

Даний винахід відноситься до мутантів IL-18, що мають підвищену біологічну активність в порівнянні з білком дикого типу.

У 1989р. була описана стимульована ендотоксином сироваткова активність, яка індукувала інтерферон- γ (IFN- γ), одержаний з клітин мишачої селезінки (Nakamura et al., 1989). Ця сироваткова активність діяла не як прямий індуктор IFN- γ , а як ко-стимулятор спільно з IL-2, IFN- α/β , TNF або з мітогенами. В спробі виділити активність з мишачої сироватки, після її стимуляції ендотоксином, був виявлений явно гомогенний білок розміром 50-55кДа (Nakamura et al., 1993). Оскільки інші цитокіни можуть діяти як ко-стимулятори для продукування IFN- γ , то було припущено, що відсутність нейтралізуючих антитіл проти IL-1, IL-4, IL-5, IL-6 або TNF, направлених на нейтралізацію сироваткової активності, може слугувати відмітним фактором. У 1995р. ті самі вчені продемонстрували, що індукований ендотоксином ко-стимулятор продукування IFN- γ присутній в екстрактах печінки, одержаних від мишей, підданих передтрансплантаційній обробці *P.acnes* [Okamura et al., 1995]. У вказаній моделі, популяція макрофагів в печінці (клітини Купфера) збільшувалася, і у цих мишей, низька доза бактеріального ліпополісахариду (ЛПС), яка була не летальною для мишей, не підданих передтрансплантаційній обробці, ставала летальною. Фактор, названий IFN- γ -індукуючим фактором (IGIF), а пізніше названий інтерлейкіном-18 (IL-18), був очищений до гомогенності із 1200 грамів мишачої печінки, обробленої *P. acnes*. Для клонування мишачої кДНК IL-18 були використані вироджені олігонуклеотиди, одержані виходячи з амінокислотних послідовностей очищеного IL-18, [Okamura et al., 1995]. Матричні РНК для IL-18 і інтерлейкіну-12 (IL-12) легко детектувалися в активованих макрофагах. Сам IL-18 не індукує IFN- γ , а діє головним чином як ко-стимулятор разом з мітогенами або IL-12. Людська кДНК-послідовність для IL-18 була описана у 1996 (Фіг.1А, SEQ ID NO:1).

Інтерлейкін IL-18 і білки сімейства IL-1 мають спільні структурні елементи [Nakamura et al., 1993; Okamura et al., 1995; Ushio et al., 1996; Bazan et al., 1996]. На відміну від більшості інших цитокінів, які мають структуру, що складається з чотирьох спіральних ділянок, сполучених тяжами, IL-18 і IL-1 β мають β -складчасту структуру (Tsutsui et al., 1996). Аналогічно IL-1 β , IL-18 синтезується як біологічно неактивний попередник (про-IL-18), в якого відсутній сигнальний пептид [Ushio et al., 1996]. Попередники IL-1 β і IL-18 розщеплюються каспазою 1 (IL-1 β -конвертуючим ферментом або ICE), який розщеплює ці попередники за залишком аспарагінової кислоти в положенні PL Зрілі цитокіни, що утворюються в результаті, легко вивільняються з клітини [Ghayur et al., 1997 & Gu et al., 1997].

IL-18 є ко-стимулятором для продукування цитокінів (IFN- γ , IL-2 і гранулоцитарного-макрофагального колонієстимулюючого фактора) Т-клітинами-хелперами типу I (Th1) [Kohn et al., 1997], а також ко-стимулятором опосередкованої лігандом FAS цитотоксичності клітинних клонів мишачих клітин-кілерів [Tsutsui et al., 1996].

Th1-лімфоцити беруть участь в імунних відповідях проти пухлин [Seki et al., 2000]. Th1-відповіді включають секрецію цитокінів IL-2, IL-12, IL-18 і IFN- γ , а також генерування специфічних цитотоксичних Т-лімфоцитів, що розпізнають специфічні пухлинні антигени. Th1-відповідь також є життєво важливим фактором захисту хазяїна від багатьох мікроорганізмів. Однак, Th1-відповідь може бути також асоційована з небажаними ефектами, такими як розвиток деяких аутоімунних захворювань, запалення і відторгнення трансплантованого органу.

Спроби експресувати зрілу форму IL-18 в *E.coli* з використанням вектора, що кодує зрілий білок, не привели до одержання повністю активного цитокіну. Ефективна експресійна система для генерування повністю біологічно активного людського IL-18 була розроблена для терапевтичних цілей, наприклад, для лікування злоякісних пухлин або будь-яких станів, при яких бажано індукування IFN- γ [WO 00/61768]. У цій системі, сайт розщеплення попередника IL-18 каспазою-1 був замінений на сайт фактора Ха (ICE/Ха), і вектор, що кодує попередник ICE/Ха-IL-18, був використаний для трансформації *E.coli*. Після експресії цього попередника IL-18 в *E.coli*, зрілий IL-18 був генерований шляхом відщеплення фактора Ха *in vitro*. Цей зрілий IL-18, генерований шляхом розщеплення фактором Ха, був повністю активним.

Білки, що зв'язуються з цитокінами (розчинні цитокінові рецептори), звичайно являють собою позаклітинні ліганд-зв'язуючі домени їх відповідних цитокінових рецепторів клітинної поверхні. Вони продукуються або за допомогою альтернативного сплайсингу, або за допомогою протеолітичного розщеплення рецептора клітинної поверхні. Ці розчинні рецептори були описані раніше, наприклад, розчинні рецептори IL-6 і IFN- γ [Novick et al., 1989], TNF [Engelmann et al., 1989; Engelmann et al., 1990], IL-1 і IL-4 [Maliszewski et al., 1990], IFN- α/β [Novick et al., 1994; Novick et al., 1992]. Один білок, що зв'язується з цитокіном, названий остеопротегерином (OPG, також відомий як фактор інгібування остеокластів, OCIF), член сімейства TNFR/Fas, є, очевидно, першим прикладом розчинного рецептора, який існує тільки як секретований білок [Anderson et al., 1997; Simonet et al., 1997; Yasuda et al., 1998].

Білок, що зв'язується з IL-18 (IL-18BP), був афінно очищений з сечі на колонці з IL-18 [Novick et al., 1999]. IL-18BP запобігає IL-18-стимульованому індуванню IFN- γ і IL-8, активації NF-kB *in vitro* і індуванню IFN *in vivo*. IL-18BP являє собою розчинний циркулюючий білок, який конститутивно експресується в селезінці і належить до суперсімейства імуноглобулінів. Ізоформа IL-18BP, що найчастіше зустрічається, ізоформа сплайсованого варіанту, має високу афінність по відношенню до IL-18 з високою швидкістю асоціації і низькою швидкістю дисоціації, і константу дисоціації (Kd), що дорівнює приблизно 400pM [Kim et al., 1999].

Залишки, що беруть участь у взаємодії IL-18 з IL-18BP, були описані з використанням комп'ютерного моделювання [Kim et al., 1999] і на основі взаємодії IL-1 з IL-1R типу 1 [Vigers et al., 1997]. Було передбачено, що в моделі для IL-18, що зв'язується з IL-18BP, залишок Glu в положенні 42 і залишок Lys в положенні 89 зв'язуються з Lys-130 і Glu-114 в IL-18BP, відповідно [Kim et al., 1999].

IL-18 постійно присутній в багатьох клітинах [Puren et al., 1999] і в кровотоці здорових людей [Urushihara et al., 2000]. Високий ступінь афінності IL-18BP по відношенню до IL-18, а також висока концентрація IL-18BP, що виявляється в кровотоці (у 20-кратному надлишку в порівнянні з IL-18), являє собою унікальну ситуацію в біології цитокінів. Тому, більшість, якщо не всі, молекули IL-18, присутні в кровотоці, зв'язуються з IL-18BP. Циркулюючий IL-18BP, який конкурує з клітинно-поверхневими рецепторами для IL-18, може діяти як природна

протизапальна і імуносупресорна молекула.

Вірусні агенти, що кодують IL-18BP-подібні білки, наприклад, вірусні білки MC53 і MC54 *M. contagiosum* володіють значною гомологією з IL-18BP ссавців [Novick et al., 1999]. Білки MC53 і MC54 *M. contagiosum* володіють здатністю зв'язуватися з людським IL-18 і нейтралізувати його здатність, аналогічно механізму дії IL-18B [Xiang & Moss, 1999]. Білок p13 поксвірусу *Ectromelia*, який є гомологічним IL-18BP, зв'язується з людським IL-18 і інгібує його активність *in vitro*. У мишей, інфікованих p13-делеційним вірусним мутантом, виявлялися знижені рівні інфекційності [Born et al., 2000]. Тому, очевидно, що ступінь інфекційності корелює з присутністю IL-18BP.

Високі рівні циркулюючого IL-18BP можуть забезпечувати природний захист проти неконтрольованої Th1-відповіді на інфекцію і розвитку аутоімунних захворювань. Однак, IL-18 стимулює Th1-відповідь, яка є важливим фактором захисту хазяїна проти пухлин. Тому, IL-18BP може викликати у хазяїна нездатність продукувати цитотоксичні Т-клітини, спрямовані проти пухлинних клітин. Дійсно, очевидно, що у мишей IL-18 стимулює захист хазяїна проти пухлин. Так, наприклад, у сингенних мишей, клітини мишачої карциноми молочної залози, експресуючі мишачий IL-12 або мишачий IL-18, були менш онкогенними і утворювали пухлини більш повільно, ніж контрольні неекспресуючі клітини [Coughlin et al., 1998]. Дослідження по нейтралізації антитілами виявили, що для досягнення протипухлинного ефекту необхідна присутність IFN- γ . В іншому дослідженні, системне введення IL-18 експериментальною твариною з меланою В16, експресуючою B7-1 (CD80), приводило до різкого інгібування утворення меланоми, пухлинного зростання і до значного підвищення рівня виживаності [Cho et al., 2000].

Цитокині були використані як ад'юванти для підвищення ефективності імунотерапії раку. Так, наприклад, IL-2 вводили в нирково-клітинну карциному або меланому [Gollob et al., 2000]. У більшості випадків, одними з важливих наслідків лікування цитокинами є їх важкі системні токсикологічні профілі. Використання цитокинів, які експресуються самими пухлинними або дендритними клітинами пацієнта, є логічним розв'язанням цієї проблеми. Однак, навіть при місцевому використанні IL-18 як ад'юванту в імунотерапії пухлин ще зберігається здатність конститутивних рівнів IL-18BP нейтралізувати IL-18 в локальному оточенні, а отже, його ефективність значно знижується.

Використання не-мієлоабляційних алогенних трансплантатів, так званих мінітрансплантатів для лікування лейкозу і солідних пухлин є значно більш успішним для посилення реакцій "трансплантат проти лейкозу" і "трансплантат проти пухлини" [Slavin S., 2000; Slavin et al., 2000]. Два дослідження, в яких були використані алогенні стовбурові клітини периферичної крові [Childs et al., 2000] або дендритні клітини [Kugler et al., 2000] для лікування пацієнтів з метастазами нирково-клітинної карциноми, мали помітний успіх. Хоча необхідно продовжити і підтвердити ці дослідження, однак, ідея про використання реакції "трансплантат проти пухлини" для протиракової імунотерапії знаходить все більше визнання [Slavin, 2000]. Оскільки, очевидно, що в успішній терапії певну роль грає IL-18, то ще більший успіх може бути досягнутий шляхом запобігання нейтралізуючій дії IL-18BP.

Мутанти IL-18 (IFN- γ , індикаційний фактор) [описані в EP0845530]. Описані мутанти IL-18 являють собою молекули, в яких 1, 2, 3 або всі 4 цистеїнових залишки в IL-18 (Фіг.1В) були замінені сериновими або аланіновими залишками. Ці мутанти містили інтактну консенсусну послідовність (Фіг.1В). Всі виділені мутанти володіли більш високою стабільністю, ніж IL-18 дикого типу. Міра стабільності мутантів прямо пропорційна числу замінених залишків Cys в даній молекулі. [У EP0845530] нічого не вказується про здатність IL-18BP до нейтралізації цих мутантів.

Тому, генерування і терапевтичне використання повністю активних мутантів IL-18, що не зв'язуються з IL-18BP або, що зв'язуються з IL-18BP з низькою афінністю, може дати дуже хороший ефект.

Даний винахід відноситься до мутантного поліпептиду IL-18, що включає мутації в одному або декількох амінокислотних залишках, які беруть участь в його взаємодії з білком, що зв'язується з IL-18. Більш конкретно, такими мутаціями є заміни, переважно, неконсервативні заміни, додатки або делеції. Залишки, мутовані у вказаному поліпептиді, можуть бути вибрані з Glu-42, Ile-85, Met-87, Lys-89, Met-96, Asp-130, Lys-132, Pro-143, Met-149 і Leu-189, а переважно, Glu-42 і Lys-89.

В одному з варіантів здійснення винаходу, Glu-42 або Lys-89, або обидва Glu-42 і Lys-89 замінені неполярною амінокислотою, переважно, аланіном.

Крім того, даний винахід відноситься до ДНК, що кодує вказаний поліпептид, а переважно, до ДНК, що кодує поліпептид, вибраний з SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 або SEQ ID NO: 8.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу, ДНК, що кодує поліпептиди SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 і SEQ ID NO: 8, приєднують до сигнального пептиду, переважно, до сигнального пептиду людського гормону росту (лГР). Крім того, даний винахід також відноситься до вектора, що включає вказану ДНК, здатного експресувати поліпептид, що кодується вказаною ДНК, у відповідній клітині-хазяїні, наприклад, в прокаріотичній або в еукаріотичній клітині-хазяїні.

Крім того, даний винахід відноситься до фармацевтичних композицій, що містить вказаний поліпептид і призначеним для лікування захворювань, які можуть попереджатися або послаблятися Th1-відповідями, а переважно, для лікування вірусного захворювання або раку.

На Фіг.1А показана нуклеотидна послідовність, що кодує попередник IL-18 дикого типу, і локалізація праймерів, що використовуються для конструювання різних мутантних білків IL-18. Широка стрілка вказує на початок послідовності, що кодує зрілий білок IL-18.

На Фіг.1В показана амінокислотна послідовність зрілого IL-18. Консенсусна послідовність різних видів IL-18 взята в білі рамки. Цистидини підкреслені. Темними рамками окреслені залишки, мутовані в IL-18 даного винаходу.

На Фіг.2 схематично показані мутанти IL-18 даного винаходу. His-6 вказує на присутність шести гістидинів, приєднаних в N-кінці про-фрагмента попередника IL-18. Стрілка вказує на сайт ICE-розщеплення, замінений сайтом розщеплення фактора Ха (x). WT означає зрілий IL-18 дикого типу. E42A означає мутацію із заміною

Glu 42 на Ala, K89A означає мутацію із заміною Lys 89 на Ala, а E42A/K89A означає подвійну мутацію. Виходячи з попередника/wt були генеровані три мутанти IL-18 (E42A, K89A і E42A-I-K89A) за допомогою двостадійної ПЛР.

На Фіг.3А показано індукування IFN- γ в клітинах NKO за допомогою IL-18 дикого типу і мутантного білка в концентраціях, представлених по осі x на Фіг.3В, і в присутності IL-12 (0,5нг/мл).

На Фіг.3В показано індукування IFN- γ в клітинах МКПК за допомогою IL-18 дикого типу і мутантного білка в концентраціях, представлених по осі x і в присутності IL-12 (1,0нг/мл).

На Фіг.4А показаний вплив IL-18BP на індукування IFN- γ людським IL-18 дикого типу і мутантним білком в клітинах NKO. Мутанти і IL-18 дикого типу (30нг/мл) були заздалегідь інкубовані з IL-18BP при концентраціях, показаних по осі x (на Фіг.3В), протягом 1 год. при кімнатній температурі, і додані до клітин NKO, стимульованих IL-12 (0,5мг/мл).

На Фіг.4В показаний вплив IL-18BP на індукування IFN людським IL-18 дикого типу і мутантним білком в клітинах МКПК. Мутанти і IL-18 дикого типу (30нг/мл) були заздалегідь інкубовані з IL-18BP при концентраціях, показаних по осі x, протягом 1 год. при кімнатній температурі і додані до клітин МКПК, стимульованих IL-12 (1,0мг/мл).

На Фіг.5 показано індукування IL-8 під дією IL-18 дикого типу і мутантного білка. МКПК інкубували з IL-18 дикого типу або з мутантом (30нг/мл). Поліміксин В (1г/мл) змішували з IL-18 протягом 30 хвилин, а потім додавали до МКПК. Через 24 години, супернатанти видаляли і аналізували концентрацію IL-18 з допомогою ЕХЛ (приклад 9). Проліострований один з трьох експериментів.

Даний винахід відноситься до мутанта IL-18 або до його активного фрагмента або мутеїну, або до будь-якого іншого білка або його пептидного похідного (IL-18M), яке, в порівнянні з білком дикого типу (IL-18WT), є менш чутливим до нейтралізації під дією IL-18BP. Більш конкретно, для генерування активного мутанта IL-18, який є менш чутливим до нейтралізації під дією IL-18BP, одна або декілька амінокислот, переважно, не більше ніж 30, а більш переважно, до 10 амінокислот IL-18 дикого типу можуть бути замінені іншими амінокислотами або еліміновані, або може бути додана одна або декілька амінокислот, переважно, не більше ніж 30, а більш переважно, до 10 амінокислот. Амінокислоти можуть бути замінені іншими амінокислотами; причому, переважними замінами є неконсервативні заміни. Більш конкретно, вказані мутації можуть бути націлені на залишки, які, як передбачається, беруть участь в скріпленні з IL-18BP, такі як Glu-42, Ile-85, Met-87, Lys-89, Met-96, Asp-130, Lys-132, Pro-143, Met-149 і Leu-189, а переважно, Glu-42 і/або Lys-89 [Kim et al., 1999].

IL-18M може бути продукований в еукаріотичних або прокариотичних експресійних системах, всередині клітини або в периплазматичному просторі, або він може бути секретований в середовище. Продукований IL-18M може бути виділений в розчинній або нерозчинній формі (в формі тілець включення).

Вектор, що містить кДНК попередника IL-18M, може бути використаний для експресії "правильно" зібраного попередника IL-18M в прокариотичних системах. Потім, після ICE-розщеплення *in vitro*, може бути генерований зрілий повністю активний білок. Послідовність ICE в попередникові IL-18M може бути замінена послідовністю, що кодує сайт специфічного розщеплення протеазою, переважно, фактором Ха.

Для еукаріотичної експресії і секреції може бути використаний експресуючий вектор, що кодує ефективний сигнальний пептид, а переважно, сигнальний пептид ЛГР, приєднаний до кДНК зрілого IL-18M.

Батьківська кДНК IL-18M, що використовується для конструювання мутантів, може бути вибрана з кДНК миші або людини.

Для полегшення очищення, IL-18M може бути помічений в епітопі, переважно, гістидином. Рекombінантний IL-18M може бути очищений стандартними або афінними методами. Моніторинг кількості продукованого IL-18M може бути здійснений з допомогою специфічного ELISA.

IL-18M може бути використаний в фармацевтичній композиції для лікування захворювань, які можуть попереджатися або послаблюватися шляхом індукування Th1-відповідей, а більш конкретно, шляхом обробки IL-18, наприклад, для лікування інфекцій, що викликаються мікроорганізмами, або раку. Перевага використання цього мутанта замість варіанту білка дикого типу, полягає в його стійкості або резистентності до нейтралізації під дією IL-18BP.

Більш конкретно, IL-18M може бути введений системно або місцево як ад'ювант при протипухлинній імунотерапії, спрямованій проти пухлинних антигенів.

Пухлинні клітини пацієнта можуть бути виділені і генетично модифіковані для секреції IL-18M, після чого вони можуть бути знов трансплантовані тому самому пацієнту з метою місцевої вакцинації [Coughlin et al., 1998]. Злиття модифікованих пухлинних клітин, експресуючих IL-18M, з алогенними дендритними клітинами (антигенпрезентуючими клітинами) може бути здійснено для додаткового підвищення пухлинної антигенності, а отже, і протипухлинної відповіді.

IL-18M може бути введений як ад'ювант при ДНК-вакцинації [Tuting et al., 1998]. Цей спосіб аналогічний описаному раніше способу використання цитокінів IL-12 і IFN. У цьому випадку, чрезахкірна вакцинація пухлинним антигеном може бути здійснена з використанням "пістолета" для вистрілювання генів. Таким чином трансфекція дендритних клітин, присутніх в шкірі, може бути здійснена з використанням ДНК, що кодує як пухлинний антиген, так і IL-18M. Альтернативно, дендритні клітини можуть бути сконструйовані *ex vivo* з подальшим адаптивним перенесенням.

IL-18M може бути використаний як ад'ювант в протипухлинній терапії, що проводиться за допомогою трансплантації. У цих цілях, раковим пацієнтам можуть бути трансплантовані алогенні стовбурові клітини. Для посилення реакції "трансплантат проти пухлини", індукованої шляхом трансплантації алогенних клітин, IL-18M може бути введений системно або місцево, а переважно, шляхом експресії IL-18M в генетично модифікованих сингенних дендритних клітинах або в пухлинних клітинах, взятих у пацієнта.

При цьому, потрібно зазначити, що хоча даний винахід описаний на конкретних переважних варіантах його здійснення, однак, приведений вище опис, а також ілюструючи його приклади не обмежують об'єму винаходу. Для кожного фахівця очевидно, що даний винахід може включати і інші аспекти, переваги і модифікації, що не виходять за рамки об'єму даного винаходу.

Приклади

Приклад 1

Конструювання векторів для експресії гібридного білка "proIL-18WT-гістидинова мітка", що розщеплюється фактором Ха. Для генерування "правильно" зібраного IL-18 в *E.coli*, сайт розщеплення ферментом ICE в попередникові IL-18 замінювали на сайт розщеплення фактором Ха. Внаслідок цього, розщеплення попередника IL-18 фактором Ха *in vitro* приводило до генерування активного білка [WO 00/61768].

кДНК-послідовність, що кодує попередник людського IL-18 (proIL18, банк генів, реєстраційний номер D49950, Fig.1) і що використовується для генерування експресійної плазмиди, виділяли як описано в літературі [Ghayur et al., 1997].

Заміну сайту розщеплення для ICE сайтом розщеплення для Ха здійснювали з використанням 2 ПЛР-реакцій (див. приклади, що використовуються на Fig.1). ПЛР-реакція 1: про-фрагмент кДНК IL-18 генерували з використанням смислового праймера (Pr1), що містить EcoRI-сайт, розташований вище (в положенні апстрім) за OPC, 5'-ATATGAATTCATGGCTGCTGAACCAGTAG (SEQ ID NO: 11), і зворотного праймера (Pr2), сконструйованого для введення ICE-сайту (33-LESD-36), в якому 6 нуклеотидів були замінені так, щоб вони кодували сайт фактора Ха (33-IEGR-36), 5'-AAAGTAACGTCCTTCGATGTTTTTC (SEQ ID NO: 12). Ампліфікований ДНК-фрагмент, що кодує зрілий IL-18, генерували з використанням смислового праймера (Pr3), комплементарного Pr2, 5'-GAAAACATCGAAGGACGTTACTTT (SEQ ID NO: 13), і зворотного праймера (Pr4), що містить BamHI-сайт, розташований нижче (в положенні даунстрім) кодуючої послідовності IL-18, 5'-ATATGGATCCTAGTCTTCGTTTTGAACAGTG (SEQ ID NO: 14). Про-фрагмент розміром 108п.н. і ДНК зрілого IL-18 розміром 474п.н., виділяли шляхом електрофорезу в 1% агарозі і елюювали за допомогою системи гель-екстракції (GIBCO/BRL).

ПЛР-реакція 2: два ДНК-фрагменти, одержані в ПЛР-реакції 1, змішували у відношенні 1:1 і використовували разом з праймерами Pri і Pr4 для генерування кДНК повнорозмірного людського IL-18, в якій сайт ICE замінений сайтом фактора Ха (ICE/Ха).

кДНК про-IL-18 (ICE/Ха) лігували в плазмиду BlueScript (Stratagene) за допомогою рестрикційних EcoRI- і BamHI-сайтів (GIBCO/BRL). Ця плазміда служила для підтвердження послідовності. Передбачена кодована амінокислотна послідовність представлена в SEQ ID NO: 2. Для експресії в *E.coli*, ДНК-вставку, що кодує IL-18, знов лігували у вектор rPROEX HTa (GIBCO/BRL) з використанням EcoRI- і XbaI-сайтів (присутніх в BlueScript). У цьому векторі, одержаний білок був приєднаний своїм N-кінцем до гістидинової мітки.

Приклад 2

Конструювання мутантів E42A, K89A і E42A/K89A-мутантів. Мутації в IL-18 були створені в залишках, які, як передбачається, мають важливе значення для зв'язування з інгібітором IL-18BP [Kim et al., 2000]. Були генеровані три мутанти: E42A, K89A і E42A/K89A. Ці мутації були створені за допомогою двох ПЛР-реакцій, як описано в прикладі 1, з використанням праймерів і матриць, описаних нижче (праймери показані на Fig.2).

Мутант E42A

ПЛР-реакція 1: Для одержання мутанта E42A була використана пара праймерів: пара А - праймер Pr1 (приклад 1) і зворотний праймер (Pr5) 5'-TAA TTT AGA TGC AAG CTT GCC (SEQ ID NO: 15), кодує аланін замість глутамінової кислоти (E42), і пара В - смисловий праймер (Pr6) 5'-GGC AAG CTT GCA TCT AAA TTA (SEQ ID NO: 16), кодує аланін замість глутамінової кислоти (GAA GCA), і зворотний праймер Pr4 (приклад 1), з використанням про-IL-18 (ICE/Ха) як матриця в ПЛР-реакції.

ПЛР-реакція 2: Два фрагменти, одержані в ПЛР-реакціях 1, використали як матриці для другої ПЛР-реакції, здійснюваної з допомогою праймерів Pri і Pr4.

Мутант K89A

ПЛР-реакція 1: Для одержання мутанта K89A була використана пара праймерів: пара А - праймер Pri (приклад 1) і зворотний праймер (Pr7) 5'-CTG GCT ATC TGC ATA CAT ACT (SEQ ID NO: 17), кодує аланін замість лізину (K89), і пара В - смисловий праймер (Pr8) 5'-AGT ATG TAT GCA GAT AGC CAG (SEQ ID NO: 18), кодує аланін замість лізину (AAA→GCA), і зворотний праймер Pr4 (приклад 1), з використанням про-IL-18 (ICE/Ха) як матриці для першої ПЛР-реакції.

ПЛР-реакція 2: Два фрагменти, одержані в ПЛР-реакції 1, служили як матриці для другої ПЛР-реакції, здійснюваної з використанням праймерів Pri і Pr4.

Мутант E42A/K89A

Для одержання подвійної мутації E42A/K89A використали такий самий праймер, як і для одержання мутації E42A, а кДНК мутанта K89 використали як матрицю в цій реакції.

Кожний з трьох мutowаних генів IL-18 лігували у вектор BlueScript для підтвердження послідовності. Передбачені амінокислотні послідовності для мутантів попередника IL-18: E42A, K89A і E42A/K89A показані в SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 і SEQ ID NO: 5, відповідно. Для експресії в *E.coli*, кожен з трьох ДНК-вставок для IL-18 знов лігували у вектор rPROEX HTa (GIBCO/BRL) з використанням EcoRI- і XbaI-сайтів. Одержаний білок був приєднаний своїм N-кінцем до гістидину (Fig.1).

Приклад 3

Експресія і очищення білка. Попередники мутантів IL-18 були експресовані в *E.coli* і піддані афінному очищенню за допомогою гістидинової мітки, і відповідні зрілі молекули генерували шляхом протеолітичного розщеплення фактором Ха.

Кожну з чотирьох плазмід rPROEX HTu/IL-18 (дикого типу і три мутанти) вводили в компетентні клітини *E.coli* штаму DHQ (GIBCO/BRL) і експресували як описано в літературі (11). Нічна культура, 25мл, служила як інокулят для 450мл культури LB, що містить 100мг/мл ампіциліну, і її культивували до клітинної щільності OD₆₀₀=0,6-1. Експресію білка індукували шляхом обробки ізопропілтіогалактозидом (IPTG 0,3мМ), і інкубування продовжували при 37°C протягом 3год. при струшуванні. Культивовані бактерійні клітини збирали центрифугуванням (5000×g протягом 15 хвилин при 4°C), і осад суспендували в 30мл буферу Талона (50мМ NaH₂PO₄/20мМ Трис-HCl/100мМ NaCl, pH8). Клітини лізували шляхом обробки ультразвуком (імпульси 2×30с) на льоду. Розчинний білок одержували центрифугуванням (4000×g протягом 30 хвилин при 4°C) і наносили на

3мл мініколонку Талона (Clontech). Потім колонку Талона промивали 30 об'ємами шару і елюювали 6мл 100мМ імідазолу в буфері Талона. Елюент діалізували проти буфера, що містить фактор Ха (20мМ Трис-HCl/150мМ NaCl/2мМ CsCb) при 4°C протягом 20год. 0,2мл афінно очищеного на колонці Талона гібрида про-IL-18 з міткою His×6 на N-кінці інкубували з 4мкг ферменту фактора Ха (New England Biolabs) протягом 4год. при кімнатній температурі в присутності 2мМ фенолметилсульфонілфториду (GIBCO/BRL). Моніторинг кількості продукованого IL-18 здійснювали за допомогою специфічного ELISA (R&D Systems). Амінокислотні послідовності, передбачені для зрілого IL-18 дикого типу і мутантів E42A, K89A і E42A/K89A, показані в послідовностях SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 і SEQ ID NO: 8, відповідно.

Приклад 4

Оцінка мутантів білка IL-18: E42A, K89A і E42A/K89A за допомогою Вестерн-блот-аналізу. Очищені мутанти IL-18 піддавали Вестерн-блот-аналізу з використанням поліклонального антитіла і моноклонального антитіла проти зрілого IL-18.

Рівні кількості афінно-очищеного на колонці Талона (після розщеплення фактором Ха) попередника IL-18 дикого типу і його мутантних форм, піддавали електрофорезу в ПАГ з ДСН (10% акриламід) у відновлювальних умовах. Білки переносили на нітроцелюлозні мембрани, а потім інкубували з "першими" антитілами (кролячим поліклональним антитілом проти людського IL-18 або клоном моноклонального антитіла 8-31-4 (IgG2a), яке було продуковане проти рекомбінантної зрілої форми людського IL-18 [Puren et al., 1999] і яке також розпізнавало попередник IL-18). Після 24-годинного інкубування додавали відповідне "друге" антитіло, козячий антимишачий або осячий антикролячий імуноглобулін IgG, кон'югований з пероксидазою (Jackson Immuno Research), і візуалізували за допомогою ЕХЛ (New England Nuclear Life Science Products).

Фарбування про-IL-18 поліклональним кролячим антитілом проти людського IL-18 було однаково інтенсивним для IL-18 дикого типу і для кожного з його трьох мутантів. Аналогічним чином, сигнали, одержані з використанням зрілих форм IL-18 дикого типу, IL-18 і кожного з його трьох мутантів з використанням поліклональної антисироватки, мали однакову інтенсивність. Уявна молекулярна маса вказувала на те, що різні форми IL-18 мали очікуваний розмір. У протилежність цьому, при використанні моноклонального антитіла, два мутанти K89A і E42A/K89A мали більш інтенсивне забарвлення, ніж білок дикого типу і мутант E42A, внаслідок чого було зроблене припущення, що афінність моноклонального антитіла по відношенню до цих мутантів є більш високою. Ці результати дають основу передбачити, що мутанти K89A і E42A/K89A можуть мати іншу конформацію, що приводить до більш високої афінності.

Приклад 5

Оцінка біологічної активності мутантів білка IL-18: E42A, K89A і E42A/K89A. Очищені зрілі форми IL-18 ЛСЕ/Ха аналізували на ко-індукування IFN- γ в людських природних клітинах-кілерах (NKO, описаних в прикладі 8), в МКПК (описаних в прикладі 7) і на індукування IL-8 в МКПК.

IL-18 не індукує IFN- γ в цих клітинах, на відміну від IL-12 (або IL-15), і використовувався як ко-стимулятор. Низькі концентрації IL-12 (1-2нг/мл IL-12 (PreproTech Rocky Hill, NJ)) індукують невелику кількість IFN- γ , однак, обробка IL-12 разом з IL-18 приводила до значного збільшення продукування IFN- γ . Моніторинг продукування IFN- γ в клітині проводили як описано в прикладі 9. Було виявлено, що індукування IFN- γ в клітинах NKO під дією IL-18 дикого типу (ICE/Ха) і IL-12 було порівнянне з індукуванням IFN- γ рекомбінантним зрілим людським IL-18, утвореним внаслідок ICE-процесингу про-IL-18 [Gu et al., 1997] і IL-12. Ці результати показали, що IL-18 має "правильне" збирання в E.coli і "правильно" процесується фактором Ха.

Для тесту на активність мутованого IL-18, індукцію продукування IFN- γ шляхом стимуляції мутантним IL-18 або IL-18 дикого типу разом з IL-12 аналізували в клітинах NKO (статистичні аналізи описані в прикладі 10). Як показано на Фіг.3А, IL-18 дикого типу є активним як індуктор IFN- γ , при його використанні, починаючи з концентрації 7,5нг/мл з поступовим її збільшенням до 60нг/мл (найвищої тестованої концентрації). Кожна з трьох мутованих форм IL-18 володіла біологічною активністю, яка була вище ніж активність IL-18 дикого типу в цих клітинах. Так, наприклад, білок з однією мутацією E42A був в два рази більш активним, ніж форма дикого типу при кожній тестованій концентрації. Білок з однією мутацією K89A був в чотири рази більш активним, ніж форма дикого типу при концентрації 7,5нг/мл. IL-18 з подвійною мутацією E42A/K89A був найбільш активним. Як показано на Фіг.3А, мутований IL-18, E42A, індукував 600пг/мл IFN- γ , при цьому, максимальна активність спостерігалася при попередній обробці 60нг/мл IL-18 дикого типу в концентрації 30нг/мл, мутанта K89A в концентрації 15нг/мл і подвійного мутанта, в концентрації 7,5нг/мл. Таким чином, мутанти E42A, K89A і подвійний мутант були в 2, 4 і 8 разів більш активними, ніж білок дикого типу, відповідно.

Аналогічні результати спостерігалися при тестуванні продукування IFN- γ в свіжовиділених людських МКПК (приклад 7). У цих клітинах, ко-стимуляція IL-12 і IL-18 приводила до продукування IFN- γ , але жоден з двох цитокінів, взятих окремо, не міг індукувати IFN- γ . Подвійний мутант E42A/K89A був найактивнішим (Фіг.3В).

Ці результати показали, що заміна двох заряджених амінокислот Glu42 і/або Lys89 залишками Ala, відповідно, приводить до збільшення біологічної активності IL-18.

Відомо, що IL-18 індукує IL-8 в CO14⁺-клітинах в препаратах МКПК (описаних в прикладі 7). Хоча в цих клітинах, IL-18 індукує продукування IL-8 без допомоги ко-стимулятора IL-12, однак, для індукування IL-8 потрібні більш високі концентрації IL-18, ніж для індукування IFN- γ . Тому був проведений тест на індукування IL-8 під дією IL-18 дикого типу і мутантну стимуляцію МКПК. Моніторинг продукування IL-8 проводили в клітинних середовищах шляхом специфічного аналізу, описаного в прикладі 9. На Фіг.4 показано, що хоча дія двох одиночних мутацій на індукування IL-8 була порівнянною з дією білка дикого типу, однак, подвійний мутант IL-18 виявляв набагато більш високий рівень індукування IL-8 (в 3,5 разів), ніж форма дикого типу.

Ці результати показали, що подвійний мутант, E42A/K89A володіє найвищою біологічною активністю.

Приклад 6

Нейтралізація мутантів IL-18 під дією IL-18BP. Мутації були створені в залишках, які, як передбачається, грають важливу роль в зв'язуванні IL-18 з інгібітором IL-18BP. Тому був проведений специфічний аналіз на здатність IL-18BP нейтралізувати біологічну активність IL-18, наприклад, продукування IFN- γ (приклад 8).

Різні концентрації IL-18BP (ізоформа "а" клітин CHO, продукувала рекомбінантний his 6-мічений людський IL-18BP (що поставляється з Interpharm Laboratories, Ness Ziona, Israel Kim et al., 2000)) заздалегідь інкубували з IL-18 дикого типу або з його мутантними формами (кінцева концентрація 30нг/мл), а потім додавали до клітинних культур.

Як показано на Фіг.4А, 50% інгібуюча концентрація IL-18BP для ко-індукування IFN- γ під дією IL-18 дикого типу, з клітин NKO, становила приблизно 15нг/мл (що дозволяє передбачити, що при концентрації IL-18BP 3,7нг/мл інгібуювання не відбувається, і ця величина представляє 100% активність). Одиночна мутація E42A приводить до аналогічної залежності "доза - інгібуюча концентрація IL-18BP".

Однак, при інкубуванні мутанта K89A з IL-18BP, його здатність діяти як ко-індуктор IFN- γ в клітинах NKO нейтралізувалася в меншій мірі (Фіг.5А). Статистично значуще зниження активності могло спостерігатися тільки при концентрації 120нг/мл. У протилежність цьому, IL-18BP був нездатний нейтралізувати подвійний мутант IL-18, E42A/K89A.

Як показано на Фіг.4В, при тестуванні в клітинах МКПК, замість клітин NKO, IL-18 виявився більш чутливим до нейтралізації під дією IL-18BP. Кількість IL-18BP, необхідна для нейтралізації IL-18 дикого типу, становила 3,7нг/мл, тобто, найменшу з концентрацій, що тестуються. IL-18 з однією мутацією E42A поводить себе аналогічно до IL-18 дикого типу, і як було встановлено з спостережень, низькі концентрації IL-18BP нейтралізували його біологічну активність в МКПК. У протилежність цьому, мутант з однією мутацією K89A був нейтралізований при концентрації 120нг/мл. Аналогічно до результатів, одержаних для IL-18BP-нейтралізації мутантів IL-18 в клітинах NKO, IL-18BP здійснював лише незначний вплив на подвійний мутант E42A/K89A в клітинах МКПК.

Ці результати показали, що мутант E89A і подвійний мутант E42A/K89A був менше схильний до впливу природного інгібітору IL-18BP.

Приклад 7

Виділення і культивування мононуклеарних клітин периферичної крові (МКПК) і індукування IFN- γ . Залишкові лейкоцити після тромбозезу здорових людей-донорів, вимивали з пробірок для взяття крові і піддавали центрифугуванню на апараті Histopaque. МКПК відсмоктували з внутрішньої поверхні судин, три рази промивали в апірогенному фізіологічному розчині (Baxter Health Care, Mundelein, IL) і ресуспендували при щільності 5×10^6 клітин на мл в середовищі RPMI 1640, в яке було додано 10% FBS (GIBCO/BRL Grand Island, NY). Клітини культивували в плоскодонних 96-ямкових планшетах (Becton Dickinson), що містять тільки середовище RPMI 1640 (контроль), різні концентрації рекомбінантного людського IL-18 і IL-18 дикого типу (ICE/Xa) або три мутанти, в присутності 1нг/мл IL-12. У деяких експериментах, препарати IL-18 спочатку були змішані з поліміксином В (1мкг/мл, Sigma), а потім додані до клітин. Клітини інкубували протягом 16-20 год. при 37°C в атмосфері повітря з підвищеною вологістю і з 5% CO₂, а потім супернатант культури збирали для оцінки рівня IFN- γ .

Приклад 8

Індукування IFN- γ в клітинній лінії NKO. Початкову батьківську клітинну лінію NK92 одержували від Hans Klingeman [Gong et al., 1994]. Людська клітинна лінія NKO, що використовується в даних дослідженнях, являла собою субклон цієї клітинної лінії. Клітини NKO підтримували в середовищі RPMI 1640, в яке були додані 10% FBS, 50пг/мл IL-2 (R&D Systems) і 200пг/мл IL-15 (Pepro Tech). Для аналізів, клітини NKO суспендували при концентрації $0,5 \times 10^6$ клітин на мл в середовищі RPM 1640 і стимулювали (в 0,2мл-об'ємах в 96-ямкових планшетах) 0,5нг/мл IL-12 (Pepro Tech Rocky Hill, NJ) і різними концентраціями рекомбінантного людського IL-18 дикого типу, IL-18 (ICE/Xa) або мутантів IL-18, E42A, K89A і E42A/K89A. Після витримання протягом 16-20 год. при 37°C в атмосфері повітря з підвищеною вологістю і з 5% CO₂, супернатант культури збирали для оцінки рівнів IFN- γ .

Приклад 9

Аналіз цитокінів. Для вимірювання IFN- γ (13) і IL-8 (12) в середовищі для культивування клітин використали метод електрохемілюмінесценції в рідкій фазі (ЕХЛ). Рівень ЕХЛ визначали з використанням аналізатора Origen Analyzer (Igen, Gaithersburg, MD). Межа детекції IFN- γ і IL-8 становила 62пг/мл і 40пг/мл, відповідно.

Приклад 10

Статистичний аналіз. Дані виражали як середні \pm стандартна помилка середньої. Значення для груп порівнювали за допомогою аналізу ANOVA з використанням найменшої значущої різниці по Фішеру. Статистична значущість була прийнятною в 95% довірчому інтервалі. ANOVA і кореляційний аналіз здійснювали з використанням пакетів статистичних програм STATVIEW 512 + (Brain Power, Calabasas, CA).

Приклад 11

Продукування зрілих мутантів IL-18 в клітинах CHO. Для експресії і секреції мутантів IL-18 в клітинах CHO, ДНК-послідовність, що кодує зрілий білок дикого типу і мутантний IL-18BP, лігували з послідовністю ДНК сигнального пептиду ЛГР за допомогою двох ПЛР-реакцій, аналогічних реакціям, описаним в прикладі 1. Матриця для першої ПЛР-реакції ампліфікації кожного мутанта IL-18 являла собою відповідну конструкцію, описану в прикладі 2 і одержану з використанням смислового праймера (Pr9), який містить послідовності, що перекриваються, IL-18 і сигнального пептиду ЛГР, і зворотних праймерів (Pr10), що кодує останні 12 нуклеотидів IL-18, стоп-кодон і сайт для рестрикуючого ферменту. Для ампліфікації сигнального пептиду гормону росту, плазмиду rXGH використали як матрицю зі смисловим праймером (Pr11), що містить сайт для рестрикуючого ферменту і перших 12 нуклеотидів сигнального пептиду ЛГР, і із зворотним праймером (Pr12), що містить послідовність сигнального пептиду, що перекриваються, і зрілого білка IL-18. Матриці для другої ПЛР-реакції, здійснюваної з метою ампліфікації фрагмента, що кодує сигнальний пептид ЛГР, приєднаний до зрілої послідовності IL-18, являли собою очищені ампліфіковані фрагменти, одержані в першій ПЛР-реакції, і праймери Pr10 і Pr11, що містять рестрикційні сайти. Цей гібридний фрагмент очищали, гідролізували відповідними рестрикуючими ферментами і клонували в експресуючий вектор ссавця.

Вказані плазмідні використали для трансфекції клітин CHO (DHFR-) разом з плазмідною, що містить мишачий ген DHFR як генний маркер. Резистентні клітини виділяли на селективному середовищі і аналізували на продукування IL-18 за допомогою аналізу ELISA.

Стабільно трансфіковані клітини піддавали декільком циклам генної ампліфікації із зростаючими концентраціями MTX. Після закінченні процесу ампліфікації генів, клони виділяли за допомогою лімітуючого розведення. Після субклонування, клон, який виявляв високу специфічну продуктивність і більш високу стабільність продукування, відбирали для подальшого продукування.

Бібліографія:

1. Anderson, P.M., Maraskovsky, E., Billingsley, W.L., Dougall, W.C., Tometsko, M.E., Roux, E.R., Teepe, M.C., DuBose, R.F., Cosman, D., Galibert, L. (1997) "A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function." *Nature*, 390, 175-179.
2. Bazan, J. R., Timans, J. G. and Kaselein, R. A. (1996) "A newly defined interleukin-1?" *Nature* 379, 591.
3. Born, T.L., Morrison, L.A., Esteban, D.J., VandenBos, T., Thebeau, L.G., Chen, N., Spriggs, M.K., Sims, J.E., Buller, R.M. (2000) "A poxvirus protein that binds to and inactivates IL-18, and inhibits NK cell response." *J. Immunol.* 164, 3246-54.
4. Childs, R., Chernoff, A., Contentin, N., Bahceci, E., Schrumpp, D., Leitman, S., Read, E.J., Tisdale, J., Dunbar, C., Linehan, W.M., Young, N.S., Barrett, A.J. (2000) "Regression of metastatic renal-cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation." *N. Engl. J. Med.* 343, 750-8.
5. Cho, D., Kim, T.G., Lee, W., Hwang, Y.I., Cho, H.I., Han, H., Kwon, O., Kim, D., Park, H., Houh, D. (2000) "Interleukin-18 and the costimulatory molecule B7-1 have a synergistic anti-tumor effect on murine melanoma; implication of combined immunotherapy for poorly immunogenic malignancy" *J Invest Dermatol*, 114, 928-34.
6. Coughlin, C.M., Salhany, K.E., Wysocka, M., Aruga, E., Kurzawa, H., Chang, A.E., Hunter, C.A., Fox, J.C., Trinchieri, G. and Lee, W.M. (1998) "Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis." *J.Clin.Invest.*, 101, 1441-52.
7. Engemann, H., Aderka, D., Rubinstein, M., Rotman, D. and Wallach, D. (1989) "A tumor necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity" *J. Biol. Chem.* 264, 11974-11980.
8. Engemann, H., Novick, D. and Wallach, D. (1990) Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors." *J. Biol. Chem.* 265, 1531-1536.
9. Ghayur, T., Banerjee, S., Hugunin, M., Butler, D., Herzog, L., Carter, A., Quintal, L., Sekut, L., Talanian, R., Paskind, M., Wong, W., Kamen, J.R., Tracey, D., and Allen, H. (1997) "Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production." *Nature* 386, 619-623.
10. Gollob, J.A., Mier, J.W., Veenstra, K., McDermott, D.F., Clancy, D., Clancy, M., Atkins, M.B. (2000) "Phase I trial of twice-weekly intravenous interleukin 12 in patients with metastatic renal cell cancer or malignant melanoma: ability to maintain IFN-gamma induction is associated with clinical response." *Clin Cancer Res*, 5, 1678-92.
11. Gong, J.H., Maki, G., Klingemann, H. G. (1994) "Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypal and functional characteristics of activated natural killer cells." *Leukemia* 8:652.
12. Gu, Y., Kuida, K., Tsutsui, H., Ku, G., Hsiao, K., Fleming, M.A., Hayashi, N., Higashino, K., Okamura, H., Nakanishi, K., Kurimoto, M., Tanimoto, T., Flavell, R. A., Sato, V., Harding, M. W., Livingston, D.J., and Su, M. S. (1997) "Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1 beta converting enzyme." *Science* 275, 206-209.
13. Kim, S.H., Eisenstein, M., Reznikov, L., Fantuzzi, G., Novick, D., Rubinstein, M. and Dinarello, C.A. (2000) "Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18." *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 1190-5.
14. Kohno, K., J. Kataoka, T. Ohtsuki, Y. Suemoto, I. Okamoto, M. Usui, M. Ikeda, and M. Kurimoto. (1997) "IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12." *J. Immunol.* 158: 1541-1550.
15. Kugler, A., Stuhler, G., Walden, P., Zoller, G., Zobywalski, A., Brossart, P., Trefzer, U., Ullrich, S., Muller, C.A., Becker, V., Gross, A.J., Hemmerlein, B., Kanz, L., Muller, G.A., Ringert, R.H. (2000) "Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids." *Nat. Med.* 3, 332-6.
16. Nakamura, K., Okamura, H., Wada, M., Nagata, K. and Tamura, T. (1989). "Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production." *Infect. Immun.*, 57, 950-5 issn: 0019-9567.
17. Nakamura, K., Okamura, H., Nagata, K., Komatsu, T. and Tamura, T. (1993) "Purification of a factor which provides a costimulatory signal for gamma interferon production." *Infect. Immun.* 61, 64-70.
18. Novick, D., Engemann, H., Wallach, D. and Rubinstein, M. (1989) "Soluble cytokine receptors are present in normal human urine." *J. Exp. Med.*, 170, 1409-14.
19. Novick, D., Cohen, B. and Rubinstein, M. (1992) "Soluble Interferon-alpha Receptor Molecules Are Present in Body Fluids." *FEBS Lett*, 314, 445-8.
20. Novick, D., Cohen, B. and Rubinstein, M. (1994) "The Human Interferon alpha/beta Receptor - Characterization and Molecular Cloning." *Cell* 77, 391-400.
21. Novick, D., Kim, S., Fantuzzi, G., Reznikov, L.L., Dinarello, C.A. and Rubinstein, M. (1999) "Interleukin-18 Binding Protein: A Novel Modulator of the Th1 Cytokine Response." *Immunity* 10, 127-36.
22. Okamura, H., Tsutsui, H., Komatsu, T., Yutsudo, M., Hakura, A., Tanimoto, T., Torigoe, K., Okura, T., Nukada, Y., Hattori, K., Akita, K., Namba, M., Tanabe, F., Konishi, K., Fukuda, S., and Kurimoto, M. (1995) "Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells." *Nature*, 378, 88-91.
23. Puren, A.J., Fantuzzi, G., Dinarello, C.A. (1999) "Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1 beta are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells." *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:2256-61.
24. Seki, S., Habu, Y., Kawamura, T., Takeda, K., Dobashi, H., Ohkawa, T., Hiraide, H. (2000) "The liver as a

crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag+ T cells in T helper 1 immune responses." *Immunol Rev*, 174, 35-46.

25. Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M.S., Luthy, R., Nguyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H.L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T.M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Boyle, "Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density." *Cell*, 89, 309-19.

26. Slavin, S. (2000) "Immunotherapy of cancer with alloreactive lymphocytes." *N. Engl. J. Med.*, 343, 802-3.

27. Slavin, S., Or, R., Prighozina, T., Gurevitch, O., Aker, M., Panighari, S., Shapira, M., Nagle, A. (2000) "Immunotherapy of hematologic malignancies and metastatic solid tumors in experimental animals and man" *Bone Marrow Transplant Suppl*, 2: S54-7.

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

29. Tuting, T., Wilson, C.C., Martin, D.M., Kasamon, Y.L., Rowles, J., Ma, D.I., Slingluff, C.L., Wagner, S. N., van der Bruggen, P., Baar, J., Lotze, M.T., Storkus, WJ. (1998) "Autologous human monocyte-derived dendritic cells genetically modified to express melanoma antigens elicit primary cytotoxic T cell responses in vitro: enhancement by cotransfection of genes encoding the Th1-biasing cytokines IL-12 and IFN-alpha." *J. Immunol.*, 160, 1139-47.

30. Urushihara, N., Iwagaki, H., Yagi, T., Kohka, H., Kobashi, K., Morimoto, Y., Yoshino, T., Tanimoto, T., Kurimoto, M., Tanaka, N. (2000) "Elevation of serum interleukin-18 levels and activation of Kupffer cells in biliary atresia." *J. Pediatr. Surg.*, 35, 446-9.

31. Ushio, S., Namba, M., Okura, T., Hattori, K., Nukada, Y., Akita, K., Tanabe, F., Konishi, K., Micallef, M., Fujii, M., Torigoe, K., Tanimoto, T., Fukuda, S., Ikeda, M., Okamura, H., and Kurimoto, M. (1996) *J. Immunol.*, 156, 4274-9.

32. Vigers, G.P., Anderson, L.J., Gaffes, P., Brandhuber, B.J. (1997) "Crystal structure of the type-I interleukin-1 receptor complexed with interleukin-1beta." *Nature*, 386, 190-4.

33. Xiang, Y. and Moss, B. (1999) "IL-18 binding and inhibition of interferon gamma induction by human poxvirus-encoded proteins." *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 1537-42.

34. Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Mochizuki, S.I., Yano, K., Fujise, N., Sato, Y., Goto, M., Yamaguchi, K., Kuriyama, M., Kanno, T., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K. (1998) "Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro." *Endocrinology*, 139, 1329-37.

Роботи, що цитуються вище і по всьому опису винаходу у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання.

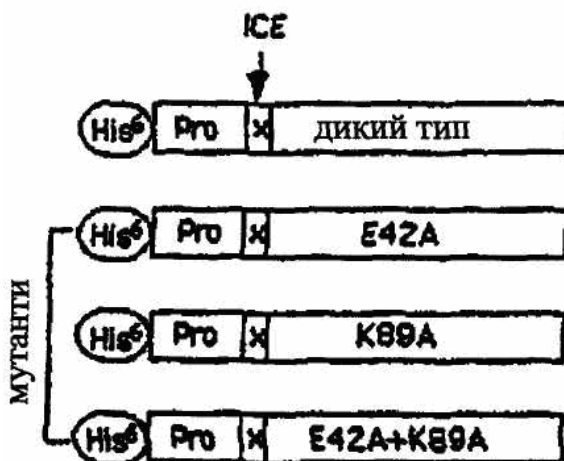


Fig. 1A

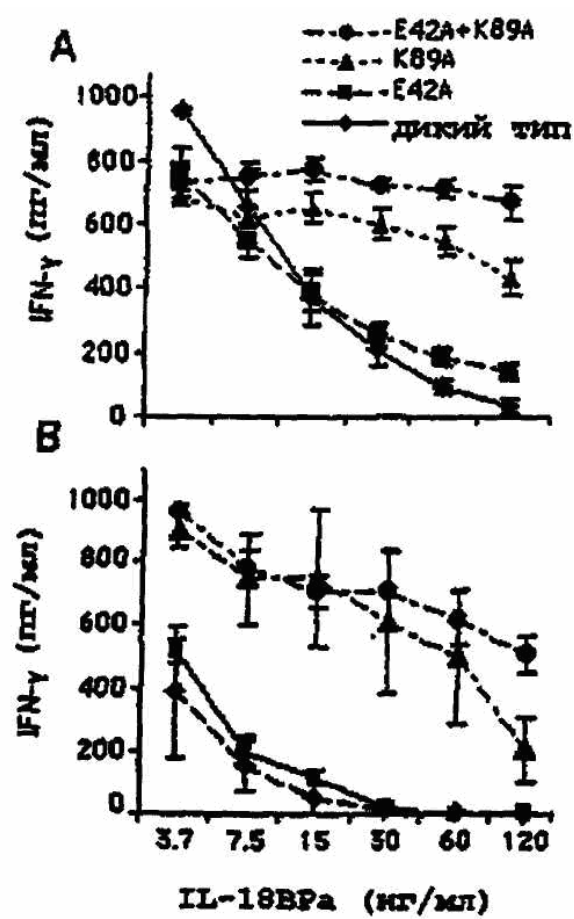
Tyr Phe Gly Lys Leu **Glu** Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn
 1 5 10 15
Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu **Phe Glu Asp**
 20 25 30
Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile
 35 40 45
 Ile Ser Met **Tyr Lys Asp Ser** Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile
 50 55 60
 Ser Val Lys **Cys** Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser **Cys** Glu Asn Lys Ile
 65 70 75 80
 Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys
 85 90 95
 Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys
 100 105 110
 Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr **Glu** Gly Tyr Phe Leu Ala **Cys** Glu
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu
 130 135 140
 Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp.
 145 150 155

SEQ ID NO: 2

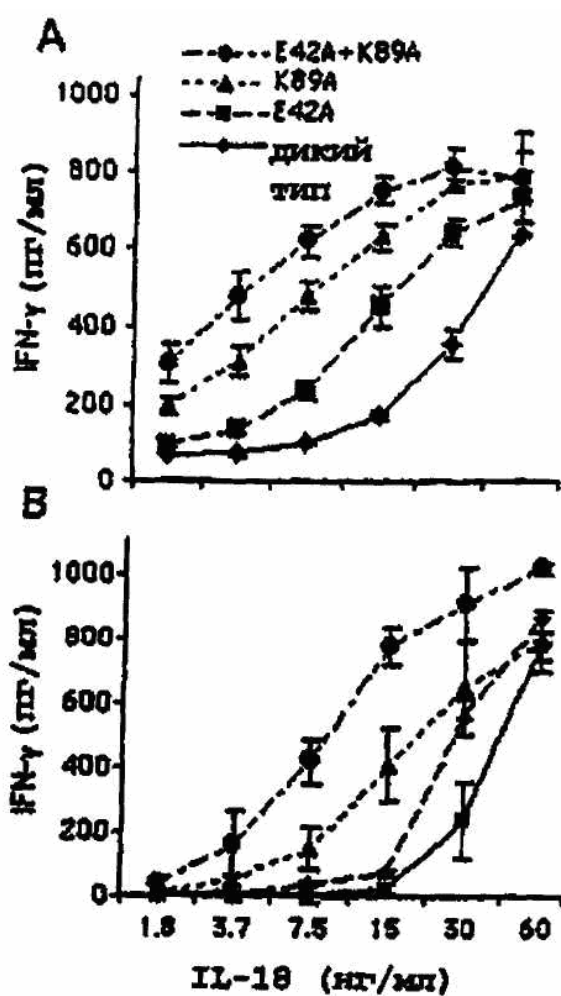
Фиг. 1B



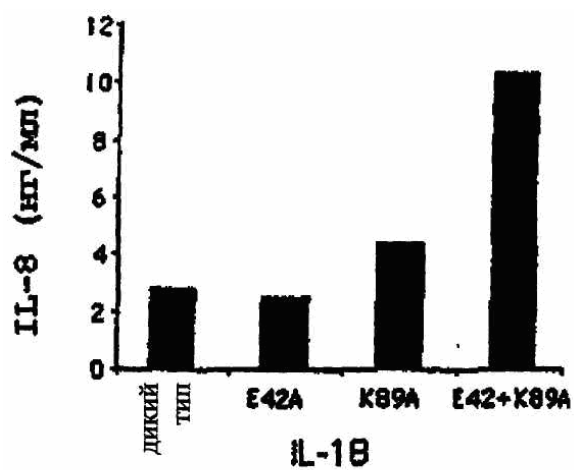
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Ares Trading S.A

Dinarello, Charles Kim, Soo Hyun

<120> Мутанти інтерлейкіну 18, їх продукування і застосування

<130> 475

<150> 60/274,327

<151> 2001-03-08

<160> 18

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 582

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 1

atggctgctg aaccagtaga agacaattgc atcaactttg tggcaatgaa atttattgac
60

aatacgcttt actttatagc tgaagatgat gaaaacctgg aatcagatta ctttggcaag
120

cttgaatcta aattatcagt cataagaaat ttgaatgacc aagttctctt cattgaccaa
180

ggaaatcggc ctctatttga agatatgact gattctgact gtagagataa tgcaccccg
240

accatattta ttataagtat gtataaagat agccagccta gaggtatggc tgtaactatc
300

tctgtgaagt gtgagaaaat ttcaactctc tcctgtgaga acaaaattat ttcctttaag
360

gaaatgaatc ctctgataa catcaaggat acaaaaagtg acatcatatt ctttcagaga
420

agtgtcccag gacatgataa taagatgcaa tttgaatctt catcatacga aggatacttt
480

ctagcttggtg aaaaagagag agaccttttt aaactcattt tgaaaaaaga ggatgaattg
540

ggggatagat ctataatggt cactgttcaa aacgaagact ag
582

<210> 2

<211> 157

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Ile	Arg	Asn	Leu	Asn	
1				5					10					15		
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Asp	
			20					25					30			
Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Arg	Asp	Asn	Ala	Pro	Arg	Thr	Ile	Phe	Ile	
		35					40					45				
Ile	Ser	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Met	Ala	Val	Thr	Ile	
	50					55					60					
Ser	Val	Lys	Cys	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Glu	Asn	Lys	Ile	
65					70					75				80		
Ile	Ser	Phe	Lys	Glu	Met	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	Lys	
				85					90					95		
Ser	Asp	Ile	Ile	Phe	Phe	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	His	Asp	Asn	Lys	
			100					105					110			
Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ala	Cys	Glu	
		115					120					125				
Lys	Glu	Arg	Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Glu	Asp	Glu	Leu	
	130					135					140					
Gly	Asp	Arg	Ser	Ile	Met	Phe	Thr	Val	Gln	Asn	Glu	Asp				
145					150					155						

<210> 3

<211> 193

<212> PRT

<213> Синтезована послідовність

<220>

<223> Синтезована послідовність PRT

<400> 3

Met	Ala	Ala	Glu	Pro	Val	Glu	Asp	Asn	Cys	Ile	Asn	Phe	Val	Ala	Met
1				5					10					15	
Lys	Phe	Ile	Asp	Asn	Thr	Leu	Tyr	Phe	Ile	Ala	Glu	Asp	Asp	Glu	Asn
			20					25					30		
Ile	Glu	Gly	Arg	Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Ala	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Ile
		35					40					45			
Arg	Asn	Leu	Asn	Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Pro
	50					55					60				
Leu	Phe	Glu	Asp	Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Arg	Asp	Asn	Ala	Pro	Arg
65					70				75						80
Thr	Ile	Phe	Ile	Ile	Ser	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Met
				85					90					95	
Ala	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Lys	Cys	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys
			100					105					110		
Glu	Asn	Lys	Ile	Ile	Ser	Phe	Lys	Glu	Met	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn	Ile
			115					120					125		
Lys	Asp	Thr	Lys	Ser	Asp	Ile	Ile	Phe	Phe	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Gly
	130					135					140				
His	Asp	Asn	Lys	Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe
145					150					155					160
Leu	Ala	Cys	Glu	Lys	Glu	Arg	Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys
				165					170					175	
Glu	Asp	Glu	Leu	Gly	Asp	Arg	Ser	Ile	Met	Phe	Thr	Val	Gln	Asn	Glu
			180					185					190		

Asp

<210> 4

<211> 193

<212> PRT

<213> Синтезована послідовність

<220>

<223> Синтезована послідовність PRT

<400> 4

Met	Ala	Ala	Glu	Pro	Val	Glu	Asp	Asn	Cys	Ile	Asn	Phe	Val	Ala	Met	1	5	10	15
Lys	Phe	Ile	Asp	Asn	Thr	Leu	Tyr	Phe	Ile	Ala	Glu	Asp	Asp	Glu	Asn	20	25	30	
Ile	Glu	Gly	Arg	Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Ile	35	40	45	
Arg	Asn	Leu	Asn	Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Pro	50	55	60	
Leu	Phe	Glu	Asp	Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Arg	Asp	Asn	Ala	Pro	Arg	65	70	75	80
Thr	Ile	Phe	Ile	Ile	Ser	Met	Tyr	Ala	Asp	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Met	85	90	95	
Ala	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Lys	Cys	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	100	105	110	
Glu	Asn	Lys	Ile	Ile	Ser	Phe	Lys	Glu	Met	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn	Ile	115	120	125	
Lys	Asp	Thr	Lys	Ser	Asp	Ile	Ile	Phe	Phe	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	130	135	140	
His	Asp	Asn	Lys	Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	145	150	155	160
Leu	Ala	Cys	Glu	Lys	Glu	Arg	Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	165	170	175	
Glu	Asp	Glu	Leu	Gly	Asp	Arg	Ser	Ile	Met	Phe	Thr	Val	Gln	Asn	Glu	180	185	190	

Asp

- <210> 5
- <211> 193
- <212> PRT
- <213> Синтезована послідовність
- <220>
- <223> Синтезована послідовність PRT
- <400> 5

Met	Ala	Ala	Glu	Pro	Val	Glu	Asp	Asn	Cys	Ile	Asn	Phe	Val	Ala	Met
1				5					10					15	
Lys	Phe	Ile	Asp	Asn	Thr	Leu	Tyr	Phe	Ile	Ala	Glu	Asp	Asp	Glu	Asn
			20					25					30		
Ile	Glu	Gly	Arg	Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Ala	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Ile
		35					40					45			
Arg	Asn	Leu	Asn	Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Pro
	50					55					60				
Leu	Phe	Glu	Asp	Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Arg	Asp	Asn	Ala	Pro	Arg
65					70					75					80
Thr	Ile	Phe	Ile	Ile	Ser	Met	Tyr	Ala	Asp	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Met
				85					90					95	
Ala	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Lys	Cys	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys
			100					105					110		
Glu	Asn	Lys	Ile	Ile	Ser	Phe	Lys	Glu	Met	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn	Ile
		115					120					125			
Lys	Asp	Thr	Lys	Ser	Asp	Ile	Ile	Phe	Phe	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Gly
	130					135					140				
His	Asp	Asn	Lys	Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe
145					150					155					160
Leu	Ala	Cys	Glu	Lys	Glu	Arg	Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys
				165					170					175	
Glu	Asp	Glu	Leu	Gly	Asp	Arg	Ser	Ile	Met	Phe	Thr	Val	Gln	Asn	Glu
			180					185					190		

Asp

<210> 6

<211> 157

<212> PRT

<213> Синтезована послідовність

<220>

<223> Синтезована послідовність PRT

<400> 6

Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Ile	Arg	Asn	Leu	Asn
1				5					10					15	
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Asp
			20					25					30		
Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Arg	Asp	Asn	Ala	Pro	Arg	Thr	Ile	Phe	Ile
		35					40					45			
Ile	Ser	Met	Tyr	Ala	Asp	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Met	Ala	Val	Thr	Ile
	50					55					60				
Ser	Val	Lys	Cys	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Glu	Asn	Lys	Ile
65					70					75				80	
Ile	Ser	Phe	Lys	Glu	Met	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	Lys
			85						90					95	
Ser	Asp	Ile	Ile	Phe	Phe	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	His	Asp	Asn	Lys
			100					105					110		
Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ala	Cys	Glu
		115					120					125			
Lys	Glu	Arg	Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Glu	Asp	Glu	Leu
	130					135					140				
Gly	Asp	Arg	Ser	Ile	Met	Phe	Thr	Val	Gln	Asn	Glu	Asp			
145					150					155					

<210> 8

<211> 157

<212> PRT

<213> Синтезована послідовність

<220>

<223> Синтезована послідовність PRT

<400> 8

Met	Ala	Ala	Glu	Pro	Val	Glu	Asp	Asn	Cys	Ile	Asn	Phe	Val	Ala	Met
1				5					10					15	
Lys	Phe	Ile	Asp	Asn	Thr	Leu	Tyr	Phe	Ile	Ala	Glu	Asp	Asp	Glu	Asn
			20					25					30		
Ile	Glu	Gly	Arg	Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Lys	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Ile
		35					40					45			
Arg	Asn	Leu	Asn	Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Pro
	50					55					60				
Leu	Phe	Glu	Asp	Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Arg	Asp	Asn	Ala	Pro	Arg
65					70					75					80
Thr	Ile	Phe	Ile	Ile	Ser	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Met
				85					90					95	
Ala	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Lys	Cys	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys
			100					105					110		
Glu	Asn	Lys	Ile	Ile	Ser	Phe	Lys	Glu	Met	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn	Ile
		115					120					125			
Lys	Asp	Thr	Lys	Ser	Asp	Ile	Ile	Phe	Phe	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Gly
	130					135					140				
His	Asp	Asn	Lys	Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe
145					150					155					160
Leu	Ala	Cys	Glu	Lys	Glu	Arg	Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys
				165					170					175	
Glu	Asp	Glu	Leu	Gly	Asp	Arg	Ser	Ile	Met	Phe	Thr	Val	Gln	Asn	Glu
			180					185					190		

Asp

<210> 10

<211> 157

<212> PRT

<213> Синтезована послідовність

<220>

<223> Синтезована послідовність PRT

<400> 10

Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Lys	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Ile	Arg	Asn	Leu	Asn
1				5					10					15	
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Asp
			20					25					30		
Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Arg	Asp	Asn	Ala	Pro	Arg	Thr	Ile	Phe	Ile
		35					40					45			
Ile	Ser	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Met	Ala	Val	Thr	Ile
	50					55					60				
Ser	Val	Lys	Cys	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Glu	Asn	Lys	Ile
65					70					75					80
Ile	Ser	Phe	Lys	Glu	Met	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	Lys
				85					90					95	
Ser	Asp	Ile	Ile	Phe	Phe	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	His	Asp	Asn	Lys
			100					105					110		
Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ala	Cys	Glu
		115					120					125			
Lys	Glu	Arg	Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Glu	Asp	Glu	Leu
	130					135					140				
Gly	Asp	Arg	Ser	Ile	Met	Phe	Thr	Val	Gln	Asn	Glu	Asp			
145					150					155					

<210> 11

<211> 29

<212> ДНК

<213> Синтезована послідовність

<220>

<223> Синтезована ДНК-послідовність

<400> 11

atatgaattc atggctgctg aaccagtag

29

<210> 12

<211> 24

<212> ДНК

<213> Синтезована послідовність

<220>

<223> Синтезована ДНК-послідовність

<400> 12

aaagtaacgt ccttcgatgt tttc

24

<210> 13

<211> 24

<212> ДНК

<213> Синтезована послідовність

<220>

<223> Синтезована ДНК-послідовність

<400> 13

gaaaacatcg aaggacgtta cttt

24

<210> 14

<211> 31

<212> ДНК

<213> Синтезована послідовність

<220>

<223> Синтезована ДНК-послідовність

<400> 14

atatggatcc tagtcttcgt ttgaacagt g

31

<210> 15

<211> 21

<212> ДНК

<213> Синтезована послідовність

<220>

<223> Синтезована ДНК-послідовність

<400> 15

taatttagat gcaagcttgc c

21

<210> 16

<211> 21

<212> ДНК

<213> Синтезована послідовність

<220>

<223> Синтезована ДНК-послідовність

<400> 16

ggcaagcttg catctaaatt a

21

<210> 17

<211> 21

<212> ДНК

<213> Синтезована послідовність

<220>

<223> Синтезована ДНК-послідовність

<400> 17

ctggctatct gcatacatat t

21

<210> 18

<211> 21

<212> ДНК

<213> Синтезована послідовність

<220>

<223> Синтезована ДНК-послідовність

<400> 18

agtatgtatg cagatagcca g

21