mid-

5 ller som affinitetskromatografi, og kan betraktes å ha vesentlig lik aktivitet med IL-18BP. Det kan fastslås om et hvert gitt mutein har i hovedsak den samme aktivitet som IL-18BP ved anvendelse av rutineeksperiment omfattende å utsette et slikt mutein, f.eks. for en enkelt "sandwich"-

10 konkurranseassay for å fastslå hvorvidt det binder seg eller ikke binder seg til en passende merket IL-18, så som radioimmunoassay eller ELISA-assay. I en foretrukket utførelsesform har ethvert slikt mutein minst 40% identitet eller homologi med sekvensen fra enten et IL-18BP eller en

15 viralkodet IL-18BP-homolog. Mer foretrukket har den minst 50%, minst 60%, minst 70%, minst 80%, eller fortrinnsvis minst 90% identitet eller homologi dertil. Muteiner av IL-18BP-polypeptider eller muteiner av virale IL-18BP, som kan anvendes i følge foreliggende oppfinnelse, eller nukleinsyrer som koder for dette, inkluderer et begrenset sett av

20 substansielt korresponderende sekvenser som substitusjonspeptider eller polynukleotider som rutinemessig kan ledes av en fagmann innen området, uten unødig eksperimentering, basert på kunnskap og retningslinjer som presentert ved foreliggende oppfinnelse. For en detaljert beskrivelse av

25 proteinkjemi og -struktur ses "Schulz, G.E. et al., *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag, New York 1978" og "Creighton, T.E., *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Fransisco, 1983".

30 For en presentasjon av nukleotid sekvenssubstitusjon, så som kodonpreferanser, se "Ausubel et al, *supra*, at §§ A.1.1-A.1.24" og "Sambrook et al, *supra*, at Appendices C and D". Foretrukne endringer for muteiner i følge foreliggende oppfinnelse er hva som er kjent som "konservative"

35 substitusjoner. Konservative aminosyresubstitusjoner hos IL-18BP-polypeptider eller proteiner eller virale IL-18BP, kan inkludere synonyme aminosyrer innen en gruppe som har tilstrekkelige like fysiokjemiske egenskaper til at sub-

stitusjoner mellom medlemmer av gruppen vil preservere molekylets biologiske funksjon, "Grantham Science, Vol. 185, pp. 862-864 (1974)". Det er klart at innføringer og slettinger av aminosyrer også kan bli gjort i de allerede definer-
5 nerte sekvenser uten å endre deres funksjoner, spesielt dersom innføringene eller slettingene kun involverer noen få aminosyrer, f.eks. under tretti, og fortrinnsvis under ti, og ikke fjerner eller endrer aminosyrer som er kritiske for en funksjonell konformasjon, f.eks. cystinresiduer,
10 (Anfinsen "Principles That Govern The Folding of Protein Chains", Science, Vol. 181, pp.223-230 (1973)). Cystinresiduer som imidlertid ikke er ønsket for deres biologiske aktivitet kan byttes ut med andre residuer, f.eks. for å unngå formasjonen av uønskete intramolekylære eller inter-
15 molekylære disulfidbroer som kan forårsake en reduksjon i aktiviteten hos IL-18BP. De foretrukne synonyme aminosyregrupper er definert i tabell 1. Mer foretrukne aminosyregrupper er definert i tabell 2; og de mest foretrukne aminosyregrupper er definert i tabell 3.

Tabell I**Foretrukne grupper av synonyme aminosyrer**

Aminosyre	Synonyme gruppe
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
5 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
10 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
15 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
20 Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

Tabell II**Mer foretrukne grupper av synonyme aminosyrer**

Aminosyre	Synonyme grupper
Ser	Ser
5 Arg	His, Lys, Arg
Leu	Leu, Ile, Phe, Met
Pro	Ala, Pro
Thr	Thr
Ala	Pro, Ala
10 Val	Val, Met, Ile
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
Tyr	Phe, Tyr
15 Cys	Cys, Ser
His	His, Gln, Arg
Gln	Glu, Gln, His
Asn	Asp, Asn
Lys	Lys, Arg
20 Asp	Asp, Asn
Glu	Glu, Gln
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
Trp	Trp

Tabell III**Mest foretrukne grupper av synonyme aminosyrer**

Aminosyrer	Synonyme grupper
Ser	Ser
5 Arg	Arg
Leu	Leu, Ile, Met
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala
10 Val	Val
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
15 Cys	Cys, Ser
His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys
20 Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Met

25 Eksempler på fremstilling av aminosyresubstitusjoner i proteiner som kan anvendes for oppnåelse av muteiner fra IL-18BP-polypeptid eller proteiner, eller muteiner fra virale IL-18BP, for anvendelse i foreliggende oppfinnelse inkluderer enhver kjent fremgangsmåte som presentert i US patenter

30 nr. 33,653, 4,959,314, 4,588,585 og 4,737,462, i "Mark et al"; 5,116,943, i "Koths et al"; 4,965,195 i "Namen et al"; 4,879,111, i "Chong et al"; 5,017,691, i "Lee et al"; og lysinsubstituerte proteiner presentert i US patent nr. 4,904,584 ("Shaw et al"). I en annen foretrukket utførelsesform ved foreliggende oppfinnelse har ethvert mutein av

35

et IL-18BP eller et viralt IL-18BP en aminosyresekvens es-
sensielt korresponderende til den hos IL-18BP, eller til et
viralt IL-18BP. Begrepet "i hovedsak tilsvarende" er ment
for å forstå proteiner med mindre endringer for sekvensen
5 av det naturlige protein som ikke påvirker de grunnleggende
karakteristikker ved de naturlige proteiner, spesielt deres
evne til å binde IL-18. Typen endringer som generelt anses
å falle inn under "i hovedsak tilsvarende"-begrepet er de
som vil resultere fra konvensjonelle mutageneseteknikker av
10 DNAet som koder disse proteiner, resulterende i noen få
mindre modifiseringer, og utvelgelse for ønsket aktivitet
ved måten omtalt ovenfor. I tillegg til å binde IL-18, kan
også muteinene modulere og/eller blokkere IL-18-aktivitet.

Muteiner i følge foreliggende oppfinnelse inkluderer pro-
15 teiner kodet av en nukleinsyre, så som DNA eller RNA, som
koder et IL-18BP eller koder et viralt IL-18BP, i samsvar
med foreliggende oppfinnelse, under stringente betingelser.
Oppfinnelsen inkluderer også slik nukleinsyre, som er nyt-
tig ved prøving av identifikasjon og rensing av ønsket nuk-
20 leinsyre. Videre vil slik nukleinsyre være en førstekandi-
dat for å fastslå om den koder et polypeptid, som gjenvin-
ner den funksjonelle aktivitet hos et IL-18BP. Begrepet
"stringente betingelser" refererer til binding og påfølg-
gende vaskebetingelser, som fagmenn konvensjonelt refererer
25 til som "stringente". Se "Ausubel et al., Current Protocols
in Molecular Biology, supre, Interscience, N.Y., §§6,3 and
6,4 (1987, 1992)" og "Sambrook et al., supra". Uten be-
grensning inkluderer eksempler på stringente vaskebetin-
gelsener 12-20°C under utregnet T_m av hybridet under studie i
30 f.eks 2 x SSC og 0,5% SDS i 5 minutter, 2 x SSC og 0,1% SDS
i 15 minutter; 0,1 x SSC og 0,5% SDS ved 37°C i 30 til 60
minutter, og deretter en 0,1 x SSC og 0,5% SDS ved 68 °C i
30 til 60 minutter. En fagmann forstår av stringentbetin-
gelsene også avhenger av lengden på DNA-sekvensene, oligo-
35 nukleotide prøver (så som 10-40 baser) eller blandede oli-
gonukleotide prøver. Dersom blandede prøver anvendes, er
det foretrukket å anvende tetrametylammoniumklorid (TMAC)

istedet for SSC. Se "Ausubel, supra". Oppfinnelsen inkluderer videre nukleinsyre som koder for IL-18BP I følge foreliggende oppfinnelse, men som er forskjellig i kodonsekvens på grunn av degenerasjon av den genetiske kode. Slikt DNA
5 som mulig ikke binder under stringente betingelser ved DNA-sekvensen vist ved figur 4 til 7, men like fullt er i stand til å kode et IL-18BP i følge foreliggende oppfinnelse, er også inkludert i oppfinnelsen.

Begrepet "salter" anvendes her både om salter av karboksylgrupper og syretilførselsalter hos aminosyregrupper ved et
10 IL-18BP, et viralt IL-18BP eller muteiner. Salter fra en karboksylgruppe kan dannes ved kjent teknikk og inkluderer uorganiske salter f.eks. natrium, kalsium, ammonium, jernholdige salter eller sinkholdige salter og liknende, og
15 salter med organiske baser som dannet her, f.eks. med aminer, så som trietanolamin, arginin eller lysin, piperidin, prokain og liknende. Syreaddisjonssalter inkluderer f.eks. salter med mineral-syrer så som f.eks. eddiksyre eller oksalsyre. Naturligvis må alle slike salter ha i hovedsak lik
20 aktivitet med IL-18BP.

"Funksjonelle derivater" som anvendt her, dekker derivater av IL-18BP eller et viralt IL-18BP, og deres muteiner, som kan fremstilles f.eks. fra de funksjonelle gruppene som oppstår som sidegrener fra restene eller N- eller C-terminalgruppene, ved kjente midler, og er inkludert i oppfinnelsen så lenge de forblir farmasøytisk akseptable, dvs. at de ikke ødelegger aktiviteten til proteinet som er i hovedsak likt aktiviteten i IL-18BP, eller i virale IL-18BP, og ikke tildeler giftige egenskaper i bestanddeler inneholdende dem. Disse derivater kan f.eks. inkludere polyetylenglykolsidegrener, som kan skjule antigene steder og forlenge oppholdstiden for et IL-18BP eller et viralt IL-18BP i kroppsvæsker. Andre derivater inkluderer alifatisk ester fra karboksylgruppene, amider fra karboksylgruppene ved
30 reaksjon med ammonium eller med primære eller sekundære aminer, N-akrylderivater fra frie aminogrupeer av amino-

syresresiduer dannet med alkylbestanddeler (f.eks. alkanoyl eller karbosykliske aroylgrupper) eller O-alkylderivater fra frie hydroksylgrupper (f.eks. den fra seryl- eller treonylrester) dannet med alkylbestanddeler. Begrepet "sirkulært permuterte derivater" som anvendt her refererer til et linært molekyl hvori terminalene har blitt ført sammen, enten direkte eller gjennom en linker, for fremstilling av et sirkulært molekyl, og så blir det sirkulære molekyl åpnet ved en annen lokalisering for fremstilling av et nytt sirkulært molekyl med terminaler ulike fra terminalene i det originale molekylet. Sirkulære permutasjoner inkluderer de molekylene hvis struktur er lik et molekyl som har blitt sirkelformet og deretter åpnet. Et sirkulært permutert molekyl kan syntetiseres *de novo* som et lineært molekyl og aldri gå gjennom en sirkulerings- og åpningsfase. Fremstillingen av sirkulært permuterte derivater er beskrevet i WO95/27732. Ulike rekombinante celler, så som prokaryote celler, f.eks. E.coli, eller andre eukaryote celler, så som gjær- eller insektceller kan produsere IL-18BP eller virale IL-18BP. Fremgangsmåter for konstruksjon av egnede vektorer som bærer DNA som koder for et IL-18BP og egnet for transformering (f.eks. E.coli, pattedyrceller og gjærceller) eller infisering av insektceller for å kunne fremstille et rekombinant IL-18BP eller et viralt IL-18BP er kjent teknikk. Se f.eks. "Ausubel et al., eds. Current Protocols in Molecular Biology Current Protocols, 1993" og "Sambrook et al., eds. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Press, 1989". For hensikten med ekspressjon av IL-18BP-proteiner, eller virale IL-18BP blir DNA kodende et IL-18BP eller et viralt IL-18BP, deres fragmenter, muteiner eller sammensmeltede proteiner, og de operabelt knyttede transkripsjonale og translasjonale regulerings signaler satt inn i vektorer som er i stand til å integrere de ønskede gensekvenser inn i vertcellekromosomet. For å kunne velge ut cellene som har stabilt integrert det introduserte DNA inn i kromosomene, anvendes ekspressionsvektoren. Markøren kan fremskaffe prototropi til en aukso-tropisk vert, biosid motstandsdyktighet, f.eks. antibiotika

eller resistans mot tungmetaller så som kobber eller liknende. Det valgbare markørgenet kan enten være direkte knyttet til DNA-gensekvenser som skal uttrykkes, eller innført i samme celle ved kotransfeksjon. Ytterligere elementer kan også være nødvendige ved optimal syntese av enkeltkjedet bindingsprotein mRNA. Disse elementer kan inkludere spleisesignaler, så vel som transkripsjonfremmere, forbedrere og termineringssignaler. Nevnte DNA-molekyl som skal innføres i de valgte celler, vil fortrinnsvis være inkorporert i et plasmid eller en viral vektor som er i stand til autonom replikasjon i den resipiente vert. Foretrukne prokaryote plasmider er derivater av pBr322. Foretrukne eukaryote vektorer inkluderer BPV, vaccinia, SV40, 2-mikron-sirkel, osv., eller deres derivater. Slike plasmider og vektorer er kjent fra teknikken (2-5, 22). Så snart vektoren eller DNA-sekvensen inneholdende konstruksjonen(e) har blitt fremstilt for ekspresjon, kan ekspresjonvektoren introduseres til en egnet vertscelle ved enhver variasjon av egnede midler, så som transformasjon, transfeksjon, lipofeksjon, konjugasjon, protoplast fusjon, elektroporasjon, kalsiumfosfatpresipitasjon, direkte mikroinjeksjon, osv. Vertsceller som anvendes i denne oppfinnelse kan enten være prokaryote eller eukaryote. Foretrukne prokaryote verter inkluderer bakterier så som E.coli, Bacillus, Streptomyces, Pseudomonas, salmonella, serratia, osv. Den mest foretrukne prokaryote vert er E.coli. Bakterielle verter av særlig interesse inkluderer E.coli K12 stamme 294 (ATCC 31446), E.coli X1776 (ATCC 31537), E.coli W3110 (F-, lamda-, fototropisk (ATCC 27325)). Under slike betingelser vil proteinet ikke bli glykosylert. Den prokaryote vert må være kompatibel med replikonene og kontrollsekvensene i ekspressjonsplasmidet. Men, siden naturlige IL-18BP er glykosylerte proteiner, er eukaryote verter mer foretrukne enn prokaryote verter. Foretrukne eukaryote verter er celler fra pattedyr f.eks menneske, ape, mus og eggstokkceller fra kinesisk hamster, fordi de fremskaffer posttranslasjonale modifiseringer hos proteinmolekyler inkluderende korrekt folding, korrekt disulfidbånddannelse, så vel som glyko-

sylering på rette steder. Også gjærceller og insektceller kan utføre post-translasjonale peptidmodifiseringer inkluderende høymannoseglykosylering. Et antall rekombinante DNA-strategier eksisterer som benytter sterke promoterings-sekvenser og høye kopinummer ved plasmider, som kan anvendes for fremstilling av de ønskede proteiner i gjær- og i insektceller. Gjær- og insektceller gjenkjenner ledersekvensen hos klonede pattedyrgeprodukter og skjulte ferdigutviklede IL-18BP. Etter innføring av vektoren, dyrkes vertcellen i et utvelgende medium, som fremmer vekst av vektorholdige celler. Ekspresjon av de klonede gensekvenser resulterer i fremstillingen av et IL-18BP, et viralt IL-18BP eller muteiner og fragmenter derav. Den ovennevnte kloning, klonisolering, identifikasjon, karakterisering og sekvensprosedyrer er heretter beskrevet mer utførlig i eksemplene.

De uttrykte proteiner blir så isolert og rensset ved konvensjonell prosedyre, involverende ekstraksjon, presipitasjon, kromatografi, elektroforese, eller liknende, eller ved affinitetskromatografi, ved anvendelse av anti-IL18BP-monoklonale antistoffer immobilisert i en gelmatrise holdt i en kolonne. Råprodukter inneholdende nevnte rekombinante IL-18BP sendes gjennom kolonnen hvor IL-18BP vil bli bundet til kolonnen med det spesifikke antistoff, mens urenhetene vil passere gjennom. Etter vasking blir proteinet eluert fra gelen under betingelser som vanligvis anvendes for denne hensikt, dvs. ved en høy eller lav pH, f.eks. pH 11 eller pH 2. Oppfinnelsen vedrører videre en vektor nyttig for ekspresjon av et IL-18BP eller et viralt IL-18BP eller deres derivater i pattedyr, og mer spesifikt hos mennesker. Vektorer for korttid- og langtidsekspresjon av gener i pattedyr er kjent fra litteraturen. Studier har vist av genoverlevering til f.eks. skjelettmuskler, vaskulære myke muskler og lever resulterer i systemiske nivåer av terapeutiske proteiner. Skjelettmuskler er et nyttig mål grunnet deres store masse, vaskularitet og tilgjengelighet. Imidlertid har andre mål, og spesielt benmargprekursorer av im-

munceller blitt vellykket anvendt. Nåværende tilgjengelige vektorer for ekspresjon av proteiner i f.eks. muskler inkluderer plasmid-DNA, liposomer, protein-DNA-konjugater og vektorer basert på adenovirus, adenoassosierte virus og herpesvirus. Av disse har vektorer basert på adenoassosierte virus (AVV) vært mest vellykkede, med henblikk på varighet og nivå av genekspresjon og med henblikk på sikkerhetsoverveielser ("Kessler, P.D. 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 14082-14087"). Prosedyrer for konstruksjon av en AVV-basert vektor har blitt beskrevet i detalj. Kortvarig plasmid psub201 inneholdende villtype AVV-gemon er kuttet med restriksjonsenzym Xba I og ligert med et konstrukt bestående av en effektiv eukaryot promoter, f.eks. cytomegaloviruspromoter, en Kozak konsensussekvens, en DNA-sekvens kodende for et IL-18BP eller et viralt IL-18BP eller fragmenter derav, en egnet 3' utranslatert region og et polyadenylasjonsignal, f.eks. polyadenylasjonsignalet i simianvirus 40. Det resulterte rekombinante plasmid blir kotransfektet med et hjelpe-AAV-plasmid, f.eks. pAAV/Ad til pattedyrceller, f.eks. humane T293-celler. Kulturene blir så infisert med adenovirus som et hjelpevirus og kultursupernatanter blir samlet etter 48 til 60 timer. Supernatantene blir fraksjonert ved ammoniumsulfatpresipitasjon, renses i en CsCl densitetsgradient, dialysert og varmet til 56°C for å ødelegge ethvert adenovirus, mens det rekombinante AVV, som er i stand til å uttrykke IL-18BP eller et viralt IL-18BP forblir stabile i denne fasen. Så langt har den fysiologiske rollen til de oppløselige cytokinreseptorer ikke blitt etablert. De oppløselige reseptorer binder deres spesifikke ligander og hindrer i de fleste tilfeller deres biologiske aktivitet, som ble vist f.eks. i TNF-systemet (11,12). I svært få tilfeller, f.eks. IL-6, forbedrer de oppløselige reseptorer den biologiske aktivitet. Den rekombinante oppløselige TNF-reseptor, også kjent som TBP (TNF-bindende protein) viste seg å forhindre septiske sjokk i dyremodeller, mens oppløselige former av IL-1-reseptorer viste seg å ha sterkt hindrende virkning på utviklingen av *in vivo* alloreaktivitet i allograftresipienter hos mus. I

likhet kan IL-18BP og de virale IL-18BP ved foreliggende oppfinnelse anvendes som modulerere av IL-18-aktivitet, f.eks. i anvendelse f.eks. i enhver sykdom hvor endogen produksjon eller eksogen administrasjon av IL-18 induserer sykdommen eller forverrer pasientens situasjon. Foreliggende oppfinnelse vedrører videre farmasøytiske sammensetninger inneholdende en farmasøytisk akseptert bærer og f.eks. en viral vektor slik som enhver av de nevnte AAV-baserte virale vektorer eller andre vektorer som uttrykker et IL-18BP eller viralt IL-18BP og som er egnet for administrasjon til mennesker og andre pattedyr med hensikt å oppnå ekspresjon *in vivo* av IL-18BP, dvs. for anvendelse i genterapi. De farmasøytiske sammensetningene ved oppfinnelsen er fremstilt for administrasjon ved å blande et IL-18 eller et viralt IL-18 eller deres derivater eller vektorer for uttrykking av samme med fysiologisk aksepterte bærere og/eller stabilisatorer og/eller eksipienter, og fremstilt i doseringsform, f.eks. ved lyofilisering i doseringsvialer. Fremgangsmåten for administrasjon kan være via enhver av de aksepterte måter for administrering for lignende midler og vil avhenge av forholdet som skal behandles, f.eks. intravenøst, intramuskulært, subkutant, ved lokal injeksjon eller topisk påførsel, eller kontinuerlig ved infusjon, osv. Mengden av aktiv sammensetning som administreres, vil avhenge av administrasjonsruten, sykdommen som skal behandles og pasientens tilstand. Lokal injeksjon, vil f.eks. kreve en lavere dose protein med basis i kroppsvekt enn en intravenøs infusjon.

Følgelig vil IL-18BP, eller virale IL-18BP eller vektorer uttrykkende samme *in vivo* være indikert for behandling av autoimmune sykdommer, type I diabetes, sepsis, tranplantatavstøtning, revmatoid artritt, inflammatorisk tarmsykdom, multippel sklerose, iskemiske hjertesykdommer inkludert akutte hjerteinfarkt, iskemisk hjerneskade, kronisk hepatitt, psoriasis, kronisk betennelse i bukspyttkjertel og akutt betennelse i bukspyttkjertel og liknende sykdommer hvor det er en aberrant ekspresjon av IL-18BP, førende til

et overskudd av IL-18 eller i tilfeller av komplikasjoner grunnet eksogent administrert IL-18.

Oppfinnelsen inkluderer også antistoffer mot et IL-18BP eller et viralt IL-18BP, så vel som mot deres salter. Begrepet "antistoff" er anvendt for å inkludere polyklonale antistoffer, monoklonale antistoffer (Mabs), kimeriske antistoffer, antiidiotype, og humane (anti-Id) antistoffer til antistoffer som kan merkes i oppløselig eller bundet form, og humaniserte antistoffer så vel som fragmenter derav fremskaffet ved enhver kjent teknikk, så som, men ikke begrenset til, enzymatisk spalting, peptidsyntese eller rekombinante teknikker. Polyklonale antistoffer er heterogene populasjoner av antistoffmolekyler derivert fra sera fra dyr som er immunisert med et antigen. Et monoklonalt antistoff inneholder en i hovedsak homogen populasjon av antistoffer spesifikke mot antigener, hvis populasjon inneholder vesentlig like epitope bindingssteder. MAb's kan oppnås ved metoder som er kjent for fagmenn. Se f.eks. "Kohler and Milstein, Nature 256:495-497 (1975); US Patent No. 4,376,110; Ausubel et al, eds.,supre, Harlow and Lane, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Springs Harbor Laboratory (1988); and Colligan et al.,eds., Current , Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993)". Slike antistoffer kan være av enhver immunoglobulinklasse inkludert IgG, IgM, IgE, IgA, GILD og enhver underklasse derav. Et hybridom produserende et Mab i foreliggende oppfinnelse kan dyrkes *in vitro*, *in situ* eller *in vivo*. Produksjon av høytitervæske av Mabs *in situ* eller *in vivo* gjør denne til den foretrukne fremgangsmåte for fremstilling.

Kimeriske antistoffer er molekyler hvor ulike deler er avledet fra ulike dyrearter, så som de som har den variable region avledet fra et murint Mab og en human immunoglobulinkonstant region. Kimeriske antistoffer er primært anvendt for å redusere immunogenisiteten ved tilføring og for å øke utbytte i produksjon, f.eks. der murint Mab har høy-

ere utbytte, som der humane/murine kimeriske Mab er anvendt. Kimeriske antistoffer og fremgangsmåter for deres fremstilling er kjent i teknikken.

Et antiidiotypisk (anti-Id) antistoff er et antistoff som gjenkjenner unike determinanter generelt, assosiert med antigenbindingsstedet hos et antistoff. Et Id-antistoff kan bli fremstilt ved immunisering av et dyr av samme art og genetisk type (f.eks. museherkomst) som kilden til Mab med Mab hvortil et anti-Id er fremsilt. Det immuniserte dyr vil gjenkjenne og reagere på de idiotype determinanter hos det immuniserende antistoffet, ved fremstilling av et antistoff mot disse idiotype determinanter (anti-Id-anti-stoffet). Se f.eks. US patent nr. 4,699,880.

Anti-Id-antistoffet kan også anvendes som et "immunogen" for induisering av en immun respons i et annet dyr, ved å fremstille et såkalt anti-anti-Id-antistoff. Anti-anti-Id kan være epitopt identisk med det originale Mab, som inducerer anti-Id. Ved å bruke antistoffer mot dd idiotype determinanter hos et Mab, er det mulig å identifisere andre kloner som uttrykker antistoffer av identisk art.

Følgelig kan Mab generert mot IL-18BP og relaterte proteiner ved foreliggende oppfinnelse anvendes for å indusere anti-Id antistoffer i egnede dyr, så som BALB/c-mus. Miltceller fra slike immuniserte mus ble anvendt for fremstilling av anti-Id-hybridomer som skjuler anti-Id-Mab. Videre kan anti-Id-Mab kobles til en bærer slik som "keyhole limpet"-hemocyanin (KLH) og anvendes for å immunisere ytterligere BALB/c-mus. Sera fra disse mus vil inneholde anti-anti-Id-antistoffer som har bindingsegenskapene lik det originale Mab spesifikt for et IL-18BP-epitop eller epitoper hos et viralt IL-18BP.

Anti-Id-MAb har deres egne idiotype epitoper, eller "idiotoper", strukturelt liknende epitopet som blir evaluert, så som et IL-18BP eller et viralt IL-18BP.

- Begrepet "humanisert antistoff" er anvendt for å inkludere f.eks. antistoffer som ble oppnådd ved manipulasjon av mus-antistoffer gjennom genetiske utførelsesmetoder for å bli mer kompatible med den humane kropp. Slike humaniserte antistoffer har redusert immunogenisitet og forbedret farmakokinetikk hos mennesker. De kan fremstilles ved kjent teknikk, så som beskrevet, f.eks. for humanisert anti-TNF antistoffer i "Molecular Immunology, Vol. 30, No. 16, pp. 1443-153, 1993".
- Begrepet "antistoff" er også ment å inkludere både intakte molekyler så vel som fragmenter derav, så som f.eks. Fab og F(ab')₂, som er i stand til å binde antigen. Fab og F(ab')₂-fragmenter mangler Fc-fragmentet hos et intakt antistoff, fjernes raskere fra sirkuleringen, og kan ha færre uspesifiserte vevsbindinger enn et intakt antistoff ("Wahl et al., J. Nucl. Med. 24:316-325 (1983)). Det vil forstås at Fab og F(ab')₂, og andre fragmenter av antistoffene som er nyttige ved foreliggende oppfinnelse, kan anvendes for deteksjon og mengdebestemmelse av et IL-18BP eller et viralt IL-18BP, ifølge fremgangsmåtene beskrevet her, for intakte antistoffmolekyler. Slike fragmenter er typisk fremstilt ved proteolytisk spalting, ved anvendelse av enzymer som papain (for å fremstille Fab-fragmenter) eller pepsin (for å fremstille F(ab')₂-fragmenter).
- Et antistoff anses å være "i stand til å binde" et molekyl dersom det er i stand til spesifikt å reagere med molekylet for å binde molekylet til antistoffet. Begrepet "epitop" er ment for å referere til den del av ethvert molekyl som er i stand til å bli bundet til et antistoff som også kan gjenkjennes av det antistoffet. Epitoper, eller "antigene determinanter" består vanligvis av kjemisk aktive overflategrupperinger av molekyler så som aminosyrer eller sukker-sidegrener og har spesifikt tredimensjonale strukturelle karakteristikk så vel som spesifikke ladekarakteristikk.

Et "antigen" er et molekyl eller en del av et molekyl som er i stand til å indusere et dyr til å fremstille antistoffer som er i stand til å binde seg til et epitop ved det antigenet. Et antigen kan ha et eller flere epitoper.

5 Den spesifikke reaksjon referert til ovenfor er ment å indikere at antigenet vil reagere, på en høyst selektiv måte, med dets korresponderende antistoff, og ikke med mangfoldet av andre antistoffer som kan bli fremkalt av andre antigen-
ner.

10 Antistoffene, inkludert fragmenter av antistoffer, som er nyttige ved foreliggende oppfinnelse kan anvendes for kvantitativ eller kvalitativ detektering av et IL-18BP eller et viralt IL-18BP, eller relaterte proteiner i en prøve eller å detektere nærværet av celler som uttrykker slike protei-
15 ner ved foreliggende oppfinnelse. Dette kan oppnås ved immunofluorescenceteknikker, iverksettende et fluorescent merket antistoff (se nedenfor) kombinert med lysmikroskopisk, flytctyometrisk eller fluorometrisk deteksjon.

Antistoffene (eller fragmenter derav) som er nyttige ifølge
20 foreliggende oppfinnelse kan anvendes histologisk, som i immunofluorescence- eller immunoelektronmikroskopi, for *in situ*-deteksjon av et IL-18BP eller et viralt IL-18BP og relaterte proteiner ved foreliggende oppfinnelse. *In situ*-deteksjon kan oppnås ved å fjerne en histologisk prøve fra
25 en pasient, og forsyne det a-merkede antistoff ved foreliggende oppfinnelse til en slik prøve. Antistoffet, (eller fragment) blir fortrinnsvis tilført ved å påføre eller å overlegge det merkede antistoff (eller fragment) til en biologisk prøve. Gjennom anvendelse av en slik prosedyre, er
30 det mulig å fastslå ikke bare tilstedeværelsen av IL-18BP eller et viralt IL-18BP eller relaterte proteiner, men også dets distribusjon hos det undersøkte vev. Ved anvendelse av foreliggende oppfinnelse, vil en fagmann lett kunne forstå
35 at enhver av det store utvalg av fremgangsmåter (så som flekkprosedyrer) kan modifiseres for å oppnå en slik *in situ*-deteksjon.

Slike prøver for et IL-18BP eller et viralt IL-18BP, eller relaterte proteiner ved foreliggende oppfinnelse omfatter vanligvis inkubasjon av en biologisk prøve, så som et biologisk fluid, en vevekstraksjon, nylig fjernede celler, så som lymfocytter eller leukocytter, eller celler som er blitt inkubert med vevskultur, ved tilstedeværelsen av et detekterbart merket antistoff som er i stand til å identifisere IL-18BP eller relaterte proteiner, og detektere antistoffet ved enhver av de mange kjente teknikker innen området.

Den biologiske prøve kan behandles med en fast fasestøtte eller bærer så som nitrocellulose eller annen fast støtte eller bærer som er i stand til å immobilisere celler, cellepartikler eller oppløselige proteiner. Støtten eller bæreren kan deretter vaskes med egnede buffere etterfulgt av behandling med det detekterbart merket antistoff i samsvar med foreliggende oppfinnelse. Den faste fasestøtte eller bærer kan deretter vaskes med bufferen for andre gang for å fjerne ubundet antistoff. Mengden av bundet antistoff i nevnte faste støtte eller bærer kan detekteres ved konvensjonelle midler. Med "fast fasestøtte", "fast fasebærer", "fast støtte", "fast bærer", "støtte" eller "bærer" menes enhver støtte eller bærer som er i stand til å binde antigen eller antistoffer. Velkjente støtter eller bærere inkluderer glass, polystyren, polypropylen, polyetylen, dekstran, nylonamylaser, naturlige og modifiserte celluloser, polyakrylamider, gabbroer og magnetitt. Bærerens natur kan være enten oppløselig til en viss grad eller uoppløselig for hensikten ved foreliggende oppfinnelse. Støttematerialet kan nesten ha enhver mulig strukturell konfigurasjon så lenge det koblete molekylet er i stand til å binde seg til et antigen eller antistoff. Støtte- eller bærekonfigurasjonen kan være sfærisk, som i en dråpe, eller sylindrisk, som i den indre overflate i et testrør, eller den ytre overflate ved en stang. alternativt kan overflaten være flat som et ark, teststrimmel, osv. Foretrukne støtter eller bærere inkluderer polystyrendråper. Fagmenn vil kjen-

ne til mange andre egnede bærere for binding av antistoff eller antigen, eller vil være i stand til å utvikle tilsvarende ved rutineeksperimentering.

5 Bindingsaktiviteten ved en gitt mengde antistoff i samsvar med foreliggende oppfinnelse kan fastslås i følge utprøvde fremgangsmåter. Fagmenn vil være i stand til å fastslå operative og optimale assayforhold for hver fastslåelse ved å iverksette rutineeksperimentering.

10 Andre slike handlinger som vasking, røring, risting, filtrering og liknende kan legges til assayene basert på hensiktsmessighet eller nødvendighet for den spesielle situasjon.

En av måtene hvor antistoffet ifølge foreliggende oppfinnelse kan detekterbart merkes på er ved å binde det til et 15 enzym og anvende i en enzymimmunassay (EIA). Dette enzymet vil reagere når senere eksponert mot et egnet substrat, for med substratet på den måte å fremstille en kjemisk bestanddel som kan detekteres, f.eks ved spektrofotometiske, fluorometriske eller ved visuelle midler. Enzymer som kan anvendes i detektering av merket antistoff inkluderer, men er 20 ikke begrenset til malat dehydrogenase, stafylokokkal, delta-5-steroid isomerase, gjæralkohol, dehydrogenase, alfaglyserofosfatdehydrogenase, triosefosfatisomerase, pepperrotperoksidase, alkalisk fosfatase, asparginase, glykoseoksidase, beta-galaktosidase, ribonuklease, urease, katalase, glykose-6-fosfatdehydrogenase, glukoamylase og acetylcholinesterase. Detekteringen kan oppnås ved kolorimetrisk fremgangsmåter, som iverksetter et kromogent substrat for enzymet. Detektering kan også oppnås ved visuell 25 sammenlikning av graden av enzymatisk reaksjon med et substrat i sammenlikning med liknende fremstilte standarder.

30 Deteksjon kan oppnås ved anvendelse av enhver blant utvalget av andre immunoprøver. For eksempel er det mulig, ved radioaktiv merking av antistoffer eller fragmenter av anti-

stoff, å detektere et IL-18BP eller et viralt IL-18BP ved anvendelse av radioimmunassay (RIA). En god beskrivelse av RIA finnes i "Laboratory Techniques and Bio-chemistry in Molecular Biology, av Work, T.S. et al., Nort Holland Publishing Company, NY (1978)" med spesiell referanse til kapitlet kalt "An Introduction to Radioimmuno Assay and Related Techniques by Chard, T", som nevnt i foreliggende referanseliste. Det radioaktive isotop kan oppdages ved teknikker som anvendelse av gammateller eller en scintilla-
10 sjonteller eller ved autoradiografi.

Det er også mulig å merke et antistoff i samsvar med foreliggende oppfinnelse, med en fluorescent bestanddel. Når det fluorescentmerkede antistoff blir eksponert mot lys av en egnet bølgelengde, kan dets tilstedeværelse detekteres
15 grunnet fluorescensen. Blant de vanligste anvendte fluorescentmerkede bestanddeler finner man fluorescein, isotiocyanat, rodamin, fykoerytrin, fykocyanin, allofykocyanin, o-ftaldehyd og fluorescamin.

Antistoffet kan også detekterbart merkes ved anvendelse av flourescensemitterende metaller så som ^{152}Eu , eller andre innen de lantanide serier. Disse metaller kan kobles til antistoffet med anvendelse av metallchelaterende grupper som dietylentriaminpentaeddiksyre (ETPA).
20

Antistoffet kan også detekterbart merkes ved å binde det til biotin. Biotinylert antistoff kan så detekteres ved
25 avidin eller streptavidin bundet til en fluorescent bestanddel eller til et enzym så som peroksidase eller til en radioaktiv isotop eller liknende.

Antistoffet kan også bli detekterbart merket ved å binde det til en kjemiluminescent bestanddel. Tilstedeværelsen av
30 det kjemiluminescentmerkede antistoffet blir så fastslått ved deteksjon av tilstedeværelsen av luminescens som oppstår under en kjemisk reaksjon. Eksempler på spesielt nyttige kjemiluminescente merkingsbestanddeler er luminol,

isoluminol, teromatisk akridiniumester, imidasol, akridiniumsalt og oksalatester.

På liknende vis kan man anvende en bioluminescent bestanddel for merking av antistoffet ved foreliggende oppfinnelse. Bioluminescens er en type kjemiluminescens funnet i biologiske systemer hvor et katalytisk protein øker effektiviteten ved den kjemiluminescente reaksjon. Tilstedeværelsen av et bioluminescent protein anslås ved deteksjon av tilstedeværelsen av luminescens. Viktige bioluminescente bestanddeler med hensikten merking er luciferin, luciferase og akvuorin. Et antistoffmolekyl ved foreliggende oppfinnelse kan tilpasses for anvendelse i en immunometrisk assay, også kjent som et "two-site"- eller "sandwich"-assay. I et typisk immunometrisk assay, blir en kvantitet umerket antistoff (eller fragment av antistoff) bundet til en fast støtte eller bærer og et kvantitet detekterbart merket oppløselig antistoff blir lagt til for å tillate deteksjon og/eller mengdebestemmelse av ternærkompleks dannet mellom fastfase antistoff, antigen og merket antistoff.

Typiske, og foretrukne immunometriske assayer inkluderer "fremmings"-assayer hvor antistoffet bundet til den faste fase først blir satt i kontakt med prøven som testes for å ekstrahere antigenet fra prøven ved dannelsen av et binært fastfaseantistoffkompleks. Etter en egnet inkubasjonstid, vaskes den faste støtte eller bærer for fjerning av residua fra den flytende prøve, inkludert ureagert antigen, dersom noe, og settes deretter i kontakt med oppløsningen inneholdende en ukjent mengde med merket antistoff (som fungerer som et "reporter"-molekyl). Etter en andre inkubasjonstid for å tillate det merkede antistoff å kompleksere med antigenet bundet til den faste støtte eller bærer gjennom det umerkede antistoff, vaskes den faste støtte eller bærer en andre gang for fjerning av det ureagerte merkede antistoff.

En annen type "sandwich"-assay, som også kan være nyttig med antigenene ved foreliggende oppfinnelse, er de såkalte

"simultane" og "reverse" assayer. Et "simultan"-assay involverer et enkelt inkubasjonstrinn da antistoffet bundet til den faste støtte eller bærer og merkede antistoff begge blir satt til prøven som testes samtidig. Etter at inkubasjonen er fullført, blir den faste støtte eller bærer vasket for fjerning av residua fra fluidprøve og ukomplekse merkede antistoff. Tilstedeværelsen av det merkede antistoff med den faste støtte eller bærer blir fastslått som den ville ha blitt ved en konvensjonell "fremmersandwich"-assay.

I det "reverse" assay vil det tas i bruk gradvis tilføring først med en oppløsning av merket antistoff til fluidprøven etterfulgt av tilførsel av umerket antistoff bundet til en fast støtte eller bærer etter en egnet inkubasjonstid. Etter en andre inkubasjon blir den faste fase vasket på konvensjonelt vis for å frigjøre den fra residua fra prøven som testes og oppløsningen fra det ureagerte merkede antistoff. Fastslåelsen av merket antistoff assosiert med en fast støtte eller bærer er foretatt som i "simultane" og "fremmende" prøver.

Foreliggende oppfinnelse fremskaffer også DNA-molekyler som koder ethvert av proteinene ved foreliggende oppfinnelse som definert ovenfor, reproduerbare ekspresjonsvektorer omfattende ethvert av slike DNA-molekyler, vertceller transformert med enhver slik ekspresjonsvektor inkludert prokaryote, eukaryote og vertsceller, fortrinnsvist CHO-celler. Foreliggende oppfinnelse vedrører også en fremgangsmåte for fremstilling av ekspresjonsvektorer kodende for ethvert protein ved foreliggende oppfinnelse med henblikk på deres ekspresjon hos mennesker og andre pattedyr. Foreliggende oppfinnelse inkluderer også en fremgangsmåte for fremstilling av ethvert av de proteiner ved foreliggende oppfinnelse ved å dyrke en transformert celle ifølge foreliggende oppfinnelse samt gjenvinne proteinet kodet av DNA-molekylet og ekspresjonsvektoren i slike transformerte vertceller.

I tillegg til anvendelsen av IL-18BP eller et viralt IL-18BP for modulering av IL-18-aktiviteten kan de, naturligvis, iverksettes for rensing av selve IL-18 i seg selv. For dette bruk kobles IL-18 eller viralt IL-18 til en affinitetskolonnes og rått IL-18 passerer gjennom. IL-18 kan så
5 gjenvinnes fra kolonnen ved f.eks. elusjon ved lav pH.

Foreliggende oppfinnelse vil nå bli illustrert ved følgende eksempler:

EKSEMPEL 1: Isolering av et IL-18 bindingsprotein

10 E.coli IL-18 (2,5 mg, Peprotech, NJ) ble koblet med Affigel-10 (0,5 ml, BioRad), i følge forhandlerens instruksjon og lagt i en kolonne. Råurinproteiner (1000 ganger konsentrert, 500 ml) ble tilført kolonnen med en flythastighet på 0,25 ml/min. Kolonnen ble vasket med 250 ml 0,5M NaCl i
15 fosfatbufret salin (PBS). Bundne proteiner ble deretter eluert med 25mM sitronsyre, pH 2,2 og benzamidin (1 mM), øyeblikkelig nøytralisert med 1M Na₂CO₃). Fraksjoner av 1 ml ble samlet opp. Fraksjonene ble analysert ved SDS-PAGE og sølvfarging. IL-18-bindingsproteinene eluerte i fraksjon
20 2-8 som et ~40.000 Dalton-protein (figur 1). Båndet på ~40 kD, tilsvarende med IL-18BP oppviste en distinkt gul farge ved sølvfarging. De ulike fraksjoner ble analysert ved kryssbinding med ¹²⁵I-IL-18, SDS-PAGE og autoradiografi som beskrevet i eksempel 2. Et-IL-18 bindingsprotein ble funnet
25 i fraksjon 2-8, eluert fra IL-18-agarosekolonnen (figur 2).

EKSEMPEL 2: KRYSS-BINDING AV AFFINITETSRENSSET IL-18BP MED MERKET IL-18.

Prøver (40µl) av IL-18BP fra affinitetsrensingstrinnet ble inkubert (70 min. ved 4°C) med ¹²⁵I-IL-18 (5.000.000 cpm).
30 Disuccinimidylsuberat (DSS), oppløst i dimetylsulfoksid (Me₂SO, 20mM), ble lagt til en endelig konsentrasjon på 2mM og blandingen ble stående i 20 min ved 4°C. Reaksjonen ble stoppet ved tilføringen av 1M Tris-HCl pH 7,5, og 1M NaCl

til en endelig konsentrasjon på 100mM. En prøvebuffer inneholdende Ditiotreitotol (DTT, 25 mM endelig) ble lagt til og blandingene ble analysert med SDS-PAGE (7,5 % akrylamid) etterfulgt av autoradiografi (figur 2). Et spesifikt bånd med molekylvekt på 58kD, antakelig bestående av et ~40 kD protein kryssbundet med ~20 kD ¹²⁵I-IL-18, ble observert i fraksjoner eluert fra IL-18-affinitetskolonnen (bane 2 og 3) men ikke i kolonnevaskingen (bane 1), inneholdende alle andre råurinproteiner.

10 EKSEMPEL 3: PROTEINSEKVENANS-ANALYSE

Eluerte fraksjoner fra affinitetskolonnen i eksempel 1 ble gjenoppløst med SDS-PAGE (10% akrylamid) under ikke-reduerende betingelser, elektroblottet i en PVDF-membran ("Pro-Blot, Applied Biosystems, USA"). Membranen ble farget med coomassieblå, ~40 kD-båndet ble fjernet og utsatt for proteinsekvensanalyse med en Procise mikrosekvenserer ("Applied Biosystems, USA"). Følgende store sekvens ble oppnådd:

T-P-V-S-Q-Q-x-x-x-A-A-A
1 . . . 510 . .

20

Hvor x representerer en ennå ubestemt aminosyre. I tillegg ble oppnådd følgende lille sekvens:

A-x-Y-x-R- A-x-Y-x-R-I-P-A-x-A-I-A
25 1 . . . 5 1 . . . 510 . .

På grunn av denne doble sekvens var det ikke mulig å oppnå lengre sekvensdata. Den lille sekvensen ble identifisert som et fragment av human defensin (aksesjonsnummer p11398) begynnende ved aminosyre 65 ved defensin. Den store sekvens kunne ikke assosieres med noe annet kjent protein, som fastslått ved å søke i alle tilgjengelige databaser i NCBI og TIGR ved anvendelse av blastp- og tblastn-søkeprogram-

30

translasjon av cDNA fra TIGR-filen THC123801). Den forsøks-
vise proteinsekvens, oppnådd ved translasjon av fil
THC123801, var ubestemmelig ved residua 2 og 4 ved IL-18BP.
Dette bekrefter identiteten til aminosyrerestene 6, 7 og 8
5 ved IL-18PB ettersom Thr også ser ut til å gjelde for resi-
dua 11.

EKSEMPEL 4: IL-18BP ER ET GLYKOPROTEIN

Aliquot (0,3 ml) fra eluert fraksjon i eksempel 1 ble vi-
dere renset ved størrelsesekslusjonskromatografi i en Supe-
10 rose 12-kolonne (1X30 cm, Pharmacia, Sverige). Kolonnen
(ble preekvilibrert med fosfatbuffert salin og natriumazid
(0,02%) ved en strømningshastighet på 0,5 ml/min. og frak-
sjoner ble samlet over et minutt. IL-18BP eluerte i frak-
sjon 20-25 som en ~40.000 Dalton-protein, som fastslått ved
15 SDS-PAGE og sølvfarging. En prøve inneholdende ~40.000 Dal-
ton-proteinet (fraksjon 23, 50µl, ~50 ng protein) ble rea-
gert med N-glykosidase F ("PNGase F, Biolab") ifølge for-
handlers instruksjoner. Aliquotene ble kort denaturert ved
å kokes ved tilstedeværelse av 5% SDS i 10 min., 10Xg7 buf-
20 fer (2,5 µl), 10% NP-40 (2,5 µl) og PNGase F(1 µl), 1 time
ved 37°C. Prøven ble analysert med SDS-PAGE (10% akrylamid)
under ikke-reduserende forhold og sammenliknet med ufor-
døyet IL-18BP fra samme Suprose 12-fraksjon. Det ble funnet
at ~40 kD-båndet av IL-18BP forsvant i den PNGase-behand-
25 lede fraksjon. Nye bånd, korresponderende med 30 kD (akku-
rat over PNGase-båndet) og 20 kD ble oppnådd. Elimineringen
av ~40 kD-båndet indikerer at dette båndet er et N-glykosy-
lert protein.

EKSEMPEL 5: BLOKKERING AV DEN BIOLOGISKE AKTIVITET AV IL-18 30 HOS IL-18BP.

Evnen til IL-18BP isolert fra urin til å blokkere IL-18-
aktivitet ble anslått ved å måle den IL-18-induserte prod-
uksjon av IFN-γ i mononukleære celler. IL-18 induserer IFN-
γ når ført sammen med enten lav konsentrasjon av LPS, IL-

12, IL-2 eller andre stimulanter. IL-18-aktiviteten ble testet i murine splenocytter, i humane periferae blodmononukleære celler (PBMC) og i den humane KG-1-cellelinjen. Miltceller ble fremstilt fra en frisk mus, vasket og suspendert i RPMI 1640 middels supplementert med 10% fetalt bovinserum ved 5×10^6 celler/ml. 1,0 ml kulturer ble stimulert med LPS (enten 0,5 eller 1 $\mu\text{g/ml}$) sammen med rekombinant humant eller murint IL-18 (enten 0,5 eller 5 ng/ml). Humant IL-18BP (0,5 eller 50 ng/ml) ble tilført til den re-

10 kombinante IL-18 før tilføring til miltceller. Etter dyrking i 24 timer ble miltcellene utsatt for tre fryse- (-70°C) og tinings- (romtemperatur) sykluser, celleavfallet ble fjernet ved sentrifugering og supernatantene ble prøvet for IFN- γ ved anvendelse av ELISA-utstyret for mus- IFN- γ

15 (endogen). Som vist i figur 3A, blokkerte IL-18BP aktiviteten til huIL-18 i murine splenocytter i en doseavhengig måte. I motsetning, som en kontroll, hadde oppløselige interferon- α/β -reseptor ingen effekt. Aktiviteten til det rekombinante murine IL-18 ble tilsvarende hindret av det humane IL-18BP, noe som antyder at humant IL-18BP gjenkjenner murint IL-18 (figur 3B). Endogent IL-18BP induseres i murine splenocytter ved høye konsentrasjoner av LPS, som fører til produksjon av IFN- γ . IFN- γ -indusering med LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) ble også hindret av urin-IL-18BP (figur 3C). Kon-

20 kanavalin A (con A) aktiviserer T-celler til å produsere IFN- γ i fravær av IL-18 (13). Induksjon av IFN- γ ved Con A ble ikke hindret av IL-18BP selv ved høye konsentrasjoner (figur 3D). Denne observasjonen demonstrerte at IL-18 var en spesifikk hemmer av IL-18-bioaktivitet mer enn en uspesifikk hemmer av IFN- γ -fremstilling. IL-18BP hindret i tillegg aktiviteten hos det humane IL-18 i humane KG-1-celler induert med en kombinasjon av IL-18 og TNF- α (figur 3E). Den ovennevnte data demonstrerer at urin-IL-18BP hindrer human så vel som murin IL-18-aktivitet som målt ved sam-

35 minduksjon av IFN- γ i humane og murine mononukleære celler. Konsentrasjonen av IL-18BP som reduserte IL-aktiviteten med $>90\%$ var sammenliknbar med selve IL-18, påvisende en høy affinitetsinteraksjon mellom disse to proteiner.

EKSEMPEL 6: ISOLASJON AV CDNA-KLONINGER KODENDE FOR IL-18BP

Total RNA fra Jurkat T-celler ("CRL 8163, American Type Culture Collection") ble reverstranskribert med Super-Script RNase H-revers transkriptase (Gibco-BRL) og tilfel-
5 dige primere ("Promega, Madison WI"). De resulterende cDNA-fragmenter ble så amplifisert ved PCR, ved anvendelse av Taq DNA-polymerase (Sigma) og primere korresponderende med TIGR-kloning THC123801 nukleotider 24-44 (sense) og 500-481 (revers). Amplifikasjonen ble gjort i 30 sykluser av her-
10 ding (55°C, 2 min.) og ekstensjon (70°C, 1 min.). De resulterende PCR-produkter ble gjenoppløst ved agarose- (1%) gel-elektroforese, eluert og klonet inn i pGEM-Teasy TA-kloningvektor (Promega). DNA fra individuelle kloninger ble sekvensert med T7 og SP6-primere. Det resulterte 477 bp-
15 fragment ble merket ³²P ved vilkårlig priming. Denne prøve ble anvendt for å undersøke ulike humane cDNA og genomiske biblioteker. Duplikate nitrocellulosefiltre ble fremstilt og hybridisert med prøven ved 60°C i en buffer bestående av 6XSSC, 10 X Denharts oppløsning, 0,1% SDS og 100µg/ml lakse-
20 melke-DNA. Filtrene ble vasket og eksponert over natten ved -80°C mot Kodak XAR-film. Doble positive kloninger ble plakkrenset. Plasmider ble fjernet fra λpCEV9-kloninger og selvlignet. CDNA-kloner fra andre biblioteker ble isolert ifølge forhandlers instruksjoner.

25 Automatisert DNA-sekvensanalyse av de isolerte kloner ble utført med "Models 373A" og "377"-sekvenser (Applied Biosystems) ved anvendelse av sense- og antisenseprimere. Standardprotokoller ble anvendt ved disse kloningsprosedyrer (33). Følgende biblioteker ble undersøkt: et humant
30 monocytt cDNA-bibliotek, konstruert i λpCEV9-kloningsvektor (15), levert av T.Miki; et humant Jurkat leukemisk T-celle-DNA-bibliotek, et humant perifert blodleukocytt-cDNA-bibliotek og et human milt-cDNA-bibliotek, alle fra Clontech (Palo Alto, CA). Et humant morkakegenomisk bibliotek i
35 lambda FIX II-vektor var fra Strata-gene (La Jolla, CA). Alle cDNA-kloner korresponderte med fire ulike IL-18BP

spleisevarianter ble oppnådd og karakterisert. Alle spleisevarianter kodet for forsøksvis oppløselige skjulte proteiner. Den mest fremtredende (IL-18- BPa) hadde en åpen leseramme på 192 kodoner, kodende for et signalpeptid på 28 aminosyreresiduer etterfulgt av et modent forsøksvis IL-18BPa, hvis første 40 residuer (sekvens-ID nr. 10) passet perfekt med N-terminalproteinsekvensen fra urin-IL-18BP (sekvens-ID nr. 2). Plasseringen av cystinrestene anslo at dette polypeptid tilhører immunoglobulin-(Ig)-superfamilien. Hvert av de fire Gln-residuer innen modne IL-18BPa var et potensielt N-glykosyleringssted. De tre andre spleisevarianter av IL-18BP var signifikant mindre fremtredende. Et annet 1 kbb IL-18BP-cDNA kodet for et modent protein på 85 aminosyreresiduer (sekvens-ID nr. 4). En tredje variant, IL-18BPc var representert ved et 2,3 kb cDNA, kodende for et modent IL-18BP på 169 aminosyrerester (sekvens-ID nr. 6). Den fjerde variant, IL-18BPd kodet foret modent IL-18BP på 133 aminosyreresiduer (sekvens-ID nr. 8). *In-exon-spleising* oppstod på to steder langs pro-mRNA. Disse hendelser og et ytterligere 5' exon i IL-18BPd gav økning til 3 ulike 5'-UTR i de ulike cDNA-klonene. Det er derfor nokså mulig at ulike IL-18BP-varianter kan genereres i respons til distinkte transkripsjonsregulerings signaler. Ingen cDNA-koding for en reseptor med et transmembrandomene har ennå blitt funnet.

EKSEMPEL 7: KONSTRUKSJON AV EN PATTEDYR-UTTRYKKENDE VEKTOR. FREMSTILLING AV REKOMBINANT IL-18BP, OG EVALUERING AV DE BIOLOGISKE AKTIVITETER VED REKOMBINANT IL-18BP.

Kodingsregionen ved IL-18BPa-cDNA ble amplifisert med PCR med sense-primer 5' TATATCTAGAGCCACCATGACACAACCTGGACACCA

og revers-primer:

5' ATATCTAGATTAATGATGATGATGATGATGACCCTGCTGCTGGGACTGC.

PCR-produktet ble kuttet med Xba I og klonet inn i Xba I-plassen i pEF-BOS-ekspresjonsvektoren (25), til utbytte pEF-BOS-IL-18BPa. Konstruksjonene ble bekreftet med DNA-sekvensering. Satser av 6×10^7 COS7-celler i 1,4 ml TD-bu-
5 fer ble inkubert i 30 minutter ved romtemperatur, som beskrevet (35). Cellene ble så vasket med DMEM -10% FBS be-
lagt i 4 timer i DMEM-10, vasket og inkubert i 3 til 5 døgn i serumfri DMEM. Kulturmiddelet ble oppsamlet, konsentrert
6 ganger ved ultrafiltrering ("10 kD cutoff) og IL-18BP-
10 His₆ ble isolert i en Talon-kolonne ("Clontech") med imida-
sol som utslemningsmiddel i følge produsentens instruksjo-
ner. Immunologisk kryssreaktivitet til urinet og det COS7-
ekspresjonerte IL-18BP ble vurdert som følger: urin-IL-18BP
(5µg) ble merket med ¹²⁵I ved kloramin T-prosedyren. Super-
15 natanter fra COS7-celler (250 µl) ble blandet (1 time, rom-
temperatur, sluttvolum 500 µl) med antistoffet med urin-IL-
18BP, oppløst 1:1000 i fosfatbuffert salin (PBS), 0,05%
Tween 20 og 0,5% bovinserumalbumin ("wash Buffer"). ¹²⁵I-
merket urin-IL-18BP (10⁶ cpm) ble så tilført og etter 1
20 time ble proteinet G-sefarose (20µl) tilført. Blandingen
ble suspendert (1,5 timer, 4°C), dråpene ble deretter iso-
lert og vasket 3 ganger med "Wash Buffer" og en gang i PBS.
Dråpene ble deretter eluert med en prøvebuffer, gjenoppløst
med SDS-PAGE (10% akrylamid) under reduserende forhold et-
25 terfulgt av autoradiografi. IL-18BPa ble ført som et en-
keltbånd i SDS-PAGE med sølvfarging under reduserende og
ikke-reduserende forhold og hadde samme obserterte moleky-
masse som urin-IL-18BP (data ikke vist). Proteinsekvens-
analyse av denne fremstillingen avslørte den samme N-termi-
30 nalsekvens som den i urin-IL-18BP, indikerende at sist-
nevnte ikke ble degradert ved sin N-terminalen. Immunoblot-
analyse av IL-18BPa med antistoffer som stod mot urin-IL-
18BP avslørte det samme molekyllære massebånd som i urin-
proteinet. Videre, ved anvendelse av immunopresipitasjon,
35 etterfulgt av SDS-PAGE og autoradiografi, var IL-18BPa i
stand til å fjerne urin-¹²⁵I-IL-18BP ved å binde seg til an-
tistoffet. Derfor korresponderer IL-18BPa strukturelt til
urin-IL-18BP. Rått og rensert IL-18BPa ble testet for dets

egenskap til å hindre den biologiske aktivitet av IL-18. IL-18BPa hindret, på en doseavhengig måte, den IFN- γ -induserende aktivitet i humant og muse-IL-18 i murine splenocytter, PBMC og den humane KG-1-cellelinje (figur 9). Resultatene fra de ulike bioprøvene så vel som "mobility shift"-prøve (eksempel 8) demonstrerte at hindring av IL-18-aktivitet er en intrinsik egenskap ved det klonede IL-18BP og ikke ved noen av de andre følgende urenheter i urin-IL-18BP, så som det sam-eluerende fragment av defensin.

EKSEMPEL 8: ELEKTROFORETISKE MOBILITETS-SKIFTEPRØVER

Effekten av urinen og den rekombinante IL-18-induserte aktivisering av NF- κ B i humane KG-1-celler ble også studert. Humane KG-1-celler (4×10^6 i 1 ml RPMI) ble stimulert med enten huIL-18 forbehandlet med et IL-18BP (20 min., romtemperatur). Etter 20 minutter ved 37°C ble cellene vasket tre ganger med iskald PBS og umiddelbart frosset i flytende nitrogen. Cellepelleter ble resuspendert i tre ganger det pakkede cellevolum i buffer A (20 mM Tris pH 7,6, 0,4M NaCl, 0,2 mM EDTA, glyserol (20 volum-%), 1,5 mM MgCl₂, 2 mM ditiotreititol (DDT), 0,4 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 2 μ g/ml hver av leupeptin, pepstatin og aprotinin). Celleavfall ble fjernet ved sentrifugering (15.000xg, 15 min.), aliquoter fra supernatanten ble frosset i flytende nitrogen og oppbevart ved -80°C. Proteinkonsentrasjon ble fastslått av en Bradford-prøve (Bio-Rad) ved å anvende bovinserumalbumin som standard. Et dobbeltkjedet oligonukleotid korresponderende med NF- κ B-bindingselement (10 pmol, Promega) ble merket [³²P]dCTP (300 Ci/mmol) og T4 polynukleotidkinase ("New England Biolabs"). Frie nukleotider ble fjernet med en spinnekolonne. Ekstrakter (10 μ g protein) av celler behandlet med IL-18 eller IL-18 pluss IL-18BP ble inkubert (15 min., romtemperatur) med den merkede prøve (3×10^4 cpm) sammen med poly-dI.dC (500 ng, Pharmacia) og denaturert laksemelke-DNA (100 ng, Sigma) i 20 μ l buffer bestående av HEPES (pH 7,5, 10mM), 60 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 1

mM DTT og glyserol (5 volum-%). Blandingene ble deretter lagt på 5% ikke-denaturerende polyakrylamidgeler. Elektroforese ble utøvet ved 185 V i 0,5XTBE (40 mM Tris HCl, 45 mM borsyre og 2,5 mM EDTA). Geler ble vakuomtørket og autoradiografert over natten ved -80°C . IL-18 viste seg å indu-
5 sere dannelsen av p50 NF- κ B homodimer og p65/p50 NF- κ B heterodimer. Urin så vel som rekombinant IL-18BP hindret aktiveringen av NF- κ B hos IL-18, som fastslått ved en elektroforetisk mobilitetsskifteprøve med KG-1-celleekstrakter
10 bindende et radiomerket oligonukleotid tilsvarende NF- κ B-konsensussekvensen.

EKSEMPEL 9: EKSPRESJON AV IL-18BP I E.COLI-, GJÆR- OG INSEKTCELLER.

IL-18BP kan også fremstilles ved andre rekombinante celler
15 så som prokaryote celler, f.eks E. coli, eller andre eukaryote celler, så som gjær- eller insektceller. Velkjente metoder er tilgjengelige for konstruksjon av egnede vektorer, som bærer DNA som koder for enten IL-18BP og egnede for transformering av E. coli- og gjærceller, eller infisering av insektceller for å kunne fremstille rekombinant
20 IL-18BP. For ekspresjon i gjærceller, blir DNA som koder for IL-18BP (eksempel 6) kuttet ut og satt inn i ekspresjonsvektorer egnede for transfeksjon av gjærceller. For ekspresjon i insektceller, blir DNA som koder for IL-18BP
25 satt inn i bakulovirus og insektcellene blir infisert med nevnte rekombinante bakulovirus. For ekspresjon i E. coli, blir DNA som koder for IL-18BP utsatt for seterettet mutagenese med egnede oligonukleotider, slik at et innledende ATG-kodon settes inn rett før det første kodon ved et mo-
30 dent IL-18BP. Alternativt kan slikt DNA fremstilles med PCR med egnede sens- og antisensprimere. De resulterende cDNA-konstruksjoner blir så innsatt i egnede konstruerte prokaryote ekspresjonsvektorer med kjente teknikker (23).

EKSEMPEL 10: KONSTRUKSJON AV ADENO-ASSOSIERT EKSPRESJONS-
35 VEKTOR FOR IN VIVO-EKSPRESJON AV IL-18BP.

Et funksjonelt gen kodende for IL-18BPa blir konstruert basert på plasmid pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA). IL-18BP-cDNA med en Kozak konsensussekvens ved 5' ende er ligert inn i Xba I-stedet ved pcDNA3 på en måte som ødelegger restriksjonsstedet. Nye Xba I-seter er satt inn med setorientert mutagenese før neomysinkassetten (base 2151 til den originale pcDNA3-sekvens) og etter SV40-polyadenylasjonsignalet (base 3372 til den originale pcDNA3-sekvens). Denne konstruksjon blir så kuttet med Xba I og det resulterende 4,7 kb minigen blir satt inn i Xba I-setet i plasmid psub201 som beskrevet ("Snyder et al, 1996, Current Protocols in Human Genetics , Chapters 12.1.1-12.1.17, John Wiley & Sons"). Det resulterende rekombinante plasmid blir kotransfektet med hjelper AAV-plasmid-pAAV/Ad og cellene blir samlet opp etter 48-60 timer med inkubering. Cellene utsettes for 3 fryse- og tinnings-sykluser, celleavfallet fjernes ved sentrifugering, og supernatanten blir øket til 33% metning med ammoniumsulfat. Blandingen blir deretter sentrifugert og rAAV blir presipitert fra supernatanten ved å bringe ammoniumsulfatet til 50% metning. Viruset blir videre rensert med CsCl, dialysert og endelig varmet i 15 min ved 56°C for å ødelegge ethvert adenovirus.

EKSEMPEL 11: KONSTRUKSJON AV REKOMBINANTE FUSJONSPROTEINER HOS IL-18BP.

Fremstillingen av proteiner som omfatter IL-18BP sammensatt til den konstante region ved IgG2 tung kjede kan utføres som følger: DNA ved IL-18BP blir utsatt for seterettet mutagenese med egnede oligonukleotider slik at et unikt restriksjonssted introduseres umiddelbart før og etter kodingssekvensene. Et plasmid som bærer den konstante region av IgG2 tung kjede, f.eks pRKCO42Fc1(6) blir utsatt for liknende seterettet mutagenese for innføring av samme unike restriksjonssted så nært Asp 216 av IgG1 tung kjede som mulig på en måte som tillater translasjon i fase av fusjonsproteinet. Et dsDNA-fragment, bestående av 5' ikke-translaterte sekvenser og kodende for IL-18BP blir fremstilt ved

spalting av de unike restriksjonsseter eller alternativt ved PCR med egnede dannede primere. Det muterte pRKCD42Fc1 blir spaltet tilsvarende for å generere et stort fragment inneholdende plasmidet og IgG1-sekvensene. De to fragmen-
5 tene blir ligert for å generere et nytt plasmid, kodende en polypeptidforløper bestående av IL-18BP og omkring 227 C-terminalaminosyrer av IgG1-tunge kjeder (hengselregion og CH2- og CH3-domener). DNA-kodende funksjonsproteiner kan isoleres fra plasmidet med spalting med egnede restriksjons-
10 sjonszymer og deretter innføring i effektive prokaryote eller eukaryote ekspresjonsvektorer.

EKSEMPEL 12: FREMSTILLING AV KJEMISK MODIFISERTE IL-18BP.

For å kunne øke halveringstiden til IL-18BP i plasma, kan IL-18BP som er kjemisk modifisert med polyetylen glykol
15 (PEG), fremstilles. Modifiseringen kan utføres ved å kryssbinde PEG med et cystinresiduum av IL-18BP-molekylene. Mutante IL-18BP kan konstrueres som inneholder et ekstra cystinresiduum med aminoterminalen, glykosyleringssteder, og karboksylterminalen til hvert enkelt IL-18BP. Mutagenesen kan utføres med PCR ved anvendelse av oligonukleotider
20 som inneholder den ønskede mutasjon. Disse mutante proteiner blir uttrykt på vanlig måte som kjent fra teknikken. Pegylering av disse proteiner vil bli utført, og aktiviteten vil bli vurdert.

25 EKSEMPEL 13: FREMSTILLING AV POLYKLONALE ANTISTOFFER TIL IL-18BP.

Kaniner ble injisert subkuttant med 5µg med en rent fremstilt urin-IL-18BP, emulgert i fullstendig "Freunds"-adjuvant. Tre uker senere ble de igjen subkuttant injisert med 5
30 µg av IL-18BP-produktet i ufullstendig "Freunds"-adjuvant. To ytterligere injeksjoner med IL-18BP som oppløsning i PBS ble utført med et intervall på 10 dager. Kaninene ble tappet 10 dager etter siste immunisering. Utviklingen av antistoffnivå ble utført med radioimmunassay. ¹²⁵I-merket

IL-18BP (166.000 cpm) ble blandet med ulike oppløsninger (1:50, 1:500, 1:5.000 og 1:50.000) av kaninserumet. En suspensjon av protein-G-agarosedråper (20 µl, Pharmacia) ble tilført i et totalt volum på 200 µl. Blandingen fikk stå en
5 time i romtemperatur, dråpene ble deretter vasket tre ganger og bundet radioaktivitet ble målt. Kanin-antiserum til humant leptin ble anvednt som en negativ kontroll. Titrérvæsken til IL-18R-antiserum var mellom 1:500 og 1:5.000, mens den fra negativ kontroll var mindre enn 1:50.

10 EKSEMPEL 14: FREMSTILLING AV MONOKLONALE ANTISTOFFER TIL IL-18BP.

Balb/C-hunnmus (3 måneder gamle) blir først injisert med 2 µg rensset IL-18BP i en emulsjon av fullstendig "Freunds"-adjuvant, og tre uker senere subkutant i ufullstendig
15 "Freunds"-adjuvant. Tre ytterligere injeksjoner blir gitt med 10 dagers intervaller, subkutant i PBS. Endelige injiseringer blir gitt intraperitonealt til musa 4 og 3 dager før fusjon, noe som gav den høyeste bindingstitrérvæske som fastslått med IRIA (se nedenfor). Fusjon utføres ved anvendelse av NSO/1-myelomacellelinje og lymfocytter fremstilt
20 fra både milten og lymfeknutene til dyret som fusjonspartner. De fuserte cellene distribueres inn i mikrokulturplater og hybridomene velges ut i DMEM supplementert med HAT og 15% serum fra hest. Hybridomer som viser seg å produsere
25 antistoffer mot IL-18BP blir subklonet ved den be-grensede fortynningsmetode og injisert i Balb/C-mus som har blitt primet med pristan for produksjon av bukvæske. Isotypene av antistoffene blir funnet ved anvendelse av en kommersielt tilgjengelig ELISA-anordning (Amersham, UK). Utvelgelsen av
30 hybridomer som produserer anti-IL-18BP-monoklonale antistoffer blir utført som følger: hybridomsupernatanter blir testet for tilstedeværelse av anti-IL-18BP-antistoffer ved et invert fastfase radioimmunassay (IRIA). Elisa-plater ("Dynatech Laboratories, Alexandria, VA") blir belagt med
35 Talon-renset IL-18BPα-His₆ (10 µg /ml, 100 µl/brønn). Etter følgende inkubasjon over natten ved 4°C, blir platene vas-

ket to ganger med PBS inneholdende BSA (0,5%) og Tween (0,05%) og blokkert i vaskeoppløsning i minst 2 timer ved 37°C. Hybride kultursupernatanter (100 µl/brønn) blir lagt til og platene blir inkubert i 4 timer ved 37°C. Platene
5 blir vasket i 3 timer, og et konjugat av geit-anti-mus-pepperrotperoksidase (HRP, Jackson Labs, 1:10.000, 100µl/brønn) blir lagt til i 2 timer ved romtemperatur. Platene blir vasket 4 ganger og fargen blir fremkalt av ABTS ("2,2'-azino-bis" (3-etylbenzotiazolin-6-sulfonsyre, Sigma)) med H₂O₂ som et substrat. Platene blir lest av en
10 automatisk ELISA-leser. Prøver som gir OD som er minst 5 ganger høyere enn den negative kontrollverdien blir regnet som positive.

EKSEMPEL 15: AFFINITETSKROMATOGRAFI AV IL-18BP MED MONO-
15 KLONALE ANTISTOFFER.

Antistoffer mot IL-18BP blir anvendt for rensing av IL-18BP ved affinitetskromatografi. Bukvæske inneholdende det monoklonale antistoff dannet av hybridomet blir rensset med ammoniumsulfatpresipitasjon ved 50% metning etterfulgt av
20 ekstensiv dialyse mot PBS. Omkring 10 mg av immunoglobuliner blir bundet til 1 ml Affigel 10 ("BioRad, USA") som spesifisert fra produsenten. 250 ml av humane urinproteiner (tilsvarende 250 l råurin) er lagt til 0,5 ml av anti-IL18BP-antistoffkolonnen ved 4°C med en flytgrad på 0,25
25 ml/min. Kolonnen blir vasket med PBS inntil intet protein blir detektert i vaskingene. IL-18BP elueres med 25 mM sitronsyrebuffer, pH 2,2 (8 x 1 kolonnevolumfraksjoner) og umiddelbart nøytralisert med 1 M Na₂CO₃. Videre rensing av denne fremstilling blir oppnådd ved størrelsessekskluderende
30 kromatografi.

EKSEMPEL 16: ELISA-TEST

Mikrotirérplater ("Dynatech" eller "Maxisorb", av Nunc) blir belagt med anti-IL-18BP-monoklonalt antistoff (serumfrie hydride supernatanter eller bukvæske-immunoglobuliner)

over natten ved 4°C. Platene blir vasket med PBS inneholdende BSA (0,5%) og Tween 20 (0,05%) og blokkert i samme oppløsning i minst 2 timer ved 37°C. De testede prøvene fortynnes i blokkeringsoppløsningen og tilsettes brønnene (100 µl/brønn) i 4 timer ved 37°C. Platene vaskes deretter i 3 timer med PBS-holdig Tween 20 (0,05%) etterfulgt av tilsetning av kanin-anti-IL-18BP-serum (1:1.000, 100 µl/brønn) for videre inkubering over natten ved 4°C. Platene blir vasket 3 ganger og et konjugat av geit-anti-mus-pepperrot-peroksidase (HRP, jackson Labs, 1:10.000, 100µl/brønn) blir lagt til i 2 timer ved romtemperatur. Platene blir vasket 4 ganger og fargen blir fremkalt med ABTS ("2,2'-azino-biz" (3-etylbenztiasolin-6-sulfonsyre, Sigma)) med H₂O₂ som et substrat. Platene blir lest av en automatisk ELISA-leser.

EKSEMPEL 17: IKKE-GLYKOSYLERT HUMANT IL-18BP ER BIOLOGISK AKTIVT.

Renset rekombinant IL-18BPa ble testet for dets egen-skap til å hindre den biologiske aktivitet hos IL-18. IL-18BPa hindret, avhengig av dosen, IFN-γ-induserende aktivitet hos humant- og mus-IL-18 i murine splenocytter, PBMC og de humane KG-1-cellelinjer (figur 9).

Renset IL-18BPa som har et His₆-merke ved C-terminalen (1,5 µg, 50 µl) ble justert til pH 7,5 og blandet med N-glykosidase F (3 µl, 500.000 U/ml, PNGase, F, New England Biolabs). Blandingen ble inkubert i 24 timer ved 37°C under ikke-denaturerende forhold. Aliquoter fra prøven og fra uspaltet IL-18BP-his₆ ble analysert ved SDS-PAGE under ikke-reduserende forhold etterfulgt av immunoblotting med antistoffer mot IL-18BP. Det ble påvist at ~40 kD-båndet til IL-18BP-His₆ forsvant i den PNGase-behandlede fraksjon og et nytt ~20 kD-bånd ble oppnådd. Den molekylære masse til produktet og spesifisiteten av PNGase F indikerte at IL-18BP-His₆ ble helt og holdent deglykosylert. Den PNGase-behandlede fraksjon, uspaltet IL-18BP-His₆ og kontroll-

prøve inneholdende PNGase i buffer ble absorbert separat i Talon-dråper, vasket med fosfatbuffer og eluert med imidazol (100 mM). De eluerte fraksjoner ble utsatt for bioassay ved anvendelse av humant IL-18BP (20 ng/ml), LPS (2 5 µg/ml) og murine splenocytter. Resultatene er vist i følgende tabell:

<u>Prøve</u>	<u>IFN-γ (ng/ml)</u>
kontroll	7,5
Ufordøyd IL-18BP-His ₆	0
PGNase-behandlet IL-18BP-His ₆	0

Derfor er det konkludert at deglykosylert IL-18BP er biologisk aktivt som en modulator av IL-18-aktivitet.

P a t e n t k r a v

1. IL-18-bindende protein (IL-18BP),
k a r a k t e r i s e r t v e d at det er valgt fra
gruppen bestående av:
 - 5 (a) polypeptider omfattende aminosyresekvensene SEQ ID NO:
2 eller 6;
 - (b) polypeptider som definert i (a) uten en ledersekvens;
 - (c) muteiner som har minst 80% homologi med IL-18BP som de-
finert i (a) eller (b), kondenserte proteiner, kjemisk mo-
10 difiserte derivater, sirkulært permuterte derivater og
blandinger derav av polypeptidene definert i (a) eller (b);
og som binder til IL-18 og blokkerer IL-18-indusert produk-
sjon av IFN- γ .
2. IL-18BP ifølge krav 1,
15 k a r a k t e r i s e r t v e d at det er et ikke-vi-
ralt protein.
3. IL-18BP ifølge krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det er et humant
protein.
- 20 4. IL-18BP ifølge ethvert av kravene 1 til 3,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det har en molekyl-
vekt på omkring 40 kD.
5. IL-18BP ifølge ethvert av kravene 1 - 4,
k a r a k t e r i s e r t v e d at fusjonsproteinet om-
25 fatter et immunoglobulin eller et fragment derav.
6. IL-18BP ifølge krav 5,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det er et fusjonspro-
tein valgt fra IL-18BP kondensert til det konstante område
av IgG2 tung kjede.

7. IL-18BP ifølge ethvert av kravene 1 til 6,
k a r a k t e r i s e r t v e d at de kjemisk modifi-
serte derivater innbefatter polyetylenglykol sidekjeder.
8. IL-18BP ifølge ethvert av kravene 1 til 7,
5 k a r a k t e r i s e r t v e d at de eksisterer i opp-
løselig form.
9. IL-18BP ifølge ethvert av kravene 1 til 8.
k a r a k t e r i s e r t v e d at de er glykosylert.
10. IL-18BP ifølge ethvert av kravene 1 til 8,
10 k a r a k t e r i s e r t v e d at de er ikke-glykosy-
lert.
11. DNA-molekyl,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det koder for et IL-
18BP ifølge ethvert av kravene 1 til 10.
- 15 12. DNA-molekyl ifølge krav 11,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det er utstyrt med
et stopp-kodon ved sin 3' ende.
13. DNA-molekyl,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter DNA-
20 sekvensene i SEQ ID NO: 1 eller 5, hvor nevnte DNA koder
for et IL-18BP ifølge ethvert av kravene 1 til 10.
14. DNA-molekyl ifølge ethvert av kravene 11 til 13,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det er operativt
forbundet til andre DNA-sekvenser som letter ekspresjon, så
25 som promotere eller forsterkere.
15. DNA-molekyl ifølge ethvert av kravene 11 til 14,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det er et genomisk
DNA.

16. DNA-molekyl ifølge ethvert av kravene 11 til 15,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det er et cDNA.
17. cDNA-molekyl ifølge krav 16,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter en
5 cDNA-sekvens valgt fra gruppen av DNA-sekvenser av SEQ ID
NO: 1 og 5.
18. cDNA-molekyl ifølge krav 16 til 17,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det er tilpasset for
ekspresjon i en bakteriell vertsorganisme.
- 10 19. Replikerbar vektor,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter et DNA-
molekyl ifølge ethvert av kravene 11 til 18.
20. Transformert vertscelle omfattende en vektor ifølge
krav 19.
- 15 21. Transformert vertscelle ifølge krav 20,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den er en eukaryot
celle.
22. Transformert vertscelle ifølge krav 21,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den er en pattedyr-
20 celle.
23. Transformert vertscelle ifølge krav 22,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den er valgt fra hu-
mane-, ape-, muse- og kinesisk hamster ovarie (CHO) -cel-
ler.
- 25 24. Transformert vertscelle ifølge krav 20,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den er en prokaryot
celle.
25. Fremgangsmåte ved fremstilling av IL-18BP ifølge et-
hvert av kravene 1 til 10,

k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter å dyrke en vertscelle ifølge ethvert av kravene 20 til 24 under betingelser som er egnet for ekspresjon av nevnte IL-18BP.

26. Fremgangsmåte for fremstilling av IL-18BP ifølge krav
5 25,

k a r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere omfatter å isolere nevnte IL-18BP.

27. Antistoff,

10 k a r a k t e r i s e r t v e d at det spesifikt reagerer med sekvensen vist i SEQ ID NO: 2 eller 6.

28. Antistoff ifølge krav 27,

k a r a k t e r i s e r t v e d at det er et polyklo-
nalt antistoff.

29. Antistoff ifølge krav 28,

15 k a r a k t e r i s e r t v e d at det er et monoklo-
nalt antistoff.

30. Antistoff ifølge krav 29,

k a r a k t e r i s e r t v e d at det er et chimerisk
antistoff.

20 31. Antistoff ifølge krav 30

k a r a k t e r i s e r t v e d at det er et humanisert
antistoff.

32. Anti-idiotypisk antistoff,

25 k a r a k t e r i s e r t v e d at det er et antistoff
til antistoffet ifølge krav 27.

33. Fremgangsmåte for isolering av IL-18BP ifølge krav 1
eller 2,

k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter:

- (a) å passere en human væske gjennom en kromatografikolonne til hvilken IL-18BP er koblet,
- (b) å eluere proteinet som binder til IL-18, og
- (c) å rense nevnte protein.

- 5 34. Sammensetning for farmasøytisk anvendelse, karakterisert ved at den omfatter IL-18BP ifølge ethvert av kravene 1 til 10 eller en viruskodet homolog av IL-18BP som binder til IL-18 og blokkerer IL-18-indusert produksjon av IFN- γ .
- 10 35. Sammensetning for farmasøytisk anvendelse, karakterisert ved at den omfatter et DNA som koder for IL-18BP ifølge ethvert av kravene 1 til 10 eller et DNA som koder for en viruskodet homolog av IL-18BP som binder til IL-18 og blokkerer IL-18-indusert produksjon
15 av IFN- γ .
36. Anvendelse av IL-18BP ifølge ethvert av kravene 1 til 10 eller av en viruskodet homolog derav som definert i krav 34, ved fremstilling av en farmasøytisk sammensetning til behandling av autoimmune sykdommer.
- 20 37. Anvendelse av IL-18BP ifølge ethvert av kravene 1 til 10 eller av en viruskodet homolog derav ved fremstilling av en farmasøytisk sammensetning til behandling av type-I diabetes.
- 25 38. Anvendelse av IL-18BP ifølge ethvert av kravene 1 til 10 eller av en viruskodet homolog derav som definert i krav 34 ved fremstilling av en farmasøytisk sammensetning til behandling av sepsis.
- 30 39. Anvendelse av IL-18BP ifølge ethvert av kravene 1 til 10 eller av en viruskodet homolog derav som definert i krav 34 ved fremstilling av en farmasøytisk sammensetning til behandling av transplantatavstøtninger.

40. Anvendelse av IL-18BP ifølge ethvert av kravene 1 til 10 eller av en viruskodet homolog derav som definert i krav 34 ved fremstilling av en farmasøytisk sammensetning til behandling av reumatoid artritt.
- 5 41. Anvendelse av IL-18BP ifølge ethvert av kravene 1 til 10 eller av en viruskodet homolog derav som definert i krav 34 ved fremstilling av en farmasøytisk sammensetning til behandling av inflammatorisk tarmsykdom.
- 10 42. Anvendelse av IL-18BP ifølge ethvert av kravene 1 til 10 eller av en viruskodet homolog derav som definert i krav 34, ved fremstilling av en farmasøytisk sammensetning til behandling av multippel sklerose.
- 15 43. Anvendelse av IL-18BP ifølge ethvert av kravene 1 til 10 eller av en viruskodet homolog derav som definert i krav 34, ved fremstilling av en farmasøytisk sammensetning til behandling av ischemisk hjertesykdom innbefattende akutt hjertesvikt.
- 20 44. Anvendelse av IL-18BP ifølge ethvert av kravene 1 til 10 eller av en viruskodet homolog derav som definert i krav 34, ved fremstilling av en farmasøytisk sammensetning til behandling av ischemisk hjerneskade.
- 25 45. Anvendelse av IL-18BP ifølge ethvert av kravene 1 til 10 eller av en viruskodet homolog derav som definert i krav 34, ved fremstilling av en farmasøytisk sammensetning til behandling av psoriasis.
46. Anvendelse av IL-18BP ifølge ethvert av kravene 1 til 10 eller av en viruskodet homolog derav som definert i krav 34, ved fremstilling av en farmasøytisk sammensetning til behandling av akutt eller kronisk hepatitt.
- 30 47. Anvendelse av IL-18BP ifølge ethvert av kravene 1 til 10 eller av en viruskodet homolog derav som definert i krav

34, ved fremstilling av en farmasøytisk sammensetning til behandling av akutt eller kronisk pankreatitt.

48. Anvendelse av IL-18BP ifølge ethvert av kravene 1 til 10 for opprensning av IL-18.

5 49. Anvendelse av antistoffene ifølge ethvert av kravene 27 til 31 i et assay for påvisning av IL-18BP.

10 50. Anvendelse av et DNA-molekyl som koder for IL-18BP ifølge ethvert av kravene 1 til 10 eller som koder for en viruskodet homolog derav som definert i krav 34 for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning til genterapi.

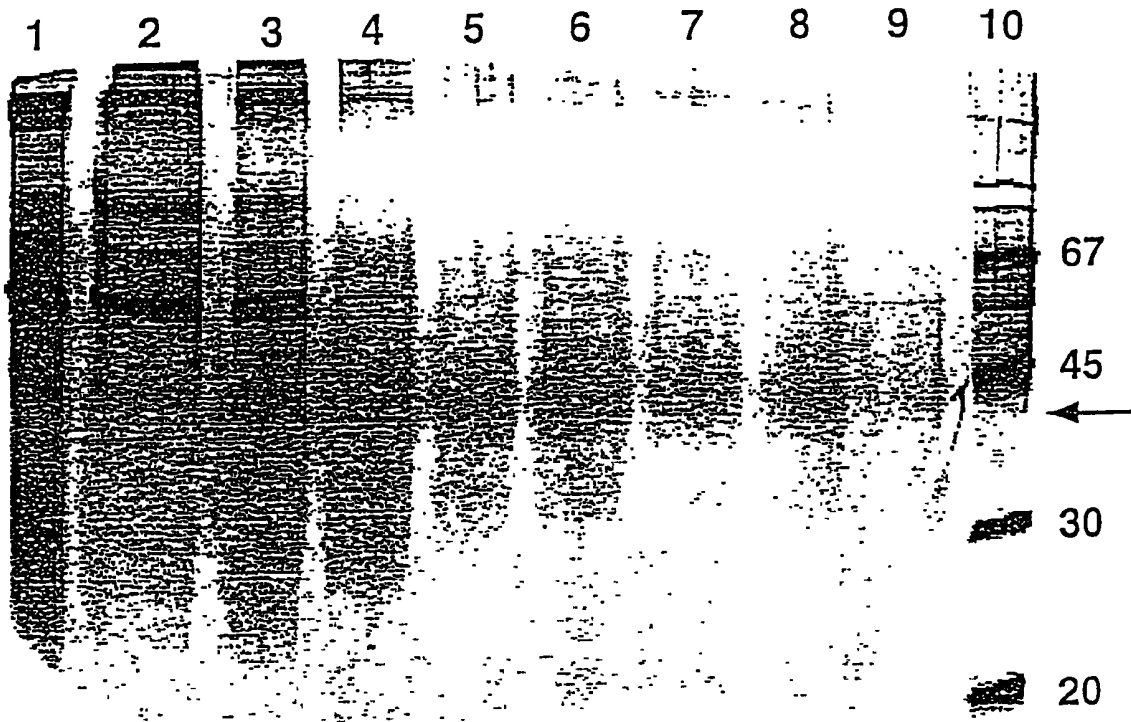


FIG. 1

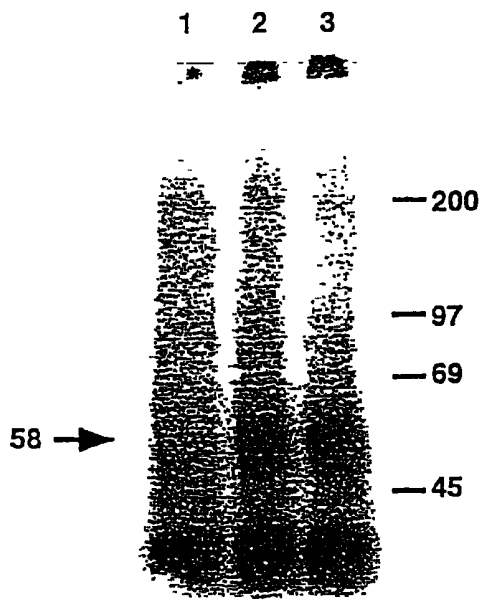


FIG. 2

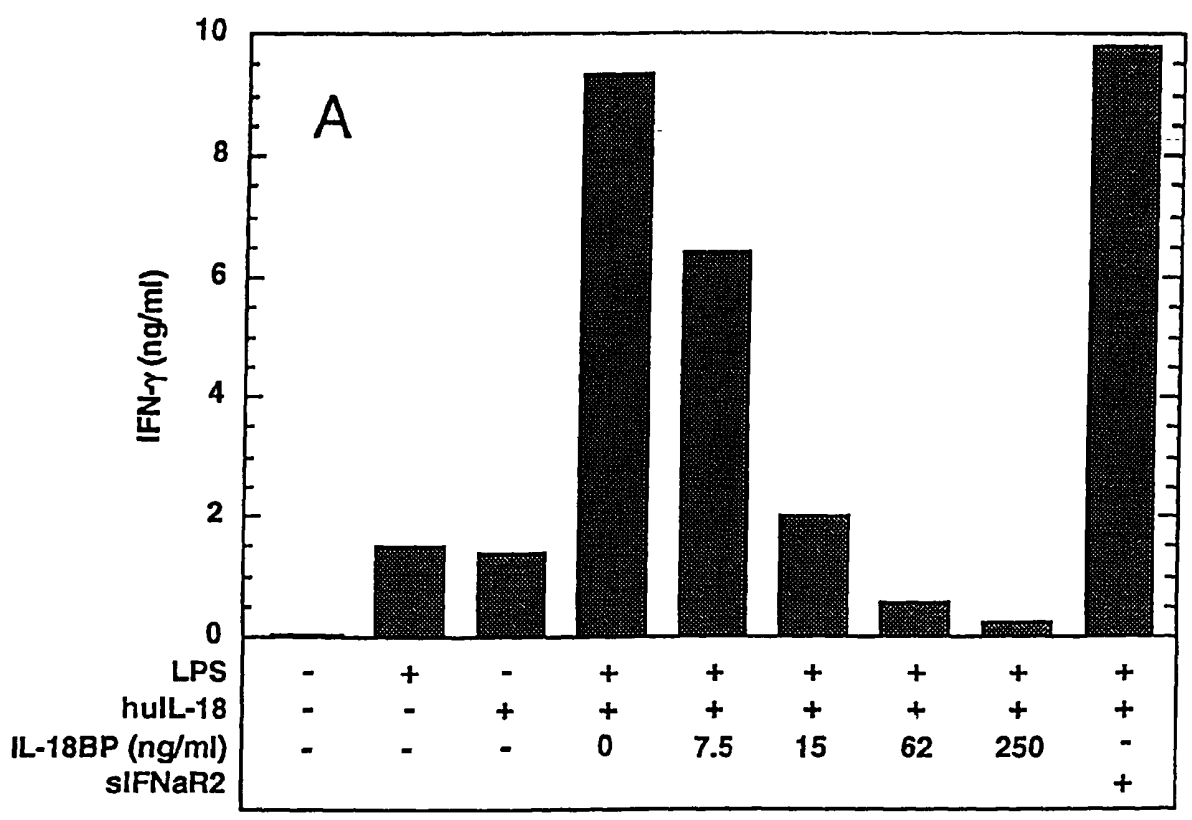


Fig. 3A

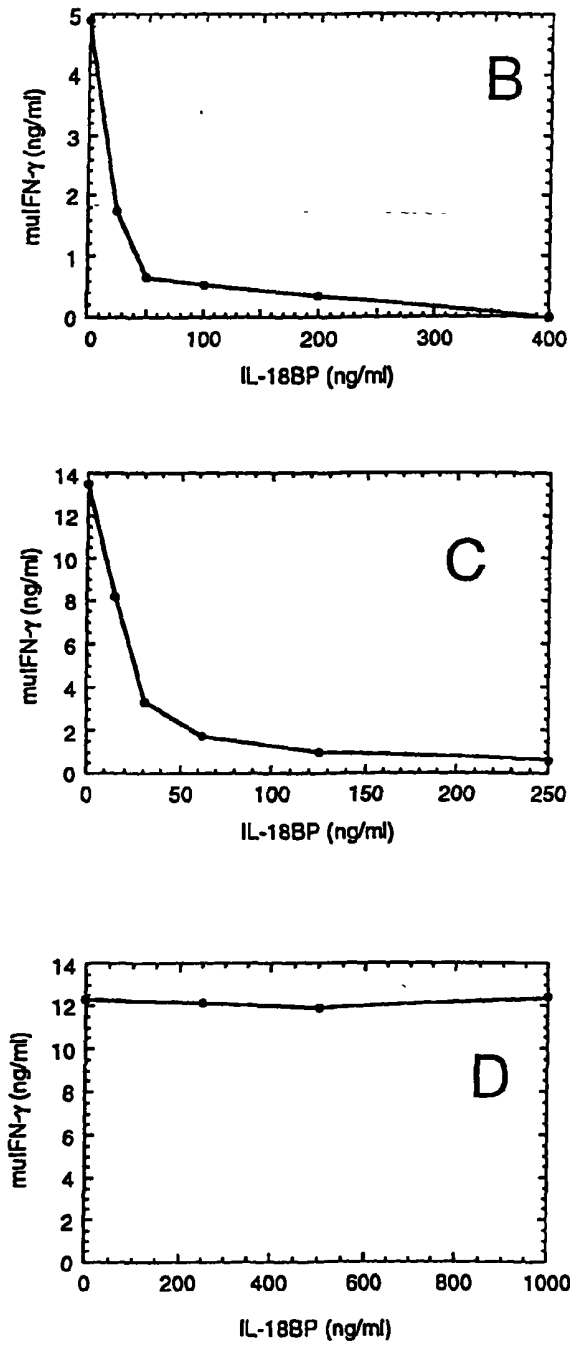


Fig. 3 B-D

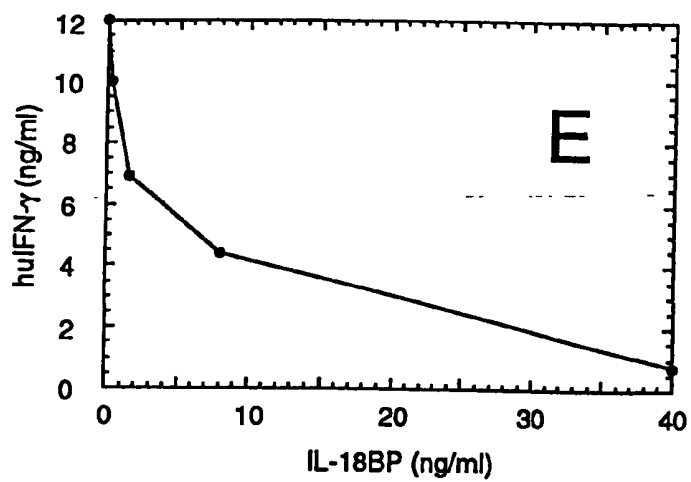


Fig. 3E

6/25

IL-18Bpa; DNA-sekvens :

Lengde: 1348 14. desember 1997 15:41 Type: N Sjekk: 2207..

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

Fig. 4

7/25

1251 GGATCCACAC TGTATCTGTG TCATCCCCAC ATGGGTCCTC ATAAAGGATT

1301 ATTCAATGGA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

(SEKV. ID NR. : 1)

IL-18Bpa; Proteinsekvens :

Lengde: 182 5. juni 1998 13:39 Type: P Sjekk: 3073..

-1 MRHNWTPDLS-PLWVLLLCAH VVTLLVRATP VSQTTTAATA SVRSTKDPCP

51 SQPPVFPAAK QCPALEVTWP EVEVPLNGTL SLSCVACSRF PNFSILYWLG

101 NGSFIEHLPG RLWEGSTSRE RGSTGTQLCK ALVLEQLTPA LHSTNFSCVL

151 VDPEQVVQRH VVLAQLWAGL RATLPPTQEA LPSSHSSPQQ QG

(SEKV. ID NR. : 2)

Fig. 4A

IL-18BPb; DNA-sekvens

Lengde: 1038 19 juni 1998 14:10 Type: N Sjekk. 8005

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

(SEKV. ID NR. : 3)

Fig. 5

9/25

huil-18BPb
Klon-m7
peptid

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

(SEKV. ID NR. .4)

Fig. 5A

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

Fig. 6

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

Fig. 6A

2551 ACAGGCGCTT GAAAAAGAAA AGAGAGAACA GCCCATAATG CTCCCCGGGA
2601 GCAGAGGCCA CTAATGGAGA GTGGGAAGAG CCTGGAAAGA TGTGGCCTCA
2651 GGAAAAGGGA TGAGAGAAAG GAGGTGGTAT GGAAGACTCA GCAGGAACAA
2701 GGTAGGCTTC AAAGAGCCTA TATTCCTCTT TTTCCACAC CGATCAAGTC
--2751 AACTCAGTAC TCACGGGAGA AAAATAGACT TTATTTACAA GTAATAACAT
2801 TTAGAAAAGA TCCATCCCCG GCCCTTAAAA ACCTTCCCAT CACTCCAAAT
2851 CCCACCCAG TGCAAGTCTG GGAAGGTAG GGTGTGAGCT GCTGCTGAAG
2901 GCTGTCCCCC AACCCACTC CTGAGACACA GGGCCCATCC GTCCTGGGAA
2951 AGAGCATCCT CTGGCAGGTG CTCCCACCAG GTCAGACCCA GTCCTGGACT
3001 TCAAGAGTGA GGGCCCCTGC TGGGCCCAGC CACCAGGACA GCAGGAACCA
3051 GGGCCTACTC CTCTTATGGT CCCTTCTAGA TCCAGAGGCT AAGAGGAAGA
3101 CTGGCCAGGC CCAAGGACCC AGCCATCAAA ACCAGCCTCA AATCTGGTTG
3151 TGATGGAGAA GTGACTTTGC TTTAAGAAAA AAGGAGGCAA GGTAGGGAGA
3201 GCGCCACAC TGTCCATGCT CCAGGCCCCC TGGGCCAGCT CCGAGAAGGC
3251 GCCAGTGAAG GACCAGGGAC CAGGCCAGG TCGGGCAGG CATCACTGTC
3301 TCTAGGGGTT TGGCTACTGT TGGCCTGGGA GCTGAGAGAA GGCCTGAGA
3351 GGGACAGTAG GCGGAGGACC AGGTGACGGC AGCATCGGGG ACACAGGTGG
3401 GGCCACTCAC TGGTACTGGC CCTTTAGTGC TTTGCCTGAA AGAGACACAG
3451 TCACATGGCC AGATGAGAAC TTGCGATACT AGCCTGCACC CACTGGCTGG
3501 GAAGATCTCT TCCTGCTCCC ACGCCCCTGT CTGGATCCCC TCCCTTGTGA
3551 GCCCCAGGGT TATCAGTTGC TGGCTGTGCC TGAGCAGCTC TGGGTGCTCT
3601 CCATGAGAAT GGGGCCATCT GTCTTCTCTC CTTGGAGAGG AGCTACCAGG
3651 ACAGGGACAC CTCTTACCCC ACACCCTCCA GCAGCCTGGC GTGGCCCCAT
3701 CTTGGATGCT ACTTGGTGGG GCGGTCTGGG GGGTGCCCAT GCTCTCATCG
3751 GGTTTCCCTC CCCCATCCTG CCAGTGCCTC TACCTTGCCC TTGGCTCGAG
3801 GGGTGGCACC AATGGCGGCA GCAGTGGCGG CGCTGGCTGT GGTGGTGGCA

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

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

Fig. 6D

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

(SEKV. ID NR. : 5)

IL-18BPc; Protein

Lengde: 197 5. juni 1998 13:41 Type: P Sjek: 3353

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

(SEKV. ID NR. : 6)

Fig. 6E

IL-18BPd; DNA

Lengde: 1380 19. juni 1998 14.55 Type: N Sjeck: 8757

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

Fig. 7

17/25

1201 AAGGGATGGG GGCAGCAGCT GCTTCGGATC CACACTGTAT CTGTGTCATC

1251 CCCACATGGG TCCTCATAAA GGATTATTCA ATGGAGGCAT CCTGACATCT

1301 GTCCATTTAG GCTTCAGTTC CACTCCCAGG AACTTTGCCT GTCCCACGAG

1351 GGAGTATGGG

(SEKV. ID NR. : 7)

IL-18BPd; protein

Lengde: 161

5. juni 1998

13:40

Type: P

Sjekk: 2239

1 MRHNWTPDLS PLWVLLCAH VVTLVLRATP VSQTTTAATA SVRSTKDPCP

51 SQPPVFPAAK QCPALEVTWP EVEVPLNGTL SLSCVACSRF PNFSILYWLG

101 NGSFIEHLPG RLWEGSTSRE RGSTGWAEGN LAPHPRSPAL QPQQSTAAGL

151 RLSTGPAAAQ P

(SEKV. ID NR. : 8)

Fig. 7A

HuL-18BP gen

Lengde: 7812 15 juli 1998 11.55 Type: N Sjekk: 7058

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

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

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

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

Fig. 8C

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

Fig. 8D

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

24/25

7701 TTTCTTCAGA AGTGCCCTTA ACCAAGTCAC TGCCCTTTTT AAGACCTCTC

7751 AGCTTTCCCA CTGTAACATG GACTGGCTGC TCATCCCTCC CTGCTCCTGA

7801 CTGAGTGCCC AG

(SEKV. ID NR. : 9)

Fig. 8F

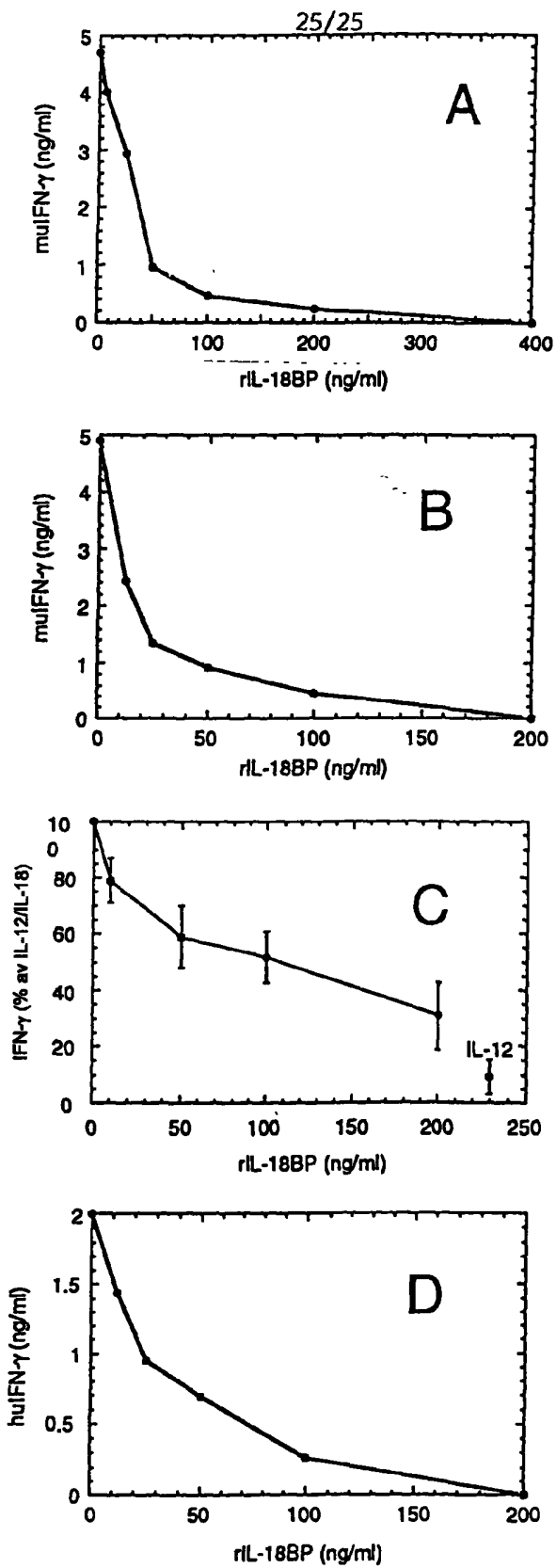


Fig. 9 A-D