NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO (11) **315409** (13) B1

(51) Int Cl[7] A 61 K 38/20

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19940370	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1992.08.06, PCT/US92/06378
(22) Inng. dag	1994.02.04	(85) Videreføringsdag	1994.02.04
(24) Løpedag	1992.08.06	(30) Prioritet	1991.08.06, US, 742129
(41) Alm. tilgj.	1994.02.04		
(45) Meddelt dato	2003.09.01		

(71) Patenthaver Schering Corp, 2000 Galloping Hill Road, Kenilworth, NJ 07033-0530, US

(72) Oppfinner Rene de Waal Malefyt, Mountain View, CA 94040, US
Maureen Howard, Los Altos Hills, CA 94022, US
Di-Hwei Hsu, Palo Alto, CA 94306, US
Hiroshi Ishida, Wakayama City, Wakayama 641, JP
Anne O'Garra, Palo Alto, CA 94303, US
Hergen Spits, Palo Alto, CA 94303, US
Albert Zlotnik, Palo Alto, CA 94306, US

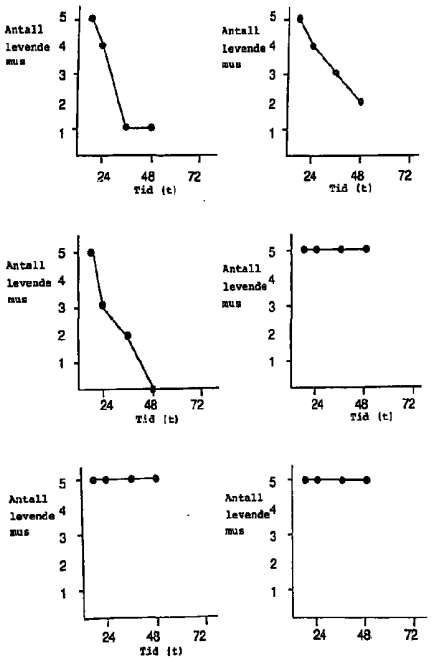
(74) Fullmektig Tandbergs Patentkontor AS, 0306 Oslo

(54) Benevnelse **Anvendelse av interleukin-10 eller en analog, agonist eller antagonist derav ved fremstillingen av et farmasøytisk preparat for modulering av betennelse eller T-celleformidlet immunfunksjon**

(56) Anførte publikasjoner WO 9100349
D.F. Fiorentino et al., The Journal of Immunology, vol. 146, No. 10, 1991, s. 3444-3451

(57) Sammendrag

Fremgangsmåte for behandling av septisk sjokk eller toksisk sjokk, som omfatter administrering av en effektiv mengde av interleukin-10.



Oppfinnelsens område

Foreliggende oppfinnelse vedrører anvendelse av interleukin-10 eller en analog, agonist eller antagonist derav ved fremstillingen av et farmasøytisk preparat for modulering av betennelse eller T-celleformidlet immunfunksjon, inkludert behandling av septiske eller toksiske sjokklignende symptomer, f.eks. endotoksin- eller superantigenindusert toksisitet, og autoimmuntilstander.

Bakgrunn

Alvorlige infeksjoner kan gi dyptgående fysiologiske og metabolske endringer. Symptomer kan variere, men omfatter feber, hypotensjon, metabolsk acidose, vevsnekrose, utstrakt organdysfunksjon og til sist død dersom de ikke blir korrekt behandlet. Se f.eks. Berkow (red.), The Merck Manual, Rahway, New Jersey; Weatherall et al. (red.), Oxford Textbook of Medicine, Oxford University Press, New York; Braunwald et al. (red.), Harrison's Textbook of Internal Medicine, McGraw-Hill, New York; eller Wyngaarden et al. (red.), Cecil's Textbook of Medicine, Saunders Co., Philadelphia. Septiske sjokk- og toksiske sjokktilstander er karakteristiske for forskjellige infeksjonsresponser og kan ofte oppvise noen av eller alle disse symptomene.

Septisk sjokk er en modell for endotoksininduserte responser. Septisk sjokk forårsakes av presentasjonen av et endotoksin, typisk en lipopolysakkaridkomponent (LPS-komponent) fra gramnegative bakteriecellevegger, overfor immunsystemet. Toksisk sjokk er en modell for superantigeninduserte responser og forårsakes av frigjørelse av en proteinkomponent fra grampositive bakteriecellemembraner, f.eks. stafylokokk-enterotoksin B (SEB). Selv om begge responsene til å begynne med forårsakes av en mikrobeinfeksjon, gir immunsystemet forskjellig respons på det mikrobielle produkt som forårsaker den respektive respons.

Sjokkresponsen indusert av endotoksin, f.eks. LPS, et vertsavledet protein, tumornekrosefaktor (TNF), er nylig blitt påvist å indusere mange av de skadelige effektene på gramnegative sårbetennelser. Passiv immunisering med antisera mot TNF kan forhindre mange av de dødelige effektene av gramnegativ bakteremi eller endotoksemi. Se f.eks. Tracey et al. (1986), Science, 234, s. 470-474; Beutler et al. (1986), Nature 320, s.

584-588; og Tracey et al. (1987), Nature 330, s. 662-664. Høye serumnivåer av TNF er også blitt observert ved flere andre infeksjonssykdommer, inkludert meningokokk-meningitt, malaria og leishmaniainfeksjon. Mange pasienter med høye blodomløpsnivåer av TNF har forøkt organdysfunksjon sammen med høyere dødelighet. Se f.eks. Waage et al. (1987), Lancet, s. 355-357; Girardin et al. (1988), New Engl. J. Med., 319, s. 397-400; Scuderi et al. (1988), Lancet, s. 1364-1365; og Kern et al. (1989), Am. J. Med., 87, fra s. 139.

Det er blitt rapportert at administrering av TNF enten til dyr eller til menneskeindivider resulterer i påvisbare serumnivåer av interleukin-6 (IL-6) 2-6 timer senere. McIntosh et al. (1989), J. Immunol., 143, s. 162-167; Jablons et al., J. Immunol., vol. 142, s. 1542 (1989); og Brouckaert et al., J. Exp. Med., vol. 169, s. 2257 (1989). IL-6, også kjent som B-cellestimulerende faktor-2, interferon-β_2, eller hepatocytt-stimulerende faktor, er blitt identifisert som et T-celleavledet glykoprotein som forårsaker B-cellemodning. Se f.eks. Kishimoto, Blood, 74, s. 1-10. Senere er IL-6 blitt påvist å ha pleiotrope, biologiske aktiviteter, inkludert induksjon av akuttfaseproteiner i hepatocytter og virkninger på hematopoeseforløpercelle og T-celler. Se f.eks. Geiger et al., Eur. J. Immunol., vol. 18, s. 717 (1988); Marinjovic et al., J. Immunol., vol. 1.42, s. 808 (1989); Morrone et al., J. Biol. Chem., vol. 263, s. 12554 (1988); og Perlmutter et al., J. Clin. Invest., vol. 84, s. 138 (1989). Starnes et al., J. Immunol., vol. 145, s. 4185-4191 (1990), har vist at en anti-stoffantagonist mot IL-6 forlenger overlevelse hos musemodeller med septisk sjokk.

Stafylokokk-enterotoksin B (SEB) er et superantigen og kan indusere en toksisk sjokkreaksjon. Disse reaksjonene skriver seg fra aktiveringen av et vesentlig undersett av T-celler, noe som fører til alvorlige T-cellemedierte, systemiske immunreaksjoner. Denne responsen er karakteristisk for T-cellemedierte responser som IL-10 eller dets analoger eller antagonister vil kunne anvendes til for å behandle terapeutisk. Fiorentino et al. (1991) J.Immunol., 146:3444-3451, gir data som er i overensstemmelse med at IL-10 virker på antigen-presenterende celler slik at cytokinproduksjon ved hjelp av Th1-celler inhiberes, men gir lite, om i det hele tatt noen informasjon vedrørende hvilke

cytokiner som påvirkes. Mosmann et al. (WO/91/00349) beskriver en cytokinsynteseinhibitorfaktor (CSIF), CSIF-analoger og CSIF-antagonister, og at den humane cytokinsynteseinhibitorfaktor har en aminosyresekvens som er identisk med den til human-IL-10. Mosmann et al. beskriver også anvendelsen av CSIF-analoger og -antagonister ved behandlingen av forstyrrelser som er forbundet med cytokinubalanse, og angir spesifikt at cytokinene påvirket av IL-10 er IFN-*gamma*, interleukin-2, lymfotoksin, interleukin-3 og granulocytt-makrofag-kolonistimulerende faktor.

Mekanistisk synes superantigenene å virke direkte på Vβ-elementet i T-cellereseptoren og aktivere T-celler med forholdsvis liten MHC-II-klassespesifisitet. Se Herman et al. (1991) i An. Rev. Immunol., 9, s. 745-772. For tiden behandles septiske tilstander, slik som septikemi, bakteremi og lignende, vanligvis med antimikrobielle forbindelser. Septikemi er vanlig på sykehus hvor bakterieinfeksjon ofte inntrer av kateterinnsettinger eller kirurgiske fremgangsmåter. Når slike tilstander er forbundet med sjokk, er det imidlertid ingen effektive hjelpetiltak innen behandlingen for lindring av sjokksyndromet som er forårsaket delvis av cytokiner indusert som svar på infeksjonen. Se f.eks. Young (1985), s. 468-470, i Mandell et al., (red.), Principles and Practice of Infectious Diseases (2. utg.), John Wiley & Sons, New York. Særlig fører behandling med antibiotika til mikrobiell død og frigjørelse av bakterieprodukter som forårsaker sjokkresponsen.

Bakteriell sepsis og beslektet septisk sjokk er ofte dødelige tilstander forårsaket av infeksjoner som skriver seg fra visse typer av kirurgi, bukhuletraumer og immunsuppresjon fra kreft- eller transplantasjonsterapi, eller andre medisinske forhold. I USA får over 700.000 pasienter hvert år bakterieinfeksjoner som forårsaker septisk sjokk. Av disse utvikler omtrent 160.000 symptomer på septisk sjokk, og omtrent 50.000 dør som et resultat av slike. Toksisk sjokk rammer færre personer hvert år, men alvorligheten av responsen er vanligvis langt mer livstruende.

På bakgrunn av de alvorlige følgene av disse voldsomme immunologiske responser på infeksjon er det et desperat behov for effektive teknikker for profylaktisk eller terapeutisk behandling av mikrobeindusert sjokk. Foreliggende oppfinnelse

tilveiebringer preparater og fremgangsmåter for behandling av disse og andre alvorlige immunologiske reaksjoner.

Oppsummering av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer anvendelse av interlukin-10 eller en analog, en agonist eller en antagonist derav ved fremstillingen av et farmasøytisk preparat for administrering til en vert for å modulere betennelse eller en T-celleformidlet immunfunksjon hos en vert, hvor betennelsen eller den T-celleformidlede immunfunksjon ledsages av et unormalt nivå av tumornekrosefaktor α. Interleukin-10 anvendt ifølge oppfinnelsen velges fortrinnsvis fra gruppen bestående av de ferdig utviklede polypeptider fra de åpne leserammene definert ved de følgende aminosyresekvenser:

Met His Ser Ser Ala Leu Leu Cys Cys Leu Val Leu Leu Thr Gly
Val Arg Ala Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys
Thr His Phe Pro Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg
Asp Ala Phe Ser Arg Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln
Leu Asp Asn Leu Leu Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys
Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr
Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile
Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu Asn Leu Lys Thr Leu Arg
Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu Pro Cys Glu Asn Lys
Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe Asn Lys Leu Gln
Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp Ile Phe Ile
Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asn

og

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

hvor den standard trebokstavsforkortelse brukes for å angi L-aminosyrer, idet man starter fra N-enden. Disse to formene av IL-10 henvises noen ganger til som henholdsvis human-IL-10 (eller human cytokinsynteseinhibitorfaktor) og virus-IL-10 (eller BCRF1). Se Moore et al. (1990), Science, 248, s. 1230-1234; Vieira et al. (1991), Proc. Natl. Acad. Sci., 88, s. 1172-1176; Fiorentino et al. (1989), J. Exp. Med., 170, s. 2081-2095; og Hsu et al. (1990), Science, 250, s. 830-832. Mutanter av den naturlige proteinsekvens, f.eks. allelvarianter og muteiner, inkludert delesjons- og innføyelsesvarianter, er alternative preparater hvis anvendelser her er tilveiebrakt.

Det er mer foretrukket at det fullt ferdige IL-10 som brukes ved anvendelsen ifølge oppfinnelsen, er valgt fra gruppen bestående av:

Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asn

og

Thr Asp Gln Cys Asp Asn Phe Pro Gln Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg Val Lys Thr Phe Phe Gln Thr Lys Asp Glu Val Asp Asn Leu Leu Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Glu Ala Lys Asp His Val Asn Ser Leu Gly Glu Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Ile Lys Asn Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Ile Lys Ala Arg.

Foreliggende oppfinnelse er delvis basert på den oppdagelse av IL-10 inhiberer både syntesen av flere cytokiner

som medierer uønskede betennelsesreaksjoner (f.eks. septisk sjokk), og aktiveringen av T-celler ved hjelp av superantigener, en hendelse som fører til toksiske, sjokklignende syndromer. Omvendt vil IL-10-antagonister forsterke disse samme immunresponsene, og slik forsterkning er i virkeligheten ønskelig i andre kliniske sammenhenger, f.eks. ved visse tumor- og autoimmunmodeller.

Kort beskrivelse av figurene

Figur 1. Illustrasjon av TRPC11-plasmidet. (Se eksempel 3)

Figur 2. IL-4, hIL-10 og vIL-10 inhiberer (A) IFNγ- og (B) TNFα-syntese ved IL-2-aktiverte, mononukleære celler fra perifert blod (PBMC). ND, ikke bestemt. Feilstreker viser området for dobbeltprøver i ett forsøk. PBMC fra forskjellige donorer varierte i sin kapasitet for fremstilling av IFNγ og TNFα når de ble stimulert med IL-2. Inhibitoreffektene av IL-4 og IL-10 reverseres av henholdsvis (c) anti-IL-4- og (d) anti-IL-10-nøytraliserende antistoffer. PBMC ble dyrket som beskrevet i forsøksdelen, med 200 U/ml rekombinant IL-2 (rIL-2) og varierende mengder av enten rIL-4 eller COS-celleprodusert human-IL-10 (COS-hIL-10) i nærvær av 10 µg/ml nøytraliserende anticytokin eller isotypekontrollimmunglobuliner. Antistoff og cytokin ble inkubert i 30 minutter før tilsetning av PBMC.

Figur 3. (A) IL-4, men ikke human-IL-10 (hIL-10) eller virus-IL-10 (vIL-10), inhiberer lymfocyttaktivert dreperaktivitet (LAK-aktivitet) indusert av IL-2 i PBMC. PBMC fra et lignende forsøk som det i figur 2, ble innhøstet sammen med supernatantene og testet med hensyn på cytotoksisitet mot ^{51}Cr-merkede COLO- (endetarmkarsinom, figur 3A1) og Daudi- (Burkitts lymfom, figur 3A2) celler. (B) LAK-aktivitet uttrykkes av CD56+-celler i PBMC dyrket med IL-2 og IL-10. PBMC ble farget med anti-CD56-antistoff konjugert til FITC og sortert på en "FacStar Plus" (Becton-Dickinson, San Jose, CA). Cytotoksisk aktivitet i CD56+- og CD56--fraksjonene ble testet. Lignende resultater ble oppnådd med celler avledet fra kulturer av PBMC med IL-2 alene.

Figur 4. (A) IL-2-indusert IFNγ-syntese med rensede NK-celler inhiberes direkte med IL-4, men hverken med hIL-10 eller vIL-10. FACS-rensede NK-celler (renhet >99,5%) ble dyrket

ved 10^6 celler/ml med 200 enheter/ml rIL-2, enten med 500 enheter/ml rIL-4 eller COS-hIL-10-, COS-vIL-10- eller COS-pseudo-supernatanter (10%) i Yssels medium i 4-5 dager, så ble supernatanter fra dobbeltkulturer samlet opp og blandet for måling av IFNγ ved hjelp av ELISA. (B) IL-2-indusert proliferasjon ved hjelp av rensede NK-celler og PBMC inhiberes med IL-4, men ikke med hIL-10/vIL-10 (figur 4B1: sortert NK, figur 4B2: PBL).

Figur 5. (A) Tilsetning av adherente celler, men ikke T-celler, gjenopprettet IL-10-mediert inhibering av IL-2-indusert IFNγ-syntese med rensede NK-celler. (B) Tilsetning av rensede monocytter gjenopprettet IL-10-mediert inhibering av IL-2-indusert IFNγ-syntese med rensede NK-celler. Monocytter alene produserte mindre enn påvisbare mengder av IFNγ. Feilstreker viser området for dobbeltprøver i ett forsøk. IFNγ-produksjon i fravær av IL-2 var under påvisningsgrensene (figur 2). NK-celler fra forskjellige givere varierte med hensyn til kapasitet for fremstilling av IFNγ. (C) Virkninger av IL-10 på IL-2-indusert TNFα-syntese med NK-celler, CD14+-celler og begge celletypene sammen. NK-celler (10^6 celler/ml) og/eller CD14+-celler (3 x 10^5 celler/ml) ble dyrket i 5 dager i nærvær eller fravær av 400 U/ml rIL-2- og 10% COS-hIL-10-supernatant.

Figur 6. Kinetikken med IL-10-, IL-6-, TNFα- og GM-CSF-produksjon med humane monocytter aktivert ved hjelp av LPS. Humanmonocytter isolert ved sentrifugeoppslemming, ble dyrket i teflonposer (4 x 10^6 celler/ml) i fravær eller nærvær av LPS (1 µg/ml), og fremstilling av (A) IL-10, (B) IL-6, (C) TNFα eller (D) GM-CSF ble bestemt i dyrkningssupernatantene innhøstet på tidspunktene angitt ved hjelp av cytokin-spesifikke ELISA-er.

Figur 7. Fremstillingen av IL-10 ved hjelp av humanmonocytter som respons på økende konsentrasjoner av LPS. Humanmonocytter (4 x 10^6 celler/ml) ble dyrket i teflonposer med økende konsentrasjoner av LPS i 24 timer, og produksjonen av IL-10 ble bestemt ved hjelp av ELISA.

Figur 8. Virkningene av IL-10 på fremstillingen av cytokiner ved hjelp av monocytter aktivert med IFNγ, LPS eller LPS og IFNγ. Humanmonocytter (4 x 10^6 celler/ml) ble dyrket med IFNγ (100 U/ml), 1, 10, 100 eller 1000 ng/ml LPS, og kombina-

sjoner av LPS (1, 10, 100 eller 1000 ng/ml) og IFNγ (100 U/ml) enten i fravær (□) eller nærvær (▨) av IL-10 (100 U/ml) i 24 timer, og fremstilling av (A) IL-1α, (B) IL-1β, (C) IL-6, (D) TNFα eller (E) GM-CSF ble bestemt ved hjelp av cytokinspesifikke ELISA-er i supernatantene.

Figur 9. Virkningene av human-IL-10 eller virus-IL-10 på fremstillingen av TNFα og GM-CSF med LPS-aktiverte monocytter. Humanmonocytter (4 x 10^6 celler/ml) ble aktivert med LPS (1 µg/ml) og dyrket med human-IL-10 (100 U/ml) eller virus-IL-10 i fravær eller i nærvær av nøytraliserende anti-IL-10-mAb-19F1 (10 µg/ml) i 24 timer, og fremstilling av (A) TNFα eller (B) GM-CSF ble bestemt ved hjelp av cytokinspesifikke ELISA-er.

Figur 10. Virkningene av eksogent IL-10, endogent fremstilt IL-10 og IL-4 på ekspresjonen av cytokinspesifikke mRNA-nivåer ved hjelp av humanmonocytter aktivert med LPS. Humanmonocytter (4 x 10^6 celler/ml) ble dyrket i medium ved 4°C og 37°C, eller aktivert med LPS (1 µg/ml) i fravær eller nærvær av IL-4 (100 U/ml), IL-10 (100 U/ml) og nøytralisering av anti-IL-10-mAb-19F1 (10 µg/ml), og mRNA ble isolert etter 24 timer. Ekspresjon av β-actin, IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, TNFα, GM-CSF og G-CSF ble bestemt på reverstranskribert mRNA ved hjelp av PCR-analyser med cytokinspesifikke primere etterfulgt av Southern-blotting av reaksjonsproduktene med interne prober. cDNA erholdt fra en $CD4^+$-T-celleklon, ble tatt med som kontroll for ekspresjon av TNFα og GM-CSF.

Figur 11. Virkningene av IL-10 på ekspresjonen av nivåer av cytokinspesifikk mRNA ved hjelp av humanmonocytter aktivert med LPS. mRNA ble isolert fra humanmonocytter (4 x 10^6 celler/ml), aktivert med LPS (1 µg/ml) i fravær eller nærvær av IL-10 (100 U/ml) i 7 timer, og ekspresjon av IL-6, IL-8, IL-10, TGFβ og β-actin ble bestemt ved hjelp av Northern-analyser.

Figur 12. Virkningene av eksogent IL-10, endogent fremstilt IL-10 og IL-4 på ekspresjonen av IL-10 og nivåer av TGFβ-spesifikk mRNA ved hjelp av humanmonocytter aktivert med LPS. Humanmonocytter (4 x 10^6 celler/ml) ble dyrket i medium ved 4°C og 37°C eller aktivert med LPS (1 µg/ml) i fravær eller nærvær av IL-4 (100 U/ml), IL-10 (100 U/ml) og nøytral-

isering av anti-IL-10-mAb-19F1 (10 µg/ml). mRNA ble isolert etter 24 timer. Ekspresjon av (A) IL-10, TGFβ og β-actin ble bestemt ved hjelp av Northern-analyser, og (B) ekspresjon av IL-10 ble bestemt på reverstranskribert mRNA ved hjelp av PCR-analyse med cytokinspesifikke primere etterfulgt av Southern-blotting av reaksjonsprodukten med interne prober.

Figur 13. Virkningene av endogent fremstilt IL-10 på klasse II-MHC-ekspresjon ved hjelp av humanmonocytter aktivert med LPS. Humanmonocytter ble dyrket med (A) 0 ng/ml LPS, (B) 0,1 ng/ml LPS, (C) 10 ng/ml LPS eller (D) 1000 ng/ml LPS i fravær eller nærvær av nøytraliserende anti-IL-10-mAb-19F1 (10 µg/ml) i 40 timer. Ekspresjon av HLA-DR/DP (Q5/13) ble bestemt ved indirekte immunofluorescens.

Figur 14. Virkning av IL-10 på APC-funksjon av makrofagcellelinjer. Topp (figur 14A). 1G18.LA- eller PU5.1-makrofagcellelinjer (10^6 celler/ml) ble aktivert med IFNγ (2 ng/ml). Disse APC ble så vasket og inkubert (10^5 celler/-brønn) med HDK.1-Th1-celler (5 x 10^4 celler/brønn) og antigen (TNP-KLH, 10 µg/ml), i nærvær (▨) eller fravær (■) av renset IL-10 (200 enheter/ml). Supernatanter ble samlet opp etter 48 timer og testet med hensyn på IFNγ. Bunn (figur 14B). 1G18.LA-makrofager ble aktivert som ovenfor og så inkubert (10^5 celler/brønn) med enten HDK.1-Th1-celler (5 x 10^4 celler/brønn) pluss TNP-KLH (10 µg/ml), eller DO11.10 T-cellehybridom (5 x 10^4 celler/brønn) pluss ovalbumin (2,5 mg/ml) i nærvær (▨) eller fravær (■) av renset IL-10 (bunn) (200 enheter/ml). Supernatanter ble samlet opp etter 20 timer og testet med hensyn på IL-2. I alle panelene er gjennomsnittene og SD for kulturer in triplo vist.

Figur 15. IL-10 induserer en morfologisk endring i rensede, peritoneale makrofager. Peritoneale makrofager (Mac-1^{+}, Ly^{s}, $B220^{-}$) ble renset på FACS og så inkubert i 72 timer i nærvær av IFNγ (2 ng/ml) (topp, figur 15A), eller IFNγ (2 ng/ml) pluss IL-10 (200 enheter/ml) (bunn, figur 15B). Supernatantene ble fjernet, cellene lufttørket, fiksert og farget med Wright's-Giemsa, tørket og så fotografert.

Figur 16. IL-10 inhiberer LPS-indusert fremstilling av IL-1-, TNF-α- og IL-6-proteiner ved hjelp av makrofagcellelinjer. Makrofagcellelinjene 1G18.LA (figurene 16A, B og C)

pluss PU5.1 (figurene 16D, E og F) ble inkubert (10^6 celler/ml) med LPS (10 µg/ml), eller LPS (10 µg/ml) pluss IFNγ (2 ng/ml), i nærvær eller fravær av IL-10 eller IL-4 (i noen tilfeller) begge ved 200 enheter/ml som angitt. Supernatantene ble samlet opp og testet med hensyn på deres nivåer av IL-1, IL-6 eller TNF-α.

Figur 17 (delene A, B1, B2 og C). IL-10 inhiberer den LPS-induserte ekspresjon av TNF-α-RNA i en makrofagcellelinje. 1G18.LA-makrofagcellelinjen ble stimulert som i figur 16. Supernatanter ble fjernet etter 6 timer og guanidiniumisotiocyanatoppløsning ble tilsatt når cellene ble innhøstet for RNA-fremstilling. 10 µg total-RNA fra prøvene av 1G18.LA-cellelinjen stimulert på denne måte, ble fylt på en gel, blottet og så prøvd med hensyn på TNFα og actin.

Figur 18: stimulering av peritonealmakrofager. IL-10 inhiberer LPS-indusert syntese av IL-6-protein med peritonealmakrofager. Peritonealmakrofager (Mac-$1^{+\cdot lys}$, $B220^-$) ble renset på FACS og så inkubert alene, eller med LPS (10 µg/ml) i nærvær eller fravær av IL-10 (200 enheter/ml), anti-IL-10 (10 µg/ml) eller IFNγ (2 ng/ml), ved 7 x 10^5 celler/ml. Supernatantene ble innhøstet og testet med hensyn på nivåer av IL-6 i forhold til en kjent standard under anvendelse av en spesifikk immunologisk analyse (ELISA).

Figur 19. IL-10 nedregulerer ikke en oppløselig kostimulator eller induserer en oppløselig inhibitor fra makrofagen. (A) Supernatanter ble erholdt fra 1G18.LA-makrofagcellelinjen (10^6 celler/ml) etter stimulering med IFNγ i 24 timer og så videre stimulering med Th1-celler (HDK-1, 2 x 10^5 celler/ml) og antigen (KLH, 500 µg/ml) i 24 timer. Supernatantene ble konsentrert og tømt for IFNγ og IL-2 og så brukt i en CSIF-analyse. Disse supernatantene alene inneholdt ikke selv påvisbare nivåer av IFNγ. IFNγ-aktivert 1G18.LA-makrofag-APC (10^5 celler/brønn) ble inkubert med HDK-1-celler (5 x 10^4 celler/brønn) og antigen (TNP-KLH, 10 µg/ml) alene (Δ) eller i nærvær av varierende mengder av IL-10 pluss (□) eller minus (▲) de ovenfor nevnte supernatanter (sluttkonsentrasjon 25%). Supernatanter fra CSIF-analysen ble samlet opp etter 48 timer og analysert med hensyn på IFNγ-nivåer. Gjennomsnittsverdien og SD for kulturer in triplo i ett forsøk er vist. (B) Regul-

erte mengder av rensede miltmakrofager i fravær (■) eller nærvær av IL-10 (□) (200 enheter/ml); eller en blanding av regulerte mengder av rensede makrofager sammen med B-celler (2,5 x 10^3 celler/brønn) i fravær (●) eller nærvær av IL-10 (○) (200 enheter/ml); eller B-celler alene i fravær (◒) eller nærvær av IL-10 (◓) (200 enheter/ml); ble brukt som APC for HDK-1-Th1-klonen (10^4 celler/brønn) med TNP-KLH (10 µg/ml). Etter 48 timer ble supernatantene samlet opp og analysert med hensyn på IFNγ. Gjennomsnittene og SD for kulturer in triplo er vist.

Figur 20. IL-10 beskytter mot SEB-indusert toksisitet i Balb/C-mus; figur 20A: 20 µg SEB/30 mg d-Gal; figur 20B: IL-10/20 µg SEB/30 mg d-Gal; figur 20C: 10 µg SEB/30 mg d-Gal; figur 20D: IL-10/10 µg SEB/30 mg d-Gal; figur 20E: 30 mg galaktosamin; figur 20F: 10 µg IL-10.

Figur 21. IL-10 beskytter mus mot dødelig endotoksemi. Grupper med 20 BALB/c-mus ble injisert intraperitonealt (i.p.) enten med 350 µg LPS eller 350 µg LPS sammen med varierende mengder renset, rekombinant murin-IL-10. Død ble overvåket i løpet av de påfølgende 6 dager.

Figur 22. Anti-IL-10-antistoffer nøytraliserer IL-10 sin evne til å beskytte mus mot dødelig endotoksemi. Grupper med 20 BALB/c-mus fikk enten 1 mg 2A5-anti-IL-10-antistoff (figur 22A) eller 1 mg GL113-isotypekontrollantistoff (figur 22B) intraperitonealt én time før LPS-administrering. Mus ble så injisert med 350 µg LPS i.p. enten alene eller sammen med varierende mengder IL-10, som beskrevet i teksten til figur 21.

Figur 23. IL-10 beskytter mus mot dødelig endotoksemi når det administreres 30 minutter etter LPS-injeksjon. Grupper med 20 BALB/c-mus fikk 350 µg LPS i.p. på tidspunkt 0, og 1,0 µg rekombinant IL-10 i.p. på tidspunktene 0, 1/2, 1, 2 og 5 timer etter LPS-injeksjon. Kontrollmus som fikk 350 µg LPS i.p. i fravær av IL-10, døde alle i dette forsøket.

Figur 24. Immunofluorescensanalyse av overflate-IgM- og -IgD-ekspresjon av de samlede, levende celler erholdt ved utvasking av bukhulen som fås fra anti-IL-10-behandlede og kontrollmus. BALB/c-mus ble injisert fra fødselen av og inntil 8 uker med SXC-1-anti-IL-10-antistoff (figur 24D). J5/D isotypekontrollantistoff (figur 24B), fosfatbufret saltoppløsning

(PBS) (figur 24C), eller ingenting (figur 24A), som beskrevet i den eksperimentelle del. Resultater viser fluorescensstyrkene til 5000 levende celler tellet fra hver forsøksgruppe.

Figur 25. Serum-IgM-nivåer av anti-IL-10-behandlede og kontrollmus testet etter 8 uker med behandling. Resultatene viser det geometriske gjennomsnitt ± SEM for fem individuelle sera i hver gruppe og omfatter data fra to forskjellige forsøk. Tre ytterligere forsøk ga de samme resultater.

Figur 26. Antistoffresponser *in vivo* hos anti-IL-10-behandlede og kontrollmus mot α1,3-dekstran (figur 26B) eller fosforylcholin (figur 26A). BALB/c-mus ble injisert fra fødselen av inntil 9 uker med SXC.1-anti-IL-10-antistoff, J5/D-isotypekontrollantistoff, PBS, eller forble ubehandlet. Etter 8 uker ble mus utfordret med α1,3-dekstran, eller varmedrepte *Streptococcus pneumoniae* som en kilde for fosforylcholin, som beskrevet i den eksperimentelle del. Resultater viser det geometriske gjennomsnitt ± SEM for spesifikke antistoffnivåer påvist i fem individuelle sera.

Figur 27. Immunofluorescensanalyse av overflate-B220- og -CD3-ekspresjon i levende miltlymfoidceller erholdt fra SXC.1-anti-IL-10-behandlede og kontrollmus. For nærmere detaljer, se teksten til figur 24 - delene A-D i figur 27 tilsvarer henholdsvis delene A-D i figur 24.

Figur 28. Respons *in vivo* på anti-IL-10-behandlede og kontrollmus på TNP-KLH. Mus ble injisert fra fødselen av inntil 10 ukers alder med anti-IL-10-antistoff (●), eller en isotypekontroll (O). Etter 8 uker ble dyrene utfordret intraperitonealt med 10 µg TNP-KLH. Serumnivåer av TNP-spesifikt IgM (figur 28A) og IgG (figur 28B) ble bestemt henholdsvis 7 og 14 dager etter immunisering. Resultatene viser tre separate forsøk hvor hver ring representerer en individuell mus.

Figur 29. Anti-IL-10-antistoffer er ikke direkte cytotoksiske for B-celler fra bukhuleutvasking. Ubehandlede 8 uker gamle BALB/c-mus ble injisert intraperitonealt med 1 mg anti-IL-10-antistoff (SXC.1 - figur 29, delene A, B og C), eller 1 mg av en isotypekontroll (J5/D -figur 29, delene D, E og F). Celler fra bukhuleutvasking ble samlet opp fra

forskjellige dyr 1, 2 eller 3 dager senere og analysert med hensyn på samekspresjon av overflate-IgD og -IgM. Resultater viser fluorescensstyrkene til 5000 levende celler tellet fra hver forsøksgruppe.

Figur 30. Serum-IFNγ-nivåer i anti-IL-10-behandlede eller kontrollmus. BALB/c-mus ble injisert fra fødselen av inntil 8 uker med anti-IL-10-antistoff (●) eller en isotype-kontroll (O). Sera samlet opp etter 8 uker, ble analysert med hensyn på IFNγ ved immunologisk analyse. Resultatene viser fem separate forsøk hvor hver ring representerer en individuell mus.

Figur 31. Samadministrering av anti-IFNγ-antistoffer reduserer anti-IL-10-behandlingsmulighet for å tømme mus for bukhule-B-celler. BALB/c-mus ble behandlet fra fødselen av inntil 8 uker med anti-IL-10-antistoffer (figur 31C), med anti-IL-10- pluss anti-IFNγ-antistoffer (figur 31B), eller var ubehandlet (figur 31A). Celler fra bukhuleutvasking ble så analysert med hensyn på samekspresjon av B220 og av IgM. Resultatene viser fluorescensstyrkene til 5000 levende celler tellet fra hver forsøksgruppe.

Figur 32. Serum-TNFα-nivåer i anti-IL-10-behandlede mus etter 8 uker. Mus ble behandlet fra fødselen av inntil 8 uker med SXC.1-anti-IL-10-antistoff (●) eller et isotypetil-passet kontrollantistoff (O), som beskrevet i den eksperimentelle del. Sera samlet opp etter 8 uker, ble analysert med hensyn på TNFα-innhold ved hjelp av ELISA. Resultatene viser 5 separate forsøk hvor hver ring representerer en individuell mus.

Figur 33. Serum-IL-6-nivåer i anti-IL-10-behandlede mus. Sera samlet opp fra mus behandlet fra fødselen av inntil 8 uker med SCX.1-anti-IL-10-antistoff (●) eller et isotypetil-passet kontrollantistoff (O), ble analysert med hensyn på IL-6-innhold ved hjelp av ELISA. Resultatene viser 5 separate forsøk hvor hver ring representerer en individuell mus.

Figur 34. Anti-IL-10-behandlede mus oppviser forøkt dødsømfintlighet på grunn av LPS-indusert sjokk (500 µg LPS i figur 34A, 400 µg LPS i figur 34B, 100 µg LPS i figur 34C, 50 µg LPS i figur 34D, 50 µg LPS i figur 34E og 1 µg LPS i figur 34F). Mus ble behandlet fra fødselen av inntil 8 ukers

alder med enten SXC.1-rotte-IgM-anti-IL-10-antistoff (●), 2A5-rotte-IgG_1, anti-IL-10-antistoff (▲), eller passende isotype-kontrollantistoffer (O) (Δ). Etter 8 uker ble mus (5 mus/-gruppe) injisert intraperitonealt med forskjellige mengder LPS. Død ble overvåket i løpet av de påfølgende 4 dager.

Figur 35. Serumnivåer av immunglobulinisotyper i anti-IL-10-behandlede mus. Mus ble behandlet fra fødselen av inntil 8 uker med SXC.1- eller 2A5-anti-IL-10-rotteantistoffer, de passende isotypekontrollantistoffer eller PBS. Sera samlet opp etter 8 uker, ble analysert med hensyn på innhold av totalt murint IgG1 (figur 35A), IgG2a (figur 35C), IgG2b (figur 35E), IgG3 (figur 35B), IgE (figur 35D) eller Iga (figur 35F) under anvendelse av isotypespesifikke immunglobulin-ELISA-er. Resultatene viser fire uavhengige forsøk for hver immunglobulinisotypeanalyse. Innenfor hvert forsøk er data vist som det geometriske gjennomsnitt ± S.E.M. av immunglobulinnivåer påvist i 5 individuelle sera.

Figur 36. Ly1-B-celleuttømming hos anti-IL-10-behandlede mus er forbigående. Mus ble behandlet fra fødselen av inntil 8 ukers alder med SXC.1-anti-IL-10-antistoff, og så ble behandlingen avbrutt. Celler fra bukhuleutvasking ble samlet opp fra forskjellige grupper av slike mus (3 mus/gruppe) etter 8 uker (figur 36A og D), 12 uker (figur 36B og E) og 16 uker (figur 36C og F). Resultatene viser immunofluorescensanalyse av overflate-IgM- og overflate-B220-ekspresjon ved hjelp av de samlede levende celler fra bukhuleutvasking som utgjør 5000 levende celler fra hver forsøksgruppe.

Figur 37. Immunofluorescensanalyse av overflate-Ly1- og overflate-IgM-ekspresjon av lymfoidceller fra bukhuleutvasking erholdt fra SXC.1-anti-IL-10-behandlede (figur 37D) eller kontrollmus (behandlet med J5/D-isotypekontrollantistoff i figur 37C, fosfatbufret saltoppløsning (PBS) i figur 37B, eller ingenting i figur 37A). Resultatene viser fluorescensstyrkene til 5000 levende celler tellet fra hver forsøksgruppe.

Figur 38. Immunofluorescensanalyse av overflate-Mac-1- og overflate-IgM-ekspresjon av de samlede levende celler fra bukhuleutvasking erholdt fra SXC.1-anti-IL-10-behandlede eller kontrollmus (sammenlign figur 37). Resultatene viser

fluorescensstyrkene til 5000 levende celler tellet fra hver forsøksgruppe.

Figur 39. Antistoffrespons *in vivo* for anti-IL-10-behandlede eller kontrollmus mot TNP-Ficoll. Mus ble injisert fra fødselen av inntil 9 ukers alder med SXC.1-anti-IL-10-antistoff (O) eller et isotypekontrollantistoff (●). Etter 8 uker ble dyrene utfordret intraperitonealt med 10 µg TNP-Ficoll. Serumnivåer av TNP-spesifikt IgM eller IgG ble bestemt henholdsvis 5 og 10 dager senere ved hjelp av ELISA. Hver dataring representerer en individuell mus.

Figur 40. Anti-IL-10-antistoffbehandling forsinker inntreden av autoimmunitet hos NZB/W-mus. Grupper med 20 NZB/W F1-hunnmus ble injisert tre ganger pr. uke fra fødselen av og gjennom hele undersøkelsen enten med SXC-1-rotte-IgM-anti-muse-IL-10-antistoff (●) eller et isotypekontrollantistoff betegnet J5/D (O). Dyrenes overlevelse ble overvåket over de følgende 42 uker.

Figur 41. Utvikling av proteinuri (> 3+) hos NZB/W-hunnmus behandlet med anti-IL-10-antistoffer. Grupper med 22 NZB/W F1-hunnmus ble injisert tre ganger pr. uke fra fødselen av og gjennom hele undersøkelsen enten med SXC-1-anti-IL-10-antistoff (●) eller et isotypekontrollantistoff (O). Utvikling av nyresykdom ble fastslått ved å måle proteinuri under anvendelse av "Albustix" dyppepinner fra uke 12 inntil uke 42. Data viser andelen av mus med mer enn 300 mg protein/dl i urinen.

Figur 42. Histologisk undersøkelse av nyrer fra anti-IL-10-behandlede NZB/W-mus. Figur 42A viser en kontroll-NZB/WF1-nyre (PAS-farging): det er alvorlig glomerulonefritt med homogen avsetning av immunkomplekser og proteinavstøpninger i kanalene, noe som indikerer proteinlekkasje til kanalene. Figur 42B viser en anti-IL-10-behandlet NZB/WF1-nyre (PAS-farging).

Figur 43. Autoantistoffproduksjon hos anti-IL-10-behandlede NZB/W-mus. NZB/W-hunnmus ble injisert med SXC-1-anti-IL-10-antistoff (●) eller en isotypekontroll (O) hver tredje dag fra fødselen av og gjennom hele undersøkelsen. Sera samlet opp etter 5 måneder og 6 måneder, ble evaluert med hen-

syn på innhold av IgG-antistoffer som binder dobbelttrådet DNA, under anvendelse av en ELISA. Hver ring representerer en individuell mus.

Figur 44. Serum-TNFα-nivåer hos anti-IL-10-behandlede NZB/WF1-mus. NZB/W-hunnmus ble injisert med SXC-1-anti-IL-10-antistoff (●) eller en isotypekontroll (O) hver tredje dag fra fødselen av og gjennom hele undersøkelsen. Sera samlet opp etter 5 måneder, 7 måneder og 8 måneder, ble evaluert med hensyn på TNFα-innhold under anvendelse av en cytokinspesifikk ELISA. Hver ring representerer en individuell mus.

Figur 45. Anti-TNFα-antistoffer reverserer anti-IL-10-indusert beskyttelse av NZB/WF1-mus. Grupper med 36 og 18 NZB/W-hunnmus ble injisert to ganger ukentlig med henholdsvis 2A5-anti-IL-10-antistoff (■) (▲), og et isotypekontrollanti-stoff betegnet GL113 (□) fra fødselen av og gjennom hele forsøket. Halvparten av dyrene injisert med anti-IL-10-antistoff, fikk i tillegg XT22-anti-TNFα-antistoff to ganger ukentlig med oppstarting 30 uker etter fødselen (▲). Dyrenes overlevelse ble overvåket over et tidsrom på 34 uker.

Nærmere beskrivelse av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse er rettet mot anvendelse av IL-10 eller analoger, agonister eller antagonister derav ved fremstilling av et farmasøytisk preparat for administrering til en vert, for å modulere betennelse eller en T-celleformidlet immunfunksjon, særlig for å forhindre og/eller redusere de skadelige effektene av mikrobielt indusert sjokk eller kontrollere B-celledifferensiering eller -utvikling. IL-10 for anvendelse ifølge oppfinnelsen er fortrinnsvis valgt fra gruppen av fullt ferdige polypeptider kodet for av de åpne leserammene definert ved cDNA-innføyelsene pH5C, pH15C og pBCRF1(SRa), som er deponert ved American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, henholdsvis under deponeringsnumrene 68191, 68192 og 68193.

IL-10 inhiberer TNFα- og IFNγ-syntese hos monocytter eller monocytter pluss naturlige dreperceller (NK), men ikke hos NK-celler alene. IL-4 inhiberer direkte cytokinutskillelse fra IL-2-aktiverte NK-celler. Dette tyder på at IL-4 og IL-10

virker på NK-celler via forskjellige reaksjonsveier, f.eks. krever IL-10-virkning deltakelse av monocytter. IL-10 inhiberer cytokinutskillelse fra IL-2-aktiverte NK-celler, men ikke LAK-aktivitet, noe som tyder på at IL-2-indusert cytokinsyntese og lymfocyttaktivert dreperaktivitet (LAK-aktivitet) reguleres av forskjellige mekanismer.

IL-10 er påvist å ha en antiinflammatorisk aktivitet, tilsynelatende ved hjelp av en mekanisme ved dens evne til å inhibere fremstilling av proinflammatoriske cytokiner ved hjelp av monocytter og/eller aktiverte makrofager eller NK-celler. Denne inhiberingen av cytokinproduksjon inntrer på transkripsjonsnivået.

IL-10 er her også blitt påvist å modulere superantigeninduserte responser, f.eks. T-cellemedierte responser, hos dyr. Stafylokokk-enterotoksin B (SEB) kan indusere en alvorlig toksisk sjokkrespons, og undersøkelser på mus viser virkningsfullhet *in vivo*. Administrering av IL-10 samtidig med, eller til og med etter, eksponering mot superantigen er effektivt for å forhindre dødelighet av sterk SEB-eksponering.

Det gramnegative lipopolysakkarid (LPS) induserer en septisk sjokkrespons hos pattedyr. Denne endotoksininduserte sjokkrespons skriver seg fra frigivelse av TNFα, IL-1 og/eller IL-6 fra stimulerte makrofager/monocytter, som beskrevet ovenfor. Administrering av IL-10 undertrykker imidlertid indusert ekspresjon av IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8 og GM-CSF. Det er fremlagt data som fastslår at IL-10 er i stand til å beskytte mus mot endotoksinindusert sjokk selv om det administreres etter LPS-presentasjon. Omvendt kan anti-IL-10-antistoffer blokkere den beskyttende effekt. Videre undersøkelser indikerer at anti-IL-10-behandlede mus også oppviser vesentlig forhøyede nivåer av tumornekrosefaktor alfa (TNFα) i blodomløpet og IL-6 i blodomløpet, og svært stor ømfintlighet overfor endotoksinindusert sjokk (f.eks. LPS-indusert).

Anti-IL-10-antistoffer har også anvendbarhet ved behandling av andre immunologiske tilstander. Det er presentert data som indikerer at langvarig anti-IL-10-antistoffadministrering til en ung mus kan bruke opp Ly-1-underklassen av B-celler. Dette impliserer IL-10 som en regulator for Ly-1-B-

celleutvikling og tilveiebringer et middel for å bruke opp Ly-1-B-celler. Denne observasjonen førte til innsikt i behandling av autoimmuntilstander.

Utviklingen av en autoimmunrespons krever en kompleks T-celleinteraksjon. NZB/W-stammen av mus er disponert for lupus (systemisk lupus erytematose, SLE) og tilveiebringer en modell for testing av terapeutiske reagenser for behandling av autoimmuntilstander. Disse musene oppviser dessuten en uvanlig andel av Ly-1-B-celler sammenlignet med andre B-celletyper. Det er beskrevet museforsøk in vivo hvor NZB/W-stammen anvendes.

Anti-IL-10-behandling av disse musene forsinket i vesentlig grad inntreden av autoimmunresponsen slik den ble overvåket ved hjelp av total overlevelse, eller ved utvikling av proteineni, nyrenefritt eller autoantistofftitere. Dette resultatet indikerer at anti-IL-10-behandling ville være nyttig ved behandling av andre pattedyr, f.eks. mennesker.

Mange forskjellige enkeltcelle- og flercelleekspresjonssystemer (dvs. kombinasjoner av vert og ekspresjonsvektor) kan anvendes for å fremstille polypeptidene for anvendelse ved foreliggende oppfinnelse. Vertscelletyper omfatter, men er ikke begrenset til, bakterie-, gjær-, insekt-, pattedyrceller og lignende. Det er tilgjengelig mange oversikter som gir rettledning for å gjøre valg av og/eller modifikasjoner i bestemte ekspresjonssystemer. Se f.eks. de Boer og Shepard "Strategies for Optimizing Foreign Gene Expression in *Escherichia coli*", s. 205-247, i Kroon (red.) Genes: Structure and Expression (John Wiley & Sons, New York, 1983), som omtaler flere *E. coli*-ekspresjonssystemer; Kucherlapati et al., Critical Reviews in Biochemistry, vol. 16, 4. utg., s. 349-379 (1984), og Banerji et al., Genetic Engineering, vol. 5, s. 19-31 (1983), som omtaler fremgangsmåter for transfeksjon og transformering av pattedyrceller; Reznikoff og Gold, red., Maximizing Gene Expression (Butterworths, Boston, 1986) som omtaler utvalgte emner innen genekspresjon i *E. coli*, gjær og pattedyrceller; og Thilly, Mammalian Cell Technology (Butterworths, Boston, 1986) som omtaler pattedyrekspresjonssystemer. Likeledes er det

tilgjengelig mange oversikter som beskriver teknikker og betingelser for binding/eller manipulering av bestemte cDNA-er og ekspresjonskontrollsekvenser for å danne og/eller modifisere ekspresjonsvektorer egnet for anvendelse i forbindelse med foreliggende oppfinnelse, f.eks. Maniatis et al. (1982), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2. utg.; vol. 1-3), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York; og Ausubel et al. (1987 og supplementer) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley and Sons, New York.

Et *E. coli*-ekspresjonssystem er beskrevet av Riggs i US patentskrift nr. 4 431 739. En særlig anvendbar prokaryot promoter for høyekspresjon i *E. coli* er tac-promoteren beskrevet av de Boer i US patentskrift nr. 4 551 433. Sekresjons-ekspresjonsvektorer er også tilgjengelige for *E. coli*-verter. Særlig anvendbare er pIN-III-ompA-vektorene, beskrevet av Ghrayeb et al., i EMBO J., vol. 3, s. 2437-2442 (1984), hvor cDNA-en som skal transkriberes, er fusjonert til den delen av *E. coli*-OmpA-genet som koder for signalpeptidet til ompA-proteinet, som igjen får det fullt ferdige protein til å bli utskilt i det periplasmatiske rom i bakterien. I US patentskrifter nr. 4 336 336 og 4 338 397 beskrives også sekresjons-ekspresjonsvektorer for prokaryoter.

Et stort antall stammer av bakterier er egnede verter for prokaryote ekspresjonsvektorer, inkludert stammer av *E. coli*, slik som W3110 (ATCC nr. 27325), JA221, C600, ED767, DH1, LE392, HB101, X1776 (ATCC nr. 31244), X2282, RR1 (ATCC nr. 31343) MRCI; stammer av *Bacillus subtilis*, og andre enterobacteriaceaer slik som *Salmonella typhimurium* eller *Serratia marcescens*, og forskjellige arter av *Pseudomonas*. Generelle fremgangsmåter for å fremskaffe bakteriestammer, slik som *E. coli* K12 X1776, som kan anvendes i ekspresjonen av eukaryote proteiner, er beskrevet av Curtis III i US patentskrift nr. 4 190 495.

I tillegg til prokaryote og eukaryote mikroorganismer kan det også anvendes ekspresjonssystemer som omfatter celler avledet fra flercellede organismer for å fremstille proteiner.

Av særlig interesse er pattedyrekspresjonssystemer ettersom deres posttranslasjonelle prosesseringsmaskineri mer sannsynlig vil produsere biologisk aktive pattedyrproteiner. Det er blitt brukt flere DNA-tumorvirus som vektorer for pattedyrverter. Særlig viktig er det store antall vektorer som omfatter SV40-replikasjon, transkripsjon og/eller translasjonskontroll-sekvenser koblet til bakteriereplikasjonskontrollsekvenser, f.eks. pcD-vektorene utviklet av Okayama og Berg, beskrevet i Mol. Cell. Biol., vol. 2, s. 161-170 (1982) og Mol. Cell. Biol., vol. 3, s. 280-289 (1983) og forbedret av Takebe et al., Mol. Cell. Biol., vol. 8, s. 466-472 (1988). Andre SV40-baserte pattedyrekspresjonsvektorer omfatter de som er beskrevet av Kaufman og Sharp, i Mol. Cell. Biol., vol. 2, s. 1304-1319 (1982), og Clark et al., i US patentskrift nr. 4 675 285. Apeceller er vanligvis de foretrukne verter for de ovenfor nevnte vektorer. Slike vektorer som inneholder SV40-ori-sekvensene og et intakt A-gen, kan replikere autonomt i apeceller (hvorved man får høyere kopiantall og/eller mer stabile kopiantall enn ved ikke-autonomt replikerende plasmider). Vektorer som inneholder SV40-ori-sekvensene uten et intakt A-gen, kan dessuten replikere autonomt til høye kopiantall, (men ikke stabilt) i COS7-apeceller, beskrevet av Gluzman, Cell, vol. 23, s. 175-182 (1981) og tilgjengelige fra ATCC (deponeringsnr. CRL 1651). De ovenfor nevnte SV40-baserte vektorer er også i stand til å transformere andre pattedyrceller, slik som museceller, ved integrering i vertscelle-DNA.

Flercellede organismer kan også tjene som verter for fremstillingen av polypeptidene ifølge oppfinnelsen, f.eks. insektlarver, Maeda et al., Nature, vol. 315, s. 592-594 (1985) og Ann. Rev. Entomol., s. 351-372 (1989); og transgene dyr, Jaenisch, Science, vol. 240, s. 1468-1474 (1988).

I. <u>Analyser med hensyn på interleukin-10 og analoger</u>

IL-10-beslektede proteiner og peptider, samlet henvist til som IL-10-er, oppviser flere biologiske aktiviteter som ville kunne danne grunnlag for analyser og enheter. IL-10-er har særlig egenskapen med å inhibere syntesen av minst ett cytokin i gruppen bestående av IFNγ, lymfotoksin, IL-2, IL-3 og GM-CSF i en populasjon av T-hjelperceller indusert til å

syntetisere ett eller flere av disse cytokinene ved eksponering mot syngene, antigenpresenterende celler (APC-er) og antigen. Ved denne aktiviteten behandles APC-ene slik at de er ute av stand til replikasjon, men at deres antigenprosesseringsmaskineri forblir funksjonelt. Dette utføres passende ved å bestråle APC-ene, f.eks. med ca. 1500-3000 R (gamma- eller røntgenstråling) før blanding med T-cellene. Se også tabell 2 for analysen med hensyn på muse-IL-10.

TABELL 2

IL-10- (CSIF) analyse - modifisert til proliferasjonsanalyse

Antigenpresenterende celler (APC)

1) Ta BALB/c-milter (omtrent 10^8 celler/milt) i rør med cRPMI.
2) Lag en enkeltcellesuspensjon under anvendelse av et filter og sylinder i 10 ml sprøyte (under anvendelse av sterilteknikk under avtrekk), sentrifuger ved 1200 rpm.
3) Oppslem pellet på nytt i 5 ml kaldt NH_4Cl (0,83% i H_2O). Sentrifuger på nytt ved 1200 rpm.
4) Oppslem pellet på nytt i 5 ml cRPMI (ikke noe IL-2 for analyse) og sentrifuger for å vaske.
5) Oppslem på nytt i 5 ml cRPMI og tell.
6) Bestrål med 3000 rad (for tiden 20 minutter).
7) Reguler cellekonsentrasjon til 8 x 10^6/ml (vil måtte tilsettes 50 ml pr. brønn i analyse for å få sluttkonsentrasjon på 4 x 10^5/brønn).
(Titrer IL-10 i enten 100 ml sluttvolum i mikrotiterplate eller 50 ml sluttvolum dersom det ønskes å tilsette anti-IL-10-antistoff).

Th1-celler

1) Tre dager før analyse tines en ampulle med HDK1-celler direkte i 2 x 25 ml cRPMI inneholdende IL-2.
2) Sjekk celler dagen etter og om nødvendig splitt 1 i 2 eller 1 i 3.
3) På analysedagen sentrifuger cellene ved 1200 rpm umiddelbart før utplating og oppslem på nytt i 5 ml cRPMI og tell (fortynn 1 til 2 i trypanblått).
4) Reguler konsentrasjonen på nytt til 2 x 10^5 pr. ml og

tilsett 50 ml pr. brønn (sluttkonsentrasjon 10^4 celler pr. brønn). Før utplating, tilsett KLH inntil konsentrasjon på 400 mg/ml. (Dette vil gi sluttkonsentrasjon på 100 mg/ml).

Kontroller

50 ml Th1-celler, ikke noe KLH.
50 ml Th1-celler + KLH.
50 ml milt-APC.
pluss og minus IL-10 (høyeste konsentrasjon er sannsynligvis best).
bringes til sluttvolum på 200 ml.

Analyserekkefølge

1) Fremstilling av APC.
2) Utplating av IL-10.
3) Fremstilling av Th1-celler og utplating.
4) Utplating av APC.

Etter 48 timer fjernes 100 ml sup. for IFNg-ELISA; tilsett så ^{3}H-tymidin (1 mCi pr. brønn) og innhøst neste morgen.

Cytokininhibering kan alternativt analyseres i primære eller fortrinnsvis sekundære, blandede lymfocyttreaksjonsblandinger (MLR), i hvilket tilfelle det ikke er nødvendig å bruke syngene APC-er. MLR-er er velkjente innen teknikken, se f.eks. Bradley, s. 162-166, i Mishell et al., red., Selected Methods in Cellular Immunology (Freeman, San Francisco, 1980); og Battisto et al., Meth. in Enzymol., vol. 150, s. 83-91 (1987). I korte trekk blandes to populasjoner av allogene lymfoidceller, idet én av populasjonene er blitt behandlet før blanding for å forhindre proliferasjon, f.eks. ved bestråling. Cellepopulasjonene prepareres fortrinnsvis ved en konsentrasjon på ca. 2 x 10^6 celler/ml i supplert medium, f.eks. RPMI 1640 med 10% kalvefosterserum. For begge kontrollene og testkulturene blandes 0,5 ml av hver populasjon for analyse. For en sekundær MLR stimuleres cellene som er tilbake etter 7 dager i den primære MLR, på nytt ved hjelp av nyfremstilte, bestrålte stimulatorceller. Prøven som mistenkes for å

inneholde IL-10, kan tilsettes til testkulturene på blandetidspunktet, og begge kontrollene og testkulturene kan analyseres med hensyn på cytokinproduksjon fra 1 til 3 dager etter blanding.

Ved erholdelse av T-cellepopulasjoner og/eller APC-populasjoner for IL-10-analyser anvendes teknikker som er velkjente innen faget, og som er fullstendig beskrevet, f.eks. i DiSabato et al., red., Meth. in Enzymol., vol. 108 (1984). APC-er for den foretrukne IL-10-analyse er monocytter fra perifert blod eller vevsmakrofager. Disse fås ved å bruke standardteknikker, f.eks. som beskrevet av Boyum, Meth. in Enzymol., vol. 108, s. 88-102 (1984); Mage, Meth. in Enzymol., vol. 108, s. 118-132 (1984); Litvin et al., Meth. in Enzymol., vol. 108, s. 298-302 (1984); Stevenson, Meth. in Enzymol., vol. 108, s. 242-249 (1989); og Romain et al., Meth. in Enzymol., vol. 108, s. 148-153 (1984). Fortrinnsvis anvendes det i IL-10-analysene hjelper-T-celler som er erholdt ved først å skille lymfocyttene fra det perifere blod, milten eller lymfeknutene, så utvelge f.eks. ved hjelp av utvasking eller strømningscytometri, hjelperceller under anvendelse av et kommersielt tilgjengelig anti-CD4-antistoff, f.eks. OKT4 beskrevet i US patentskrift nr. 4 381 295 og tilgjengelig fra Ortho Pharmaceutical Corp. Muse-anti-CD4 er tilgjengelig fra Becton-Dickinson eller Pharmingen. De nødvendige teknikker er fullstendig beskrevet i Boyum, Scand. J. Clin. Lab. Invest., vol. 21 (suppl. 97), s. 77 (1968); Meth. in Enzymol., vol. 108 (se ovenfor), og i Bram et al., Meth. in Enzymol., vol. 121, s. 737-748 (1986). Generelt fås PBL-er fra nylig uttatt blod ved hjelp av Ficoll-Hypaque-densitetsgradientsentrifugering.

Mange forskjellige antigener kan anvendes i analysen, f.eks. hemocyanin fra nøkkelhullalbuskjell (KLH), fugle-γ-globulin eller lignende. I stedet for antigen er det mer foretrukket å stimulere hjelper-T-celler med anti-CD3-monoklonalt antistoff, f.eks. OKT3 beskrevet i US patentskrift nr. 4 361 549, i analysen.

Cytokinkonsentrasjoner i kontroll- og testprøver måles ved hjelp av standard biologiske og/eller immunokjemiske analyser. Konstruksjon av immunokjemiske analyser for bestemte cytokiner er velkjent innen teknikken når det rensede cytokin

er tilgjengelig. Se f.eks. Campbell, Monoclonal Antibody Technology (Elsevier, Amsterdam, 1984); Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays (Elsevier, Amsterdam, 1985); og US patentskrift nr. 4 486 530, som eksempler på den omfattende litteratur vedrørende dette. ELISA-sett for human-IL-2, human-IL-3 og human-GM-CSF er kommersielt tilgjengelige fra Genzyme Corp. (Boston, MA), og et ELISA-sett for human IFNγ er kommersielt tilgjengelig fra Endogen, Inc. (Boston, MA). Polyklonale antistoffer som er spesifikke for humanlymfotoksin, er tilgjengelige fra Genzyme Corp. og kan anvendes i en radioimmunologisk analyse med hensyn på humanlymfotoksin, se f.eks. Chard, An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques (Elsevier, Amsterdam, 1982).

Biologiske analyser av cytokinene angitt ovenfor, kan også brukes til å bestemme IL-10-aktivitet. En biologisk analyse med hensyn på humanlymfotoksin er beskrevet i Aggarwal, Meth. in Enzymol., vol. 116, s. 441-447 (1985), og Matthews et al., s. 221-225, i Clemens et al., red., Lymphokines and Interferons: A Practical Approach (IRL Press, Washington, D.C., 1987). Human-IL-2 og GM-CSF kan analyseres med de faktoravhengige cellelinjene CTLL-2 og KB-1 som er tilgjengelige fra ATCC under deponeringsnumrene henholdsvis TIB 214 og CCL 246. Human-IL-3 kan analyseres ved hjelp av evnen til å stimulere dannelsen av et bredt spekter av hematopoesecellekolonier i mykagarkulturer, f.eks. som beskrevet av Metcalf, The Hemopoietic Colony Stimulating Factors (Elsevier, Amsterdam, 1984). IFN-γ kan kvantifiseres med antivirusanalyser, f.eks. Meager, s. 129-147, i Clemens et al., red. (se ovenfor). Museekvivalenter kan likeledes analyseres med passende cellelinjer.

Cytokinproduksjon kan også bestemmes ved hjelp av mRNA-analyse. Cytokin-mRNA-er kan måles ved cytoplasmisk flekkhybridisering som beskrevet av White et al., J. Biol. Chem., vol. 257, s. 8569-8572 (1982) og Gillespie et al., US patentskrift nr. 4 483 920. Andre fremgangsmåter omfatter flekkblotting under anvendelse av renset RNA, se f.eks. kapittel 6 i Hames et al., red., Nucleic Acid Hybridization A Practical Approach (IRL Press, Washington, D.C., 1985). Teknikker med polymerasekjedereaksjon (PCR) kan også anvendes, se Innis

et al., (red.) (1990), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc., New York.

I noen tilfeller vil prøver som skal testes med hensyn på IL-10-aktivitet, bli forbehandlet for å fjerne forutbestemte cytokiner som vil kunne virke inn på analysen. For eksempel øker IL-2 produksjonen av IFNγ i noen celler. Avhengig av hjelper-T-cellene som anvendes i analysen, kan det således hende av IL-2 må fjernes fra prøven som testes. Slike fjerninger utføres passende ved å sende prøven over en standard anti-cytokin-affinitetskolonne.

For lettvinthets skyld defineres enheter av IL-10-aktivitet ved IL-10's evne til å øke den IL-4-induserte proliferasjon av MC/9-celler som er beskrevet i US patentskrift nr. 4 559 310, og som er tilgjengelige fra ATCC under deponeringsnr. CRL 8306. Én enhet/ml er definert som den konsentrasjon av IL-10 som gir 50% av maksimal stimulering av MC/9-proliferasjon over nivået til IL-4 i den følgende analyse. Fortynninger in duplo eller in triplo av IL-4 og IL-10 fremstilles i 50 µl medium pr. brønn i en standard mikrotiterplate. Medium består av RPMI 1640, 10% kalvefosterserum, 50 µM 2-merkaptoetanol, 2 mM glutamin, penicillin (100 U/l) og streptomycin (100 mg/ml). Tilsett IL-4, 25 µl/brønn med 1600 U/ml (til sist 400 U/ml) fortynnet i medium og inkuber over natten, f.eks. 20-24 timer. ^{3}H-tymidin (f.eks. 50 mCi/ml i medium) tilsettes ved 0,5-1,0 mCi/brønn, og cellene inkuberes igjen over natten, hvoretter celler innhøstes og inkorporert radioaktivitet måles.

For generelle beskrivelser av fremstilling av cytokinene IL-4 og IL-10, se US patentskrift nr. 5 017 691 og US patentsøknad nr. 07/453 951.

II. <u>Agonister og antagonister</u>

IL-10-agonister kan være molekyler som etterligner IL-10-interaksjon med dens reseptorer. Slike kan være analoger til eller fragmenter av IL-10, eller antistoffer mot ligandbindingsseteepitoper i IL-10-reseptorene, eller antiidiotypiske antistoffer mot bestemte antistoffer som bindes til reseptorreagerende deler i IL-10.

Antagonister kan være i form av proteiner som konkur-

rerer om reseptorbinding, f.eks. som mangler evnen til å aktivere reseptoren, men blokkerer IL-10-binding, eller IL-10-bindende molekyler, f.eks. antistoffer.

Antistoffer kan frembringes mot IL-10-cytokinet, fragmentene og analogene, både i deres naturlig forekommende former og i deres rekombinante former. I tillegg kan antistoffer frembringes mot IL-10 enten i dets aktive form eller i dets inaktive former, idet forskjellen er at antistoffer mot det aktive cytokin mer sannsynlig vil gjenkjenne epitoper som er til stede bare i den aktive konformasjon. Antiidiotypiske antistoffer omfattes også av disse metodene og vil kunne være potensielle IL-10-agonister.

Antistoffer, inkludert bindende fragmenter og enkeltkjedeversjoner, mot forutbestemte fragmenter av de ønskede antigener, f.eks. cytokin, kan frembringes ved immunisering av dyr med konjugater av fragmentene med immunogene proteiner. Monoklonale antistoffer fremstilles fra celler som utskiller det ønskede antistoff. Disse antistoffene kan screenes med hensyn på binding til normale eller inaktive analoger, eller screenes på hensyn på agonistisk eller antagonistisk aktivitet. Disse monoklonale antistoffene vil vanligvis bindes med minst en K_D på ca. 1 mM, mer vanlig minst ca. 300 µM, vanligvis minst ca. 10 µM, mer vanlig minst ca. 30 µM, fortrinnsvis minst ca. 10 µM, og mer foretrukket minst ca. 3 µM eller bedre. Selv om det ovenfor nevnte gjelder IL-10, vil lignende antistoffer frembringes mot andre analoger, dets reseptorer og antagonister.

Antistoffene, inkludert antigenbindende fragmenter, ifølge denne oppfinnelsen kan ha betydelig diagnostisk eller terapeutisk verdi. De kan være sterke antagonister som bindes til IL-10-reseptorene og inhiberer ligandbinding til reseptoren eller inhiberer evnen til IL-10 når det gjelder å utløse en biologisk respons.

IL-10 eller fragmenter kan knyttes til andre materialer, særlig polypeptider, som fusjonerte eller kovalent bundne polypeptider som skal anvendes som immunogener. Cytokinet og dets fragmenter kan fusjoneres eller bindes kovalent til mange forskjellige immunogener, slik som hemocyanin fra nøkkelhullalbuskjell, bovint serumalbumin, tetanus toxoid,

etc. Se Microbiology, Hoeber Medical Division, Harper og Row, 1969; Landsteiner (1962), Specificity of Serological Reactions, Dover Publications, New York, og Williams et al. (1967), Methods in Immunology and Immunochemistry, vol. 1, Academic Press, New York, for beskrivelser av fremgangsmåter for fremstilling av polyklonale antisera. En typisk fremgangsmåte omfatter hyperimmunisering av et dyr med et antigen. Blodet fra dyret samles så opp kort tid etter de gjentatte immuniseringene, og gammaglobulinet isoleres.

I noen tilfeller er det ønskelig å fremstille monoklonale antistoffer fra forskjellige pattedyrverter, slik som mus, gnagere, primater, mennesker, etc. Beskrivelse av teknikker fremstilt for fremstilling av slike monoklonale antistoffer, kan finnes f.eks. i Stites et al. (red.) Basic and Clinical Immunology (4. utg.), Lange Medical Publications, Los Altos, CA, og litteraturhenvisninger som der er angitt; Harlow og Lane (1988), Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press; Goding (1986), Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2. utg.), Academic Press, New York; Coligan et al. (red., 1991 og periodiske supplementer) Current Protocols in Immunology, Wiley and Sons, New York; og særlig i Kohler og Milstein (1975) i Nature, 256, s. 495-497, som omtaler én fremgangsmåte for frembringelse av monoklonale antistoffer. Kort oppsummert omfatter denne fremgangsmåten å injisere et dyr med et immunogen. Dyret avlives så, og fra milten tas celler som så fusjoneres med myelomceller. Resultatet er en hybridcelle eller et "hybridom" som er i stand til å reprodusere *in vitro* under selektive betingelser, i motsetning til myelomopphavscellene. Populasjonen av hybridomer screenes så for å isolere individuelle kloner som hver utskiller en enkelt antistoffart mot immunogenet. På denne måte er de enkelte antistoffartene som oppnås, produktene av udødeliggjorte og klonede enkelt-B-celler fra det immune dyr frembrakt som respons på et bestemt sete gjenkjent på det immunogene stoff.

Andre egnede teknikker omfatter *in vitro* eksponering av lymfocytter mot de antigene polypeptidene eller alternativt utvelgelse av biblioteker av antistoffer i fag eller lignende vektorer. Se Huse et al. (1989), "Generation of a Large Com-

binatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda", Science, 246, s. 1275-1281; og Ward et al. (1989), Nature, 341, s. 544-546. Polypeptidene og antistoffene kan anvendes med eller uten modifikasjon, inkludert kimære eller humaniserte antistoffer. Rekombinante immunglobuliner kan også fremstilles, se Cabilly, US patentskrift nr. 4 816 567.

Antistoffer frembrakt mot cytokinet eller dets reseptor, vil også kunne anvendes til å frembringe antiidiotypiske antistoffer som kan oppvise agonist- eller antagonistegenskaper. Disse vil være anvendbare ved modulering av forskjellige immunologiske responser, som her omtalt.

III. Rensing og farmasøytiske preparater

Når polypeptider som skal anvendes ifølge foreliggende oppfinnelse uttrykkes i oppløselig form, f.eks. som et utskilt produkt av transformerte gjær- eller pattedyrceller, kan de renses i henhold til standardfremgangsmåter innen teknikken, inkludert trinn med ammoniumsulfatutfelling, ionebytterkromatografi, gelfiltrering, elektroforese, affinitetskromatografi og/eller lignende, se f.eks. "Enzyme Purification and Related Techniques", Methods in Enzymology, 22, s. 233-577 (1977), og Scopes, R., Protein Purification: Principles and Practice (Springer-Verlag, New York, 1982), gir rettledning i slike rensinger. Når polypeptider som skal anvendes ifølge oppfinnelsen uttrykkes i uoppløselig form, f.eks. som aggregater, inklusjonslegemer eller lignende, kan de likeledes renses ved standardfremgangsmåter innen teknikken, inkludert atskillelse av inklusjonslegemene fra oppbrutte vertsceller ved sentrifugering, oppløseliggjøring av inklusjonslegemene med kaotrope og reduserende midler, fortynning av den oppløseliggjorte blanding og senking av konsentrasjonen av kaotropt middel og reduksjonsmiddel slik at polypeptidet inntar en biologisk aktiv konformasjon. De sistnevnte fremgangsmåter er beskrevet i de følgende litteraturhenvisninger: Winkler et al., Biochemistry, 25, s. 4041-4045 (1986); Winkler et al., Biotechnology, 3, s. 992-998 (1985); Koths et al., US patentskrift nr. 4 569 790; og europeiske patentsøknader nr. 86306917.5 og 86306353.3.

Slik det her er brukt, betyr "effektiv mengde" en

mengde som er tilstrekkelig til å lindre eller forhindre en sjokktilstand, bestemt for eksempel ved anerkjente symptomer, slik som forkjølelse, vasokonstriksjon, mental forvirring, hypoperfusjon, hyperpyreksi og lignende. Den effektive mengde for en bestemt pasient kan variere avhengig av slike faktorer som tilstanden og typen av sårbetennelsen som behandles, pasientens totale helsetilstand, administreringsmåten, alvorligheten av bivirkninger og lignende. Generelt administreres et IL-10-reagens som et farmasøytisk preparat som omfatter en effektiv mengde av reagenset og en farmasøytisk bærer. Se f.eks. Kaplan og Pasce (1984), Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation, Mosby and Co., St. Louis, MO; og Gilman et al. (1990), Goodman and Gilmans: The Pharmacological Basis of Therapeutics (8. utg.), Pergamon Press. Ved visse anvendelser kan det terapeutiske IL-10-reagens kombineres med en annen farmasøytisk aktiv bestanddel, inkludert et antibiotisk preparat.

En farmasøytisk bærer kan være et hvilket som helst forenlig, ikke-toksisk stoff egnet for avlevering av preparatene til en pasient. Mange preparater som kan anvendes til parenteral administrering av slike legemidler, er kjent, se f.eks. Remington's Pharmaceutical Science, 15. utg. (Mack Publishing Company, Easton, PA 1980). Alternativt kan preparater innføres i en pasients kropp ved hjelp av et implanterbart eller injiserbart legemiddelavleveringssystem. Se f.eks. Urquhart et al., Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., vol. 24, s. 199-236 (1984); Lewis, red., Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals (Plenum Press, New York, 1981); US patentskrift nr. 3 773 919, US patentskrift nr. 3 270 960.

Når det administreres parenteralt, formuleres IL-10 i en injiserbar enhetsdoseringsform (oppløsning, suspensjon, emulsjon) sammen med en farmasøytisk bærer. Eksempler på slike bærere er normal saltoppløsning, Ringers oppløsning, dekstroseoppløsning og Hanks oppløsning. Ikke-vandige bærere, slik som faste oljer og etyloleat, kan også anvendes. En foretrukket bærer er 5% dekstrose/saltoppløsning. Bæreren kan inneholde mindre mengder additiver, slik som stoffer som øker isotonisitet og kjemisk stabilitet, f.eks. buffere og preserver-

ingsmidler. IL-10-reagenset formuleres fortrinnsvis i renset form som er i det vesentlige fri for aggregater og andre proteiner, ved en konsentrasjon i området ca. 5 til 20 mg/ml. IL-10 administreres fortrinnsvis ved kontinuerlig innsprøyting slik at en mengde i området ca. 50-800 mg gis pr. dag (dvs. ca. 1-16 mg/kg/dag). Den daglige innsprøytingshastighet kan varieres, basert på overvåking av bivirkninger og blodcelletellinger.

Lignende betraktninger gjelder for bestemmelse av en effektiv mengde av en IL-10-agonist eller -antagonist, selv om visse antagonister vil kunne kreve bredere doseringsområder, f.eks. i de høyere områder.

IV. Biologiske observasjoner og mekanismer

Selv om man ikke er bundet av de følgende foreslåtte mekanismer, gir den følgende omtale innsikt i anvendelsene og applikasjonene av IL-10-analoger, -agonister og -antagonister. En nyttig bakgrunn for immunsystemfunksjon, -utvikling og -differensiering er gitt f.eks. i Paul (red.), (1989), Fundamental Immunology (2. utg.), Raven Press, New York. Kapitlene 26 vedrørende inflammasjon, 28 vedrørende hypersensitivitet av forsinket type og 31 vedrørende autoimmunitet, er særlig relevante for anvendelser som her er beskrevet.

Effektene av IL-4 og IL-10 på cytokinsyntese og LAK-aktivitet indusert ved hjelp av IL-2 i human-PBMC og rensede NK-celler, ble undersøkt, f.eks. i studie A. Selv om både IL-4 og IL-10 inhiberer IL-2-indusert IFNγ- og TNFα-syntese i PBMC, inhiberer bare IL-4 IL-2-indusert IFNγ-syntese ved hjelp av rensede NK-celler. IL-4 og IL-10 inhiberer således NK-celle-cytokinsyntese ved hjelp av forskjellige mekanismer.

Resultater av forsøk som undersøkte TNFα-produksjon, tydet på en lignende konklusjon. I dette tilfellet produserer imidlertid monocytter også dette cytokinet. IL-10 hadde ingen direkte effekt på IL-2-indusert TNFα-syntese ved hjelp av NK-celler, men var i stand til å blokkere TNFα-produksjon ved hjelp av monocytter. Stimulering med IL-2 av kulturer som inneholder både NK-celler og CD14+-celler, resulterte i en sterk forøkning av TNFα-produksjon, og IL-10 blokkerte denne økningen fullstendig. Ettersom IL-2 ikke aktiverte CD14+-

celler til å fremstille ytterligere TNFα, utgjør den synergistiske økning sannsynligvis forøkning av NK-celle-TNFα-syntese. Det synes således som om IL-10 inhiberer både TNFα-produksjon ved hjelp av monocytter og også deres kostimulerende effekter på NK-celle-TNFα-syntese.

Selv om både IL-4 og hIL-10/vIL-10 undertrykker IFNγ- og TNFα-syntese ved hjelp av IL-2-stimulert PBMC, inhiberer bare IL-4 IL-2-indusert LAK-aktivitet. Disse observasjonene indikerer at IL-2-indusert cytokinproduksjon og cytotoksisitet i PBMC reguleres via forskjellige veier. Disse funn er av betydning for den kliniske anvendelse av IL-2 og LAK-celler. Problemer forbundet med IL-2-terapi, har omfattet kardiovaskulære effekter og et lekkasjesyndrom i kapillarårer. Årsakene til disse bivirkningene er usikre, men kan omfatte frigjørelse av cytokiner, slik som TNFα, indusert ved hjelp av IL-2 hos kreftpasienter. At IL-10 inhiberer IL-2-indusert cytokinsyntese, men ikke LAK-aktivitet, tyder på at dette cytokinet kan anvendes i kombinasjon med IL-2 for behandling av slike pasienter. På bakgrunn av data som tyder på at TNFα kan indusere ekspresjon av humanimmunsviktvirus i infiserte T-celler, er i tillegg evnen til IL-10 når det gjelder å inhibere syntese av TNFα, av mulig interesse i denne sammenheng.

Disse undersøkelsene viser også at human-IL-10 fremstilles i forholdsvis store mengder av monocytter etter aktivering. Kinetikkundersøkelser viste at lave nivåer av IL-10 kunne påvises 7 timer etter aktivering av monocyttene, og maksimal IL-10-produksjon inntrådte 24-48 timer etter aktivering. Dette var forholdsvis sent sammenlignet med produksjonen av IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8 og TNFα som ble utskilt ved høye nivåer mellom 4 og 8 timer etter aktivering. Det ble også vist at human-IL-10 har sterke inhibitorvirkninger på cytokinproduksjon av monocytter etter aktivering med IFNγ, LPS eller kombinasjoner av IFNγ og LPS. Disse inhibitorvirkningene er spesifikke for IL-10 ettersom de kan nøytraliseres fullstendig ved hjelp av mAb-19F1 som inhiberer både IL-10- og v-IL-10-aktivitet. IL-10 tilsatt ved konsentrasjoner på 100 U/ml, reduserte IL-1α-, TNFα-, GM-CSF- og G-CSF-syntese med mer enn 90% etter optimal aktivering av monocyttene med kombinasjoner av IFNγ (100 U/ml) og LPS (1 µg/ml). Inhibitorvirkningene på IL-

1β-, IL-6- og IL-8-produksjon var noe mindre uttalt, særlig når monocyttene ble aktivert optimalt med kombinasjoner av IFNγ og LPS. Mekanismen hvorved IL-10 inhiberer cytokinproduksjon ved hjelp av monocytter, er ikke klar, f.eks. hvorvidt disse virkningene av IL-10 medieres direkte eller indirekte via andre faktorer. Ettersom IL-1 kan indusere IL-6-produksjon i fibroblaster, tymocytter og monocytter, er det f.eks. mulig at den delvise inhibering av IL-6-produksjon er resultatet av redusert IL-1-produksjon.

Virus-IL-10, som er blitt påvist å ha biologiske virkninger på humanceller, i likhet med human-IL-10, ble testet i mindre utstrekning. v-IL-10 inhiberte imidlertid TNFα- og GM-CSF-produksjon ved hjelp av LPS-aktiverte monocytter i den samme utstrekning som human-IL-10 gjorde. Disse inhibitorvirkningene av v-IL-10 på TNFα- og GM-CSF-produksjon ble nøytralisert ved hjelp av mAb-19F1, noe som illustrerer spesifisiteten av v-IL-10-virkningene.

Inhibering av IL-1α-, IL-1β-, IL-6-, IL-8-, TNFα- GM-CSF- og G-CSF-sekresjon inntrådte på transkripsjonsnivået. IL-10 inhiberte sterkt cytokinspesifikk mRNA-syntese indusert ved hjelp av LPS, bestemt ved hjelp av Northern- og PCR-analyser. PCR-analyser ble utført under betingelser som muliggjorde en sammenligning mellom reaksjonsproduktene av enkeltstående prøver på en halvkvantitativ måte. Dette ble underbygget av det faktum at amplifikasjon av cDNA-er med primere som er spesifikke for β-actin, resulterte i ekvivalente mengder reaksjonsprodukter mellom prøvene, og kvantitativt sammenlignbare resultater ble oppnådd når IL-10-mRNA-ekspresjon ble bestemt i de samme prøvene ved hjelp av både Northern- og PCR-analyse. I tillegg korrelerte cytokin-mRNA-ekspresjonsnivåer med proteinnivåene i supernatantene til disse kulturene. IL-10 påvirket ikke TGFβ-mRNA-ekspresjon i aktiverte monocytter. Det bør imidlertid legges merke til at TGFβ ble uttrykt konstitutivt i ikke-aktiverte monocytter og at aktivering av monocyttene ved hjelp av LPS ikke påvirket TGFβ-mRNA-nivåer. Assoian et al. (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, s. 6020-6024, har demonstrert at monocytter uttrykker TGFβ-mRNA konstitutivt og at TGFβ-sekresjon krever monocyttaktivering. Hvorvidt IL-10 har en virkning på omdannelsen av TGFβ fra en latent til en aktiv

form, er imidlertid uklart.

Fremstillingen av IL-10 ble påvist å inhiberes av IL-4 på transkripsjonsnivået. Selv om inhibitoreffektene av IL-4 på IL-10-produksjon var betydelig, var IL-4 ikke i stand til å blokkere fremstillingen av IL-10 fullstendig. IL-4 inhiberte fremstillingen av IL-10 bare opp til 70%, selv når høye IL-4-konsentrasjoner (400 U/ml), som var tilstrekkelig for fullstendig å inhibere fremstillingen av IL-1, IL-6 og TNFα, ble brukt. Det er også blitt påvist at IL-4 er i stand til å inhibere fremstillingen av IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8 og TNFα ved hjelp av humanmonocytter. Disse funn ble bekreftet og utvidet ved å påvise at IL-4 også inhiberer fremstillingen av IL-8, GM-CSF og G-CSF ved hjelp av LPS-aktiverte humanmonocytter. Denne inhiberingen inntrådte på transkripsjonsnivået. Dataene illustrerer dessuten at IL-4 og IL-10 har lignende virkninger på cytokinekspresjon ved hjelp av humanmonocytter, noe som understreker de pleiotrope effekter av cytokiner og overflødighet i immunsystemet.

Interessant nok er IL-10 et autoregulatorisk cytokin ettersom det sterkt inhiberer IL-10-mRNA-syntese i monocytter aktivert i 24 timer. I tillegg resulterte aktivering av monocytter ved hjelp av LPS i nærvær av nøytraliserende anti-IL-10-mAb-er, i forøkt ekspresjon av IL-10-mRNA etter 24 timer, noe som indikerer at endogent fremstilt IL-10 også inhiberer IL-10-mRNA-syntese. Det faktum at IL-10 er i stand til å nedregulere sin egen produksjon ved hjelp av humanmonocytter, gjør dette til det første cytokin som reguleres ved hjelp av en negativ feedback-mekanisme. Autoregulatoriske effekter av endogent fremstilt IL-10 ble også observert på fremstillingen av IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, TNFα, GM-CSF og G-CSF ved hjelp av LPS-aktiverte monocytter med LPS i nærvær av anti-IL-10-antistoffer. Inhibitoreffektene av endogent IL-10 på fremstillingen av disse cytokinene var imidlertid mindre uttalt enn effektene av eksogent IL-10 tilsatt ved oppstartingen av dyrkingen. Dette er beslektet med det faktum at IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, TNFα og G-CSF allerede fremstilles ved høye nivåer 4-8 timer etter aktivering, mens maksimal endogen IL-10-produksjon inntrer mye senere, 24-48 timer etter aktivering. Denne anmerkningen understøttes av den observasjon at de sterkeste

inhibitoreffekter av endogent produsert IL-10 ble funnet på GM-CSF-sekresjon, som ble påvist å bli fremstilt sent etter aktivering av monocyttene. Idet man antar at IL-10-mRNA-syntese gjenspeiler og går forut for IL-10-proteinsekresjon, og at IL-10 kan reagere bare med sin reseptor på celleoverflaten, tyder disse resultatene på at inhibitoreffektene av endogent fremstilt IL-10 inntrer forholdsvis sent og derfor kan være av særlig betydning i de senere faser av en immunrespons.

IL-10 ble først beskrevet hos mus som en cytokinsynteseinhibitorfaktor (CSIF) fremstilt ved hjelp av Th2-celler, som inhiberte cytokinproduksjon (hovedsakelig IFNγ) ved hjelp av Th1-celler. Denne inhibitoreffekten av m-IL-10 på cytokinproduksjon ved hjelp av Th1-celler krever tilstedeværelsen av makrofager, se f.eks. Fiorentino et al. (1991), J. Immunol., 146, s. 3444-3451; Trowbridge et al. (1981), J. Ept'l Med., 154, s. 1517-1524; Lambert et al. (1989), Cell. Immunol. 120, s. 401-418 og Hirsch et al. (1981), J. Ept'l Med., 154, s. 713-725. Her inhiberer IL-10 og v-IL-10 antigenspesifikk T-celleproliferasjon sterkt når monocytter brukes som APC. I tillegg skyldes reduksjon i de antigenspesifikke, proliferative T-celleresponser i stor grad redusert antigenpresenterende kapasitet for monocytter forårsaket av sterkt nedregulerende effekter av IL-10 på klasse II-MHC-antigenekspresjon på disse cellene. Disse data, sammen med det foreliggende funn at IL-10 fremstilles sent ved hjelp av monocytter og har autoregulerende effekter på IL-10-sekresjon ved hjelp av disse cellene, indikerer at IL-10 har sterke nedregulerende effekter på pågående, antigenspesifikke T-celleresponser. IL-10 kan derfor spille en hovedrolle ved demping av antigendrevne, proliferative T-celleresponser. Den alminnelige oppfatning at IL-10 fremstilt ved hjelp av monocytter også kan ha sterk autoregulerende feedback-aktivitet på T-celleaktivering, understøttes av den observasjon at IL-10 fremstilt ved hjelp av monocytter etter aktivering med LPS, er ansvarlig for nedregulering av klasse II-MHC-antigener på disse cellene, ettersom klasse II-MHC-ekspresjon ikke ble redusert og til og med sterkt forøkt når LPS-stimuleringer ble utført i nærvær av det nøytraliserende anti-IL-10-mAb.

De proinflammatoriske cytokiner, IL-1α, IL-1β, IL-6,

IL-8 og TNFα, er involvert i akutte og kroniske betennelsesprosesser, og mange autoimmunsykdommer, inkludert reumatoid artritt. Disse cytokinene modulerer aktiveringen av og virkningen av celler på immunsystemet, men også av endotelceller, keratinocytter og hepatocytter. Det funn at IL-10 har sterke nedregulerende effekter på sekresjonen av disse cytokinene, tyder på at IL-10 er en sterk betennelsesinhibitor. Basert på de hittil beskrevne egenskaper som omfatter inhibering av antigenspesifikk T-celleproliferasjon ved å redusere APC-kapasiteten til monocytter gjennom nedregulering av klasse II-MHC-antigener på disse cellene, og inhibitoreffekter på proinflammatorisk cytokinsekresjon ved hjelp av monocytter, ser det ut til at IL-10 spiller en hovedrolle som en suppressor av immun- og inflammatoriske responser. Denne rollen bekreftes i ytterligere undersøkelser *in vitro* og i modeller *in vivo* av både endotoksin- og enterotoksinsuperantigenresponser.

De foreliggende undersøkelser viser at IL-10 har en inhibitoreffekt på LPS-indusert cytokinproduksjon ved hjelp av makrofagcellelinjer og peritoneale makrofager. IL-10 har således ikke bare en viktig rolle i reguleringen av T-celleresponser, men også på inflammatoriske responser utløst under infeksjon eller skade.

Effekten av IL-10 på makrofagcellelinjene er mer uttalt enn den som utløses av lignende mengder IL-4, som tidligere er blitt påvist å inhibere cytokinproduksjon ved hjelp av både murin- og humanmakrofager og -monocytter. Disse resultatene viser en betydelig inhibering av LPS-indusert TNFα-proteinproduksjon ved hjelp av IL-4, men en mindre markert inhibering av IL-6-syntese, i disse cellelinjene. Inhibering av TNFα med IL-4 er imidlertid ikke like stor som den som tidligere er blitt rapportert for humanmonocytter. Denne forskjell kan forklares med forskjellen i arter, bruken av differensierte makrofagcellelinjer i stedet for monocytter, eller fordi det ved disse undersøkelsene ble brukt 10 µg/ml LPS i motsetning til 100 ng/ml dose brukt i ett av humanmonocyttsystemene. I motsetning til IL-4 inhiberer IL-10 IL-6-, TNFα- og IL-1-proteinproduksjon betydelig ved denne høye konsentrasjon av LPS. Stimulering av makrofagcellelinjene med LPS og IFNγ

induserte et mye høyere nivå av TNFα og IL-6, og i noen tilfeller virket dette ikke på IL-4-virkning, noe som tyder på at IL-4 og IFNγ kan ha motsatte og motvirkende effekter på visse aspekter av makrofagaktivering. Dette er igjen i motsetning til undersøkelsene på humanmonocytter som ble utført med mindre mengder LPS. Igjen var den IL-10-medierte inhibering av IFNγ pluss LPS-indusert produksjon av IL-6- og TNFα-protein mer betydelig enn det som ses med IL-4. Inhibering av LPS eller IFNγ pluss LPS-indusert ekspresjon av RNA som koder for IL-6 og TNFα, ble også observert under anvendelse av en halvkvantitativ PCR-amplifikasjonsmetode for reverstranskribert RNA. I noen tilfeller inhiberte IL-4 ekspresjon i en lignende utstrekning som IL-10, noe som tyder på at IL-10 også har en effekt på sekresjon av eller stabilitet til de translaterte proteiner. IL-10 oppnår imidlertid sine virkninger, og det ville synes som om dets endelige inhibitoreffekt på cytokinproduksjon ved hjelp av makrofager er sterkere enn det som ses med IL-4. Virkningene av IL-10 på monokinproduksjon tyder på at denne sterke inhibitor kan ha potensial som et antiinflammatorisk middel, muligens på mange forskjellige kliniske manifestasjoner.

Ettersom det også er blitt påvist at bukhinnemakrofager ble inhibert med IL-10 fra stimulerende T-celler, ble det testet hvorvidt IL-10 inhiberte cytokinsekresjon ved hjelp av denne rensede cellepopulasjon. FACS-rensede bukhinnemakrofager erholdt fra BALB/c- eller CBA/J-mus, stimulert med LPS, ga betydelige nivåer av IL-6-protein som bare ble svakt redusert i nærvær av IL-10. Ettersom preliminære PCR-data tydet på at rensede makrofager produserte IL-10, ble det tatt med et antistoff rettet mot IL-10 i noen av LPS-stimuleringene. Tilsetning av dette antistoffet til LPS-stimuleringer i begge musestammene forhøyet produksjonen av IL-6-protein til et mye høyere nivå (30-35 ng/ml pr. 7 x 10^5 celler/ml i løpet av 20 timer). Dette er i overensstemmelse med cytokinproduksjon ved hjelp av makrofager som er under stram autokrin kontroll, eller at mer enn én populasjon av makrofager finnes i Mac-$1^{+,lyse}$ makrofager fra bukhinne, hvorav én har kontroll over den andre ved sin produksjon av IL-10. Data erholdt parallelt i humanmonocyttsystemet, viser også at IL-10 inhiberer LPS-

indusert cytokinproduksjon, inkludert produksjonen av IL-10 selv, ved hjelp av humanmonocytter renset ved oppslemming. I overensstemmelse med tidligere rapporter beviser kontrast-effekter av T-hjelpercelleavledede cytokiner, slik som IL-4 og IL-10, med Th1-T-hjelpercellecytokiner, slik som IFNγ, ytterligere at disse cytokinene kan ha motvirkende effekter på hverandre. IFNγ økte nivået av IL-6 produsert som respons på LPS, til nesten et like høyt nivå som det som ble oppnådd med anti-IL-10, ved tilsynelatende å inhibere produksjonen av IL-10 med de samme makrofager. Disse data tyder på at fremstilling av cytokiner, slik som IL-6 og TNFα, reguleres med IL-10, som igjen er under kontroll av IFNγ fremstilt ved hjelp av aktiverte T-celler og NK-celler. Denne virkning av IFNγ kan forklare de tidligere observasjoner som viser at inkubasjon av bukhinnemakrofager med IFNγ i 24 timer forbedret deres kapasitet når det gjelder å stimulere Th1-celler.

Mekanismen hvorved IL-10 inhiberer makrofagen fra å stimulere celler fra syntetiserende cytokiner, er fortsatt uløst. På bakgrunn av den betydelige reduksjon i cytokinsyntese observert når makrofager stimuleres i nærvær av IL-10, kan IL-10 nedregulere en kostimulerende aktivitet som trengs for optimal cytokinsekresjon som respons på makrofager og antigen. Ved å bruke supernatanter erholdt fra stimulerte 1G18.LA-makrofagceller, var det ikke mulig å overvinne inhibitoreffekten av IL-10 på makrofag- og antigenavhengig stimulering av Th1-celler. Dette er i overensstemmelse med en mekanisme hvori IL-10 ikke medierer sine virkninger på cytokinsyntese ved nedregulering av en oppløselig kostimulator. Det er mulig, selv om det er usannsynlig, at IL-10 snarere virker inn på virkningen enn på produksjonen av en slik faktor, eller at en slik kostimulator er svært labil eller absorberes, og således ikke er til stede i disse supernatantpreparatene. Alternativt kan IL-10 inhibere ekspresjonen av en membranbundet kostimulator, noe som også ville forklare tidligere rapporter som antyder at stimulering av celler krever en APC/-tilleggscelle som ikke kan erstattes av en oppløselig kostimulator. En alternativ forklaring på mekanismen til IL-10-inhibering av cytokinsyntese kunne være at IL-10 induserer produksjon av én eller flere inhibitorfaktorer ved hjelp av

makrofagen, som så virker på T-cellen slik at cytokinsekresjon inhiberes. Blanding av makrofag og B-celle-APC i et antigen-spesifikt system for stimulering av Th1-celler fører til en additiv stimulering av T-cellen sammenlignet med stimulering med hver individuell APC. Tilstedeværelsen av IL-10 inhiberer cytokinsyntese i cellen til det nivå som B-celle-APC oppnår av seg selv. Dette tyder på at makrofagen ikke induserer produksjonen av en inhibitor som virker direkte på T-cellen, eller B-celle-APC. Selv om det er usannsynlig, er det mulig at en slik inhibitor enten kan være spesifikk for makrofag-T-celle-interaksjoner, eller at B-celle-APC på en eller annen måte overvinner eller unngår effekten av en slik aktivitet. Data oppnådd i humansystemet, tyder på at IL-10 ikke oppnår sin inhibering av T-hjelpercelleproliferasjon via en oppløselig inhibitor- eller kostimulerende faktor fremstilt ved hjelp av monocytten. Deres effekter kan imidlertid forklares ved hjelp av nedreguleringen av MHC-klasse II-antigener med IL-10 på humanmonocytter som hittil ikke er blitt observert i musesystemet.

I tillegg til regulering av effektorfunksjon vil IL-10 også kunne spille en rolle i initieringen av en immunrespons mot antistoffproduksjon eller hypersensitivitet av forsinket type (DTH), ved aktivering av forskjellige undersett av CD4-T-hjelperceller som produserer forskjellige cytokinmønstre. At både B-celler og makrofager produserer IL-10 og også virker som APC selv om de er følsomme overfor forskjellige cytokinmodulatorer (IFNγ inhiberer mange B-cellefunksjoner; IL-10 inhiberer makrofag-, men ikke B-celle-APC-funksjon), understøtter denne teorien. I tillegg viser disse undersøkelsene at IL-10 har en betydelig inhibitoreffekt på cytokinsyntese med makrofager, samt forårsaker en markert morfologisk endring i bukhinnemakrofager. Til sammen tyder disse observasjonene på en viktig rolle for IL-10, ikke bare i reguleringen av T-celleresponser, men også som en viktig modulator for akutte, inflammatoriske responser utløst av infeksjon eller skade.

I undersøkelse D ble evnen til IL-10 når det gjelder å inhibere superantigenmediert toksisitet *in vivo*, testet. IL-

10 er i stand til å inhibere cytokinproduksjon med T-celler, delvis ved å inhibere makrofagers evne til å aktivere T-celler. Superantigener er blitt definert som molekyler som aktiverer T-celler ved å danne en "bro" mellom Vβ-kjeden i TCR og klasse II-MHC-molekyler som er til stede på APC-er. Disse resultater tyder på at IL-10 ville kunne inhibere cytokinproduksjon med T-celler aktivert ved hjelp av superantigener presentert av makrofager. Denne effekten er blitt observert *in vitro*. Superantigener kan være endogene, f.eks. kodet for av virus, eller eksogene, f.eks. mikrobielle enterotoksiner. De mest undersøkte superantigener av den sistnevnte gruppe omfatter stafylokokkenterotoksiner. Det er nå kjent at toksisiteten som oppvises av disse toksiner, avhenger av deres evne til å aktivere T-celler *in vivo*. Disse observasjoner tyder på at midler som inhiberer T-celleaktivering, vil forhindre toksisiteten som oppvises av superantigenene. Dette er i overensstemmelse med den observasjon at syklosporin forhindrer SEB-mediert toksisitet. Ifølge denne modellen er TNFα hovedmediatoren for toksisitet. Resultatene som her er presentert, indikerer at IL-10 er i stand til å forhindre toksisiteten til SEB, sannsynligvis gjennom evnen til å inhibere TNF-produksjon med T-celler.

Disse observasjonene har interessante implikasjoner for mekanismen til IL-10-virkning *in vivo*. IL-10 er blitt påvist å inhibere makrofagfunksjoner, f.eks. cytokinproduksjon, evne til å aktivere T-celler og indusere Ia-antigenekspresjon i B-celler. Men ettersom toksisiteten til SEB avhenger av ekspresjon av Ia-antigener ved hjelp av APC, var utfallet av disse forsøkene *in vivo* usikre. At IL-10 forhindrer SEB-indusert toksisitet, tyder på at hoved-APC *in vivo* er makrofagen, ikke B-cellen.

Disse resultatene har viktige implikasjoner for den terapeutiske anvendelse av IL-10. Ved siden av matforgiftning forårsaket av stafylokokkenterotoksiner, er flere sykdommer i den senere tid blitt rapportert å være superantigenindusert, f.eks. toksisk sjokksyndrom, Kawasaki-sykdom, sykdommer forårsaket av streptokokktoksiner og autoimmunsykdommer som reumatoid artritt.

IL-10 er svært effektivt når det gjelder å beskytte mus mot dødelig endotoksemi, et funn som tyder på at IL-10 kan være anvendbart ved behandling av bakteriell sårbetennelse. Selv om et stort antall andre reagenser, f.eks. antistoffer mot TNFα eller endotoksin, og IL-1Ra, for tiden er under kliniske forsøk for behandling av bakteriell sårbetennelse, må de fleste av disse gis før sårbetennelsesinduksjon i dyremodellforsøk for å oppnå optimal beskyttelse. Ett unntak fra dette, IL-1Ra, er effektivt når det administreres på tidspunktet for sårbetennelsesinduksjon i dyremodellforsøk, men må administreres i tilstrekkelig store mengder til å blokkere alle endogene IL-1-reseptorer. Farmakologiske doser av IL-10 gir også en rekke effekter på makrofag/monocytt-funksjon som burde bidra til beskyttelse mot dødelig endotoksemi, muligens ved lavere mengder enn reseptormettende mengder.

Mens omtalen ovenfor er rettet mot effektene av IL-10-administrering ved regulering og differensiering av forskjellige aspekter av immunsystemet, oppnås ytterligere innsikt gjennom blokkering av effektene av IL-10-cytokinet under anvendelse av anti-IL-10-antistoffer.

Data som her er presentert, indikerer at kontinuerlig behandling av mus fra fødsel til voksen alder med anti-IL-10-antistoffer reduserer total-Ly-1-B-celleantall og -funksjon drastisk, uten å endre antallet, fenotypen eller immunokompetansen til konvensjonelle B-celler som befinner seg i miltene til disse samme dyrene. Flere observasjoner understøtter den foreslåtte uttømming av Ly-1-B-celler i anti-IL-10-behandlede mus: (a) anti-IL-10-behandlede mus inneholder få eller ingen B-celler i sine peritoneale hulrom, et sted for Ly-1-B-celleanrikning hos normale mus. (Peritonealutvaskede celler fra 8 uker gamle BALB/c-mus i DNAX-dyreanlegget inneholder færre enn 5% konvensjonelle B-celler ved fenotypeanalyse); (b) anti-IL-10-behandlede mus inneholder 0-10% av normale serum-IgM-nivåer, noe som er i overensstemmelse med tidligere rekonstitueringsforsøk som identifiserer Ly-1-B-celler som den største kilde for IgM i blodomløpet; og (c) anti-IL-10-behandlede mus frembringer lite eller ikke noe antistoff som respons på injeksjon med fosforylcholin og α1,3-dekstran, antigener som det finnes spesifikke B-celler for i Ly-1-B-celleundersettet.

Dataene som tyder på en uendret konvensjonell B-celleavdeling i anti-IL-10-behandlede mus, er like overbevisende, med uendrede antall milt-B-celler som oppviser normale celleoverflatemarkørfenotyper, og som gir normal respons på et thymusavhengig antigen og B-cellemitogener. Den selektive uttømming av Ly-1-B-celler hos anti-IL-10-behandlede mus ble funnet å være forbigående ettersom Ly-1-B-celler på nytt kom til syne i de peritoneale hulrom hos disse dyrene flere uker etter at anti-IL-10-behandling ble avbrutt.

Flere mulige mekanismer ble vurdert som forklaring på den selektive uttømming av Ly-1-B-celler hos anti-IL-10-behandlede mus. Dataene presentert, indikerer at dette er i det minste delvis følgen av IFNγ-forhøyelse etter anti-IL-10-behandlet behandling, ettersom samadministrering av nøytraliserende anti-IL-10- og anti-IFNγ-antistoffer i det vesentlige forhindret uttømmingen av peritoneal-B-celler ved disse undersøkelsene. Den implikasjon at IFNγ enten direkte eller indirekte inhiberer Ly-1-B-celleutvikling, minner om tidligere observasjoner om at IFNγ forårsaker svak suppresjon av IL-5-indusert proliferasjon av Ly-1⁺-B-lymfom-BCL1 *in vitro*. Ved utvidelse av disse undersøkelsene ble det observert IFNγ-mediert suppresjon av LPS-indusert proliferasjon av peritonealceller, men ikke miltceller fra normale BALB/c-mus. Hvorvidt forhøyelsen av IFNγ hos anti-IL-10-behandlede mus er hele årsaken til Ly-1-B-celleuttømming, og hvorvidt dette gjenspeiler en direkte virkning av IFNγ i Ly-1-B-celler eller en eller annen IFNγ-mediert indirekte effekt, er ikke fullstendig forstått. Andre endringer i anti-IL-10-behandlede mus bidrar muligens i tillegg til uttømmingen av Ly-1-B-celler. Anti-IL-10-behandling vil sannsynligvis føre til forhøyelse av endogene monokinnivåer. Anti-IL-10-behandlede mus er ca. 50 ganger mer mottakelige for død ved LPS-indusert sjokk, en hendelse som er kjent for å være formidlet av monokiner, og at 5 av 32 individuelle anti-IL-10-behandlede mus inneholder vesentlige nivåer av serum-IL-6, et monokin som generelt ikke finnes i blodomløpet til normale dyr, og som ikke kunne påvises i seraene til noen av 10 kontrollmus fra disse forsøkene. IL-6-transgene mus eller dyr med svært forhøyede serummonokinnivåer

etter administrering *in vivo* av LPS synes imidlertid å ha normale serum-IgM-nivåer, noe som tyder på uendrede antall Ly-1-B-celler. Tidligere funn om at Ly-1-B-celler, men ikke konvensjonelle B-celler, frembringer konstitutivt og induserbart IL-10, førte til en antagelse om at IL-10 virker som en autokrin vekstfaktor. Dette ser nå ut til å være usannsynlig i lys av det vesentlige antall peritoneale Ly-1-B-celler utvunnet fra mus behandlet med både anti-IL-10- og anti-IFNγ-antistoffer.

Den Ly-1-B-celleuttømte mus skapt ved hjelp av kontinuerlig anti-IL-10-behandling, har betydelig likhet med xid-mus med immunsvikt, en mutant stamme avledet fra CBA/CaH-mus som mangler Ly-1-B-celler, og som ikke gir respons på et undersett av thymusuavhengige antigener. Til tross for disse likheter har våre preliminære undersøkelser avslørt at xid-mus produserer IL-10 normalt og inneholder funksjonelle IL-10-reseptorer, noe som skiller xid-mus og anti-IL-10-behandlede mus mekanistisk. Én egenskap som dessuten skilte anti-IL-10-behandlede mus fra xid-mus, er miltcellers evne til å gi respons *in vitro* på anti-IgM-stimulering oppvist ved hjelp av de førstnevnte, men ikke de sistnevnte dyr.

Den fysiologiske rolle til IL-10 ble undersøkt ved å injisere mus fra fødselen av til voksen alder med monoklonale antistoffer som spesifikt nøytraliserer IL-10. Slik behandling fører til et stort antall forskjellige endringer i immunstatusen til disse dyrene. Dyrene er kjennetegnet ved økninger i TNFα, IFNγ og i mange tilfeller IL-6, i blodomløpet. Disse virkningene er i overensstemmelse med de tidligere rapporterte egenskaper til IL-10 *in vitro*, en sterk undertrykker av IFNγ- og monokinproduksjon i celledyrkningsforsøk. Økningen i endogent IFNγ synes å være ansvarlig for flere av de øvrige følgene som skriver seg fra anti-IL-10-behandling. Den fører for eksempel til uttømmingen av Ly-1-B-celler, og dette er igjen ansvarlig for reduksjonen i IgM- og IgA-antistoffer i omløp, og spesifikke antistoffresponser mot fosforylcholin og α1,3-dekstran. De forhøyede IFNγ-nivåer er sannsynligvis også ansvarlige for økningene i IgG_{2a} i blodomløpet ettersom denne isotypen reguleres positivt av IFNγ. De gjenværende endringer i økninger i peritoneal-T-celler, granulocytter og IgG_{2b} i om-

løp forstås ikke mekanistisk, men disse kan være følgene av sekundære cytokinforstyrrelser. Selv om de generelt var friske, ble anti-IL-10-behandlede mus funnet å være svært ømfintlige overfor død på grunn av endotoksinindusert sjokk. Denne dødelige betennelsesreaksjon er en monokinmediert hendelse som kan forhindres ved hjelp av passiv overføring av antistoffer som er spesifikke for enten TNFα, IL-1, IL-6 eller endotoksin. Det er derfor ikke overraskende at anti-IL-10-behandlede mus som oppviser endogen, monokin oppregulering og som mangler B-cellepopulasjonen som mest sannsynlig vil produsere anti-endotoksinantistoffer (dvs. Ly-1-B-celler), er mer ømfintlige overfor denne betennelsesreaksjon. Disse data antyder en klinisk rolle for IL-10 som et antiinflammatorisk reagens. I overensstemmelse med denne oppfatning indikerer forsøk at farmakologiske doser av IL-10 beskytter mus mot død på grunn av endotoksinindusert sjokk.

Selv om den skisserte fenotype av anti-IL-10-behandlede mus er klart i overensstemmelse med de kjente egenskaper av IL-10 *in vitro*, er den ikke desto mindre motstridende med preliminære rapporter om mus som er gjort IL-10-fattige ved hjelp av genmålretting. Disse mutanter har upåvisbare nivåer av IFNγ, TNFα og IL-6 i omløp, normale antall Ly-1-B-celler i bukhulen og, i en første approksimering, normale serum-Ig-nivåer. Forklaringen på denne uoverensstemmelse er ikke klar selv om en lignende uoverensstemmende situasjon foreligger mellom IL-2-utslåtte mus og minst noen rapporter om mus behandlet fra fødselen av og inntil voksen alder med anti-IL-2-reseptorantistoffer. Én forklaring involverer den velkjente overflod som foreligger innenfor cytokinsystemet. Det er mulig at et museembryo under utvikling vil kompensere for tapet av et kritisk cytokingen ved å amplifisere ekspresjon av et gen som koder for et cytokin med nær beslektet funksjon. Ettersom IL-4 har mange egenskaper til felles med IL-10, ville for eksempel dette cytokinet være en utmerket kandidat for å kompensere det totale tap av IL-10, og således kan dets ekspresjon bli oppregulert i IL-10-utslåtte mus. I motsetning til dette ville nøytralisering av endogent IL-10 i antistoffbehandling av mus fra fødselen av representere en "utett" eliminering av

cytokinet i beste fall, og således vil gjenværende spor av endogent IL-10 kunne være tilstrekkelig til å unngå en stor immunsvikt og en regulatoraktivering av en kompenserende cytokinvei. En alternativ forklaring om at antistoffbehandlede mus bygger opp kunstige immunresponser mot de administrerte, xenogene antistoffer og/eller resulterende immunkomplekser, kan ikke elimineres fullstendig. Dette alternativet synes ikke desto mindre usannsynlig ettersom isotypekontrollantistoffer og antistoffer mot andre cytokiner som også ville generere immunkomplekser *in vivo*, ikke gir immunmodulasjonene tilskrevet anti-IL-10-behandlede mus.

Selv om mønsteret for immunmodulering observert hos anti-IL-10-behandlede mus ikke korrelerer fullstendig med noen av de kjente humanimmunsviktsykdommer, foreligger det visse likheter med både Wiskott-Aldrich-pasienter og IgA-mangelsyndrompasienter. Disse humanimmunmanglene er kjennetegnet ved en mangel på henholdsvis IgM og IgA i omløp, reduserte evner til å generere antibakterielle antistoffresponser og ofte en økning i IgG1 i omløp, den viktigste komplementfikserende humanantistoffisotype som sannsynligvis korrelerer med murint IgG2a. Hvorvidt slike pasienter oppviser redusert IL-10-produksjon eller evne til å gi respons, og i så fall, hvorvidt dette igjen bidrar til deres immunsvikt, venter på å bli bekreftet. Den potensielle rolle til IL-10 i IgA-sviktsyndrom er særlig interessant i lys av en nylig undersøkelse som klart impliserer IL-10 som en viktig kofaktor som kreves for at naturlige human-B-celler skal differensiere til IgA-utskillende celler etter aktiveringen med kryssbundne anti-CD40-antistoffer og TGFβ. Den manglende evne hos anti-IL-10-behandlede mus til å generere spesifikke antistoffresponser mot to bakterieantigener understøtter ytterligere det forslag at IL-10 vil være et effektivt adjuvans i anti-bakteriell immunitet, som beskrevet ovenfor.

I tillegg til å gi informasjon om den fysiologiske rolle og det kliniske potensial til IL-10, gir anti-IL-10-behandlede mus en ny mulighet for å evaluere bidraget fra Ly-1-B-celler i immunsystemet. Som angitt ovenfor, bekrefter sekundærkonsekvensene som skriver seg fra Ly-1-B-celleuttøm-

ming hos anti-IL-10-behandlede mus, mange av egenskapene som tidligere er blitt tilskrevet denne mindre B-cellesubpopulasjon. Disse data gir imidlertid i tillegg ny innsikt vedrørende bidraget fra Ly-1-B-celler til immunsystemet. Det er særlig rimelig å konkludere med at Ly-1-B-celler ikke trengs for utvikling av IgG1-, IgG2a-, IgG2b-, IgG3- eller IgE-responser, ettersom serumnivåer av disse isotypene ikke reduseres i Ly-1-B-celleuttømte, anti-IL-10-behandlede mus. Selv om Ly-1-B-celler er vesentlige for evne til å gi respons på noen thymusuavhengige type II-antigener, f.eks. fosforylcholin og α1,3-dekstran, trengs de likeledes tilsynelatende ikke for andre, f.eks. TNP-Ficoll og anti-IgM. De uendrede eller svakt forhøyede nivåer av IgG3, en isotype som er entydig forbundet med den evne hos B-celler til å gi respons på polysakkaridantigener, tyder virkelig på at Ly-1-B-cellefattige mus sannsynligvis er i stand til å gi respons på de fleste thymusuavhengige type II-antigener. Dette aspektet ved anti-IL-10-behandlede mus skiller dem lett fra xid-musen, en spontant oppstående immunsviktmusestamme som også mangler Ly-1-B-celler, men som ikke gir respons på alle thymusuavhengige type II-antigener.

I tillegg til å gi informasjon vedrørende Ly-1-B-cellers bidrag til immunsystemet, gjør anti-IL-10-behandlede mus det mulig for oss å evaluere konsekvensene av TNFα-forhøyelse *in vivo*. Våre data illustrerer klart at antagonisme av IL-10 *in vivo* fører til vesentlig forhøyelse av serum-TNFα-nivåer. Selv om de ugunstige følgene av TNFα-forhøyelse er blitt nærmere vurdert ovenfor (f.eks. septisk sjokk, cerebral malaria, etc.), bør også et stort antall gunstige følger av TNFα-forhøyelse vurderes. Disse omfatter demonstrasjonen i dyremodeller av direkte antitumoreffekter, ekspansjon av granulocytt-monocytt-hematopoeselinjer, radiobeskyttelse og beskyttelse mot noen autoimmun- og smittesykdommer. Disse vurderingene impliserer derfor IL-10-antagonister som kandidater for terapeutisk intervensjon ved behandling av disse typene av sykdommer. I virkeligheten har vi bekreftet dette forslaget i den utstrekning at vi har demonstrert at anti-IL-10-antistoffer kan forsinke utviklingen av autoimmunitet i de lupus-

disponerte NZB/W-mus vesentlig.

Oppsummert vedrører foreliggende oppfinnelse anvendelse av IL-10 eller IL-10-antagonister ved fremstilling av farmasøytiske preparater for å regulere produksjonen av monokiner som er hovedmediatorer for mange sykdomstilstander. IL-10 og dets agonister vil forårsake markert suppresjon av monokiner, slik som TNFα, og på denne måte gi beskyttelse mot uønskede betennelsesreaksjoner, slik som bakteriell sårbetennelse, toksisk sjokk, reumatoid artritt og psoriasis. Likeledes vil IL-10-antagonister øke nivået av monokiner, slik som TNFα, som igjen kan virke som et antitumormiddel, og til å gi radiobeskyttelse og beskyttelse mot visse autoimmun- og smittesykdommer.

Eksempler

De følgende eksempler tjener til å illustrere foreliggende oppfinnelse. Utvelgelse av vektorer og verter samt konsentrasjonen av reagenser, temperaturer og verdiene av andre variable parametere, skal eksemplifisere anvendelsen ifølge foreliggende oppfinnelse.

Eksempel 1

Ekspresjon av human-IL-10 hos en bakteriell vert

Et syntetisk human-IL-10-gen ble satt sammen fra mange forskjellige kjemisk syntetiserte, dobbelttrådede DNA-fragmenter slik at det ble dannet en ekspresjonsvektor betegnet TAC-RBS-hIL-10. Kloning og ekspresjon ble utført i et standard bakteriesystem, for eksempel E. coli K-12 stamme JM101, JM103 eller lignende, beskrevet av Vieira og Messing, i Gene, vol. 19, s. 259-268 (1982). Restriksjonsendonukleasefordøyelser og ligasereaksjoner ble vanligvis utført ved å bruke standardfremgangsmåter, f.eks Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982), Sambrook et al., Molecular Cloning; A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York), og Ausubel et al. (1987 og periodiske supplementer), Current Protocols in Molecular Biology, Wiley and Sons, New York.

Den alkaliske metode ble brukt for plasmidfremstil

linger i liten skala. For fremstillinger i stor skala ble en modifikasjon av den alkaliske metode brukt, hvor et likt volum isopropanol brukes til å utfelle nukleinsyrer fra det klarede lysat. Utfelling med kaldt 2,5 M ammoniumacetat ble brukt til å fjerne RNA før cesiumkloridlikevektsdensitetssentrifugering og påvisning med etidiumbromid.

For filterhybridiseringer ble Whatman 540 filterringer brukt til å løfte kolonier som så ble lysert og fiksert ved på hverandre følgende behandlinger med 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl, 1 M Tris-HCl pH 8,0, 1,5 M NaCl (2 minutter hver), og oppvarming ved 80°C (30 minutter). Hybridiseringer var i 6xSSPE, 20% formamid, 0,1% natriumdodecylsulfat (SDS), 100 µg/ml *E. coli*-tRNA og 100 µg/ml "Coomassie Brilliant Blue G-250" (BioRad) ved 42°C i 6 timer under anvendelse av ^{32}P-merkede (kinasebehandlede), syntetiske DNA-er. (20xSSPE ble fremstilt ved å oppløse 174 g NaCl, 27,6 g $NaH_2PO_4 9H_2O$ og 7,4 g EDTA i 800 ml H_2O). pH-verdien ble regulert til 7,4 med NaOH. Volumet ble regulert til 1 liter og ble sterilisert ved autoklavering). Filtere ble vasket to ganger (15 minutter, romtemperatur) med 1xSSPE, 0,1% SDS. Etter autoradiografi (Fuji RX-film) ble positive kolonier lokalisert ved å stille de gjendyrkede kolonier opp mot de blåfargede kolonier på filtrene. DNA ble sekvensert i henhold til dideoksymetoden, Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci., vol. 74, s. 5463 (1977). Templater for dideoksyreaksjonene var enten enkelttrådede DNA-er fra relevante områder reklonet inn i M13mp-vektorer, f.eks. Messing et al., Nucleic Acids Res., vol. 9, s. 309 (1981), eller dobbelttrådet DNA fremstilt ved hjelp av den minialkaliske metode og denaturert med 0,2 M NaOH (5 minutter, romtemperatur) og utfelt fra 0,2 M NaOH, 1,43 M ammoniumacetat ved tilsetning av 2 volumdeler etanol. DNA ble syntetisert ved hjelp av fosforamidittkjemi under anvendelse av Applied Biosystems 380A-synteseapparater. Syntese, avbeskyttelse, spalting og rensing (7 M urea-PAGE, eluering, DEAE-cellulosekromatografi) ble utført som beskrevet i 380A-syntese-apparathåndboken.

Komplementære tråder av syntetiske DNA-er som skal klones (400 ng hver), ble blandet og fosforylert med polynuk-

leotidkinase i et reaksjonsvolum på 50 ml. Denne DNA ble ligert med 1 mg vektor-DNA, fordøyd med passende restriksjonsenzymer, og ligeringer ble utført i et volum på 50 µl ved romtemperatur i 4-12 timer. Betingelser for fosforylering, restriksjonsenzymfordøyelser, polymerasereaksjoner og ligering er blitt beskrevet (Maniatis et al., sitert ovenfor). Kolonier ble bedømt med hensyn på lacZ+ (når det var ønsket) ved utplating på L-agar supplert med ampicillin, isopropyl-1-tio-beta-D-galaktosid (IPTG) (0,4 mM) og 5-brom-4-klor-3-indolyl-beta-D-galaktopyranosid (X-gal) (40 µg/ml).

TAC-RBS-vektoren ble konstruert ved gjenfylling med DNA-polymerase av det eneste BamHI-sete i det tacP-bærende plasmid pDR540 (Pharmacia). Dette ble så ligert til ufosforylerte, syntetiske oligonukleotider (Pharmacia) som danner et dobbelttrådet fragment som koder for et konsensusribosombindingssete (RBS, GTAAGGAGGTTTAAC). Etter ligering ble blandingen fosforylert og religert med SstI-linkeren ATGAGCTCAT. Dette komplekset ble så spaltet med SstI og EcoRI, og det 173 bp store fragment isolert via polyakrylamidgelelektroforese (PAGE) og klonet inn i EcoRI-SstI-begrenset pUC19 (Pharmacia) (som beskrevet nedenunder). Sekvensen til RBS-ATG-polylinkerområdene i sluttkonstruksjonen (kalt TAC-RBS) er beskrevet i US patentskrift nr. 5 017 691.

Det syntetiske IL-10-gen ble satt sammen i et pUC19-plasmid i åtte trinn. I hvert trinn kunne innføyelser som var frie for delesjoner, og/eller innføyelser påvises etter kloning ved å holde lacZ(a)-genet i pUC19 i ramme med ATG-startkodonet innføyet i trinn 1. Kloner som inneholdt delesjons- og/eller innføyelsesendringer, kunne filtreres ut ved å bedømme med hensyn på blå kolonier på L-ampicillinplater inneholdende X-gal og IPTG. Alternativt kan sekvenser av innføyelser på hvert trinn lett bekreftes ved å bruke en universalsekvenseringsprimer på småskalaplasmid-DNA-preparater.

I trinn 1 ble TAC-RBS-vektoren fordøyd med SstI, behandlet med T4-DNA-polymerase (hvis 3'-eksonukleaseaktivitet fordøyer de 3'-utstikkende tråder i SstI-kuttene slik at det dannes buttendede fragmenter) og etter deaktivering av T4-DNA-polymerase, behandlet med EcoRI slik at det dannes et 173 basepar (bp) stort fragment. Dette fragmentet inneholder

TAC-RBS-området og har en butt ende i ATG-startkodonet og et EcoRI-kutt i den motsatte ende. Til sist ble det 173 bp store TAC-RBS-fragment isolert.

I trinn 2 ble det isolerte TAC-RBS-fragment fra trinn 1 blandet med EcoRI/KpnI-fordøyd plasmid pUC19 og det syntetiske fragment 1A/B som, som vist nedenunder, har en butt ende i sin oppstrøms ende og en tagget ende svarende til et KpnI-kutt i sin nedstrøms ende. Denne KpnI-ende er i umiddelbar nærhet til og nedstrøms for et BstEII-sete. Fragmentene ble ligert, hvorved pUC19 i trinn 2 ble dannet.

I trinn 3 ble syntetisk fragment 2A/B og 3A/B (vist nedenunder) blandet med BstEII/SmaI-fordøyd pUC10 fra trinn 2 (etter amplifikasjon og rensing) og ligert slik at pUC19 i trinn 3 ble dannet. Legg merke til at den nedstrøms ende i fragment 3A/B inneholder ekstra baser som danner SmaI-butt-enden. Disse ekstra basene ble spaltet i trinn 4. Også fragmentene 2A/B og 3A/B har komplementære 9-resters enkelttrådede ender som annealeres etter blanding, slik at det oppstrøms BstEII-kutt i 2A/B og den nedstrøms buttende i 3A/B ligerer til pUC19.

I trinn 4 ble AflII/XbaI-fordøyd pUC19 fra trinn 3 (etter amplifikasjon og rensing) på nytt renset, blandet med syntetisk fragment 4A/B (vist nedenunder) og ligert, hvorved pUC19 i trinn 4 ble dannet.

I trinn 5 ble XbaI/SalI-fordøyd pUC19 fra trinn 4 (etter amplifikasjon og rensing) blandet med syntetisk fragment 5A/B (vist nedenunder) og ligert, hvorved pUC19 i trinn 5 ble dannet. Legg merke til at den SalI-taggete ende i fragment 5A/B fjernes ved fordøyelse med HpaI i trinn 6.

I trinn 6 ble HpaI/PstI-fordøyd pUC19 fra trinn 5 (etter amplifikasjon og rensing) blandet med syntetisk fragment 6A/B (vist nedenunder) og ligert, hvorved pUC19 i trinn 6 ble dannet.

I trinn 7 ble ClaI/SphI-fordøyd pUC19 fra trinn 6 (etter amplifikasjon og rensing) blandet med syntetisk fragment 7A/B (vist nedenunder) og ligert, hvorved pUC19 i trinn 7 ble dannet.

I trinn 8 ble MluI/HindIII-fordøyd pUC19 fra trinn 7 (etter amplifikasjon og rensing) blandet med syntetiske frag-

menter 8A/B og 9A/B og ligert, hvorved sluttkonstruksjonen ble dannet. Sluttkonstruksjonen ble innføyd i *E. coli* K-12-stamme JM101, f.eks. tilgjengelig fra ATCC under deponeringsnr. 33876, ved hjelp av standardteknikker. Etter dyrking ble proteinet ekstrahert fra JM101-cellene, og fortynninger av ekstraktene ble testet med hensyn på biologisk aktivitet. Fragmentsekvensene som det er henvist til, er vist i tabell 1.

TABELL 1

Små bokstaver angir at en base atskiller seg fra basen i den naturlig forekommende sekvens på det samme sted.

AGCCCAGGCC AGGGCACCCA GTCTGAGAAC AGCTGCACCC ACTTC-
TCGGGTCCGG TCCCGTGGGT CAGACTCTTG TCGACGTGGG TGAAG-

CCAGGtAACC ggtac
GGTCCaTTGG c

Fragment 1A/B

GtAACCTGCC TAACATGCTT CGAGATCTCC GAGATGCCTT CAGCA-
GACGG ATTGTACGAA GCTCTAGAGG CTCTACGGAA GTCGT-

GAGTGAAGACTTTCTTT
CTCACTTC

Fragment 2A/B

CAAATGAAGG ATCAGCTGGA CAACTTGTTc TtAAG
TGAAAGAAA GTTTACTTCC TAGTCGACCT GTTGAACAAg AaTTC

Fragment 3A/B

GAGTCCTTGC TGGAGGACTT TAAGGGTTAC CTGGGTTGCC AAGCC-
CTCAGGAACG ACCTCCTGAA ATTCCCAATG GACCCAACGG TTCGG-

TTGTCTGAGA TGATCCAGTT TTAt
AACAGACTCT ACTAGGTCAA AATaGAtC

Fragment 4A/B

CTaGAGGAGG TGATGCCCCA AGCTGAGAAC CAAGACCCAG ACATC-
GAtCTCCTCC ACTACGGGGT TCGACTCTTG GTTCTGGGTC TGTAG-

AAGGCGCATG TtAACg
TTCCGCGTAC AaTTGcagct

Tabell 1 (forts.)

Fragment 5A/B

```
AACTCCCTGG GGGAGAACCT GAAGACCCTC AGGCTGAGGC TACGG-
TTGAGGGACC CCCTCTTGGA CTTCTGGGAG TCCGACTCCG ATGCC-

CGCTGTCATC GATctgca
GCGACAGTAG CTAg
```

Fragment 6A/B

```
CGATTTCTTC CCTGTCAAAA CAAGAGCAAG GCCGTGGAGC AGGTG-
  TAAAGAAG GGACAGTTTT GTTCTCGTTC CGGCACCTCG TCCAC-

AAGAAcGCgT gcatg
TTCTTgCGcA c
```

Fragment 7A/B

```
CGCGTTTAAT AATAAGCTCC AAGACAAAGG CATCTACAAA GCCAT-
    AAATTA TTATTCGAGG TTCTGTTTCC GTAGATGTTT CGGTA-

GAGTGAGTTT GAC
CTCA
```

Fragment 8A/B

```
          ATCTTCATCA ACTACATAGA AGCCTACATG ACAAT-

  CTCAAACTG TAGAAGTAGT TGATGTATCT  TCGGATGTAC TGTTA-

GAAGATACGA AACTGA
CTTCTATGCT TTGACTtcga
```

Fragment 9A/B

Eksempel 2

Ekspresjon av vIL-10 i COS 7-apeceller

Et gen som koder for den åpne leseramme for vIL-10, ble amplifisert ved hjelp av polymerasekjedereaksjon under anvendelse av primere som muliggjorde senere innføyelse av det

amplifiserte fragment i en Eco-RI-fordøyd pcD(SRa)-vektor, beskrevet i Takebe et al. (1988), Mol. Cell. Biol., 8, s. 466-472. Den kodende tråd i det innføyde fragment er vist nedenunder (hvor den åpne leseramme er angitt med store bokstaver).

aattcATGGA GCGAAGGTTA GTGGTCACTC TGCAGTGCCT GGTGCTGCTT
TACCTGGCAC CTGAGTGTGG AGGTACAGAC CAATGTGACA ATTTTCCCCA
GACCTAAGAG ATGCCTTCAG TCGTGTTAAA ACCTTTTTCC AGACAAAGGA
CGAGGTAGAT AACCTTTTGC TCAAGGAGTC TCTGCTAGAG GACTTTAAGG
ATGCCAGGCC CTGTCAGAAA TGATCCAATT CTACCTGGAG GAAGTCATGC
CACAGGCTGA AACCAGGAC CCTGAAGCCA AAGACCATGT CAATTCTTTG
GGTGAAAATC TAAAGACCCT ACGGCTCCGC CTGCGCAGGT GCCACAGGTT
CCTGCCGTGT GAGAACAAGA GTAAAGCTGT GGAACAGATA AAAAATGCCT
TTAACAAGCT GCAGGAAAAA GGAATTTACA AAGCCATGAG TGAATTTGAC
ATTTTTATTA ACTACATAGA AGCATACATG ACAATTAAAG CCAGGTGAg

Kloner som bærer innføyelsen i den korrekte orientering, ble identifisert ved ekspresjon av vIL-10 og/eller det elektroforetiske mønster for restriksjonsfordøyelser. Én slik vektor som bærer vIL-10-genet, ble betegnet pBCRF1(SRa) og ble deponert med ATCC under deponeringsnr. 68193. pBCRF1(SRa) ble amplifisert i *E. coli* MC1061, isolert ved hjelp av standardteknikker og brukt til transfeksjon av COS 7-apeceller på følgende måte: Én dag før transfeksjon ble omtrent 1,5 x 10^6 COS 7-apeceller inokulert på individuelle 100 mm store plater i Dulbeccos modifiserte Eagle-medium (DME) inneholdende 5% kalvefosterserum (FCS) og 2 mM glutamin. For å utføre transfeksjonen ble COS 7-celler fjernet fra platene ved inkubasjon med trypsin, vasket to ganger i serumfritt DME og oppslemmet til 10^7 celler/ml i serumfritt DME. En 0,75 ml stor aliquot ble blandet med 20 µg DNA og overført til en steril 0,4 cm elektroporasjonskyvette. Etter 10 minutter ble cellene pulset ved 200 volt, 960 mF i en "BioRad Gene Pulser"-enhet. Etter ytterligere 10 minutter ble cellene fjernet fra kyvetten og tilsatt til 20 ml DME inneholdende 5% FCS, 2 mM glutamin, penicillin, streptomycin og gentamycin. Blandingen ble aliquotert til fire 100 mm vevskulturplater. Etter 12-24 timer ved 37°C, 5% CO_2,

ble mediet erstattet med lignende medium inneholdende bare 1% FCS, og inkubasjonen fortsatte i ytterligere 72 timer ved 37°C, 5% CO_2, hvoretter mediet ble samlet opp og analysert med hensyn på dets evne til å inhibere IFNγ-syntese.

10 ml aliquoter av nyisolerte leukocytter fra perifert blod (PBL-er) (ca. $2x10^6$ celler/ml) ble inkubert ved 37°C med fytohemo-agglutinin (PHA) (100 ng/ml) i medium bestående av (i) 90% DME supplert med 5% FCS og 2 mM glutamin, og (ii) 10% supernatant fra COS 7-celler som tidligere var blitt transfektert med pBCRF1(SRa). Etter 24 timer ble cellene og supernatantene innhøstet for å analysere med hensyn på tilstedeværelsen av henholdsvis enten IFNγ-mRNA eller IFNγ-protein. Kontroller ble behandlet identisk, bortsett fra at 10%-supernatanten var fra COS 7-kulturer som tidligere var blitt transfektert med et plasmid som bærer en ubeslektet cDNA-innføyelse. De vIL-10-behandlede prøver oppviste ca. 50% inhibering av IFNγ-syntese i forhold til kontrollene.

Eksempel 3

Ekspresjon av vIL-10 i *Escherichia coli*

Et gen som koder for det følgende, fullt ferdige vIL-10, kan uttrykkes i *E. coli*.

Thr Asp Gln Cys Asp Asn Phe Pro Gln Met Leu Arg Asp Leu Arg
Asp Ala Phe Ser Arg Val Lys Thr Phe Phe Gln Thr Lys Asp Glu
Val Asp Asn Leu Leu Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys
Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr
Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Glu Ala
Lys Asp His Val Asn Ser Leu Gly Glu Asn Leu Lys Thr Leu Arg
Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu Pro Cys Glu Asn Lys
Ser Lys Ala Val Glu Gln Ile Lys Asn Ala Phe Asn Lys Leu Gln
Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp Ile Phe Ile
Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Ile Lys Ala Arg.

cDNA-innføyelsen i pBCRF1(SRa) ble på nytt klonet inn i et M13-plasmid hvor det ble endret to ganger ved seterettet mutagenese: først slik at et Cla I-sete ble dannet i 5'-enden

til det kodende område for det fullt ferdige vIL-10-polypeptid, og deretter for å danne et Bam HI-sete i 3'-enden til det kodende område for det fullt ferdige vIL-10-polypeptid. Den muterte sekvens ble så lett innføyet i TRPC11-ekspresjonsvektoren beskrevet nedenunder:

TRPC11-vektoren ble konstruert ved å ligere et syntetisk konsensus-RBS-fragment til ClaI-linkere (ATGCAT) og ved å klone de resulterende fragmenter inn i ClaI-begrenset pMT11hc (som tidligere var blitt modifisert slik at det inneholdt ClaI-setet). pMT11hc er et lite (2,3 kilobaser) høykopi, AMP^R, TET^S-derivat av pBR322 som bærer pVX-plasmid-EcoRI-HindIII-polylinkerområdet. (pVX er beskrevet av Maniatis et al. (1982), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor). Dette ble modifisert slik at det inneholdt ClaI-setet ved å begrense pMT11hc med EcoRI og BamHI, fylle igjen de 5'-resulterende, "klebrige" ender og ligere med ClaI-linker (CATCGATG) for derved å gjenopprette EcoRI- og BamHI-setene og erstatte SmaI-setet med et ClaI-sete. Én transformant fra TRPC11-konstruksjonen hadde en tandem-RBS-sekvens flankert med ClaI-seter. Ett av ClaI-setene og en del av den andre kopi av RBS-sekvensen ble fjernet ved fordøyelse av dette plasmidet med PstI, behandling med Bal31-nuklease, begrensning med EcoRI og behandling med T4-DNA-polymerase i nærvær av alle fire deoksynukleotidtrifosfatene. De resulterende 30-40 bp store fragmenter ble utvunnet via PAGE og klonet inn i SmaI-begrenset pUC12. Et 248 bp *E. coli*-trpP-bærende EcoRI-fragment avledet fra pKC101 (beskrevet av Nichols et al. (1983), Methods in Enzymology, 101, s. 155-164, Academic Press, N.Y), ble så klonet inn i EcoRI-setet for å fullføre TRPC11-konstruksjonen. Dette er illustrert i figur 1. TRPC11 ble anvendt som en vektor for vIL-10 ved først å fordøye den med ClaI og Bam HI, rense den og så blande den i en standard ligeringsoppløsning med ClaI-Bam HI-fragmentet i M13 som inneholder nukleotidsekvensen som koder for det fullt ferdige BCRF1. Det innføyelsesholdige TRPC11, henvist til som TRPC11-BCRF1, ble propagert i *E. coli* K12-stamme JM101, f.eks. tilgjengelig fra ATCC under deponeringsnr. 33876.

UNDERSØKELSE A. Differensielle effekter av interleukin-4 og -10 på interleukin-2-indusert interferon-γ-syntese og lymfokinaktivert dreperaktivitet

Dataene som er presentert i dette avsnittet, ble publisert etter sin prioritetsdato i Hsu et al. (1992), Int'l Immunology, 4, s. 563-569.

Oppsummering

Kultur av humane, mononukleære celler fra perifert blod (PBMC) med interleukin-2 (IL-2) stimulerer syntese av cytokiner og frembringelse av lymfokinaktivert dreperaktivitet (LAK-aktivitet). Både interleukin-4 (IL-4) og interleukin-10 (IL-10; cytokinsynteseinhibitorfaktor, CSIF) inhiberer IL-2-indusert syntese av IFNγ og TNFα med human-PBMC. I motsetning til IL-4 inhiberer imidlertid IL-10 hverken IL-2-indusert proliferasjon av PBMC og nyfremstilte, naturlige dreperceller (NK-celler), eller IL-2-indusert LAK-aktivitet. IL-4 inhiberer dessuten IL-2-indusert IFNγ-syntese ved hjelp av rensede, nyfremstilte NK-celler, mens inhibitoreffekten av IL-10 i motsetning til dette, formidles ved hjelp av CD14+-celler (monocytter/makrofager). IL-10 inhiberer TNFα-syntese ved hjelp av monocytter eller monocytter pluss NK-celler, men ikke ved hjelp av NK-celler alene. Disse resultatene viser at IL-4 og IL-10 virker på NK-celler via distinkte reaksjonsveier, og at IL-2-indusert cytokinsyntese og LAK-aktivitet reguleres via forskjellige mekanismer.

Interleukin-10 (cytokinsynteseinhibitorfaktor, CSIF) inhiberer syntese av cytokiner, slik som IFNγ, ved hjelp av muse- og human-T-lymfocytter og monocytter/makrofager. Inhibitoreffekten på T-cellecytokinsyntese er indirekte, formidlet av monocytter/makrofager i deres egenskap av antigenpresenterende celler. Både muse- og human-IL-10 (mIL-10, hIL-10) er homologe med den åpne leseramme BCRF1 fra Epstein-Barr-virus (virus-IL-10, vIL-10), som også oppviser IL-10-aktivitet på muse- og humanceller. Det ble tidligere observert at vIL-10 inhiberer IL-2-indusert IFNγ-syntese med human-PBMC. Ettersom NK-celler er blitt rapportert å være hovedkilden for IFNγ i IL-2-stimulert PBMC, er effektene av hIL-10 og vIL-10 på IL-2-indusert cytokinsyntese og LAK-aktivitet blitt undersøkt sam-

men med sammenligning av disse cytokinene med IL-4, en kjent inhibitor for LAK-aktivitet. Dataene viser at IL-4, hIL-10 og vIL-10 inhiberer syntese av IFNγ og TNFα med IL-2-stimulert PBMC, men bare IL-4 inhiberer IFNγ-syntese med rensede NK-celler. I motsetning til IL-4 inhiberer dessuten IL-10 ikke IL-2-indusert LAK-aktivitet. Disse resultatene understøtter en modell hvor IL-4 og IL-10 virker på NK-celler ved hjelp av forskjellige mekanismer, og at IL-2-indusert cytokinsyntese og LAK-aktivitet reguleres via forskjellige reaksjonsveier.

Eksempel A1

Effekter av IL-4 og IL-10 på IL-2-indusert cytokinsyntese og LAK-aktivitet

Cytokiner

Human, rekombinant IL-2 (rIL-2) ble vennligst fremstilt under anvendelse av standardfremgangsmåter av S. Zurawski (DNAX) eller innkjøpt (Cetus, Emeryville, CA). Human-rIL-4 var fra Schering-Plough Research. Human-rIL-1β ble innkjøpt fra Biosource International (Camarillo, CA). Rekombinant hIL-10 og vIL-10 ble brukt som COS7-transfeksjonssupernatanter; supernatanter fra transfeksjoner med en irrelevant cDNA eller ingen cDNA ble brukt som kontroller. Se Vieira et al. (1991), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88, s. 1171-1176, og Hsu et al. (1990), Science, 250, s. 830-832, og ovenfor. IFNγ og TNFα (Endogen, Boston, MA) ble målt ved hjelp av ELISA. Cytokinproduksjon i fravær av IL-2 var under sensitivitetsgrensene til IFNγ- og TNFα-ELISA-analysene som var henholdsvis 0,3 ng/ml og 12 pg/ml.

Cellelinjer

Daudi-celler (Burkitt-lymfom) ble levert av Schering-Plough (Lyon, Frankrike). COLO-celler (tykktarmskarsinom) levert av dr. Lewis Lanier, ble dyrket i RPMI 1640 pluss 5% kalvefosterserum.

Antistoffer

Monoklonale antistoffer mot leukocyttcelleoverflateantigener (CD3, CD4, CD5, CD14, CD16, CD19, CD56) ble innkjøpt fra Becton-Dickinson (San Jose, CA). Antistoffer for uttømm-

ingsforsøk med magnetisk kule (CD3, CD4, CD5, CD14, CD19) ble fremstilt fra ascitesvæsker fra SCID-mus injisert med den passende cellelinje. Anti-IL-4- og anti-IL-10-nøytraliserende antistoffer er beskrevet f.eks. i Chretien et al. (1989), J. Immunol. Methods, 117, s. 67-81, og Yssel et al., J. Immuno. Methods, 72, s. 219-217.

PBMC-fremstilling og dyrking

Human PBMC ble isolert fra "buffy coats" fra friske blodgivere ved sentrifugering over Ficoll-Hypaque og dyrket ved 10^6/ml ub-rIL-2 (200 enheter/ml) med eller uten andre cytokiner i Yssels medium med 1% human-Ab+-serum. Dyrkninger ble utført i fem dager i 24- (eller 96-) brønners plater, og supernatanter ble innhøstet. PBMC fra forskjellige donorer varierte i evne til å produsere IFNγ og TNFα når de ble stimulert med IL-2.

Cellerensinger

PBMC ble vasket og inkubert i vevskulturskåler i 40 minutter ved 37°C. Adherente celler ble samlet opp ved skraping med en gummiskrape. Ikke-adherente celler ble fjernet, pelletert og tilført en nylonullkolonne og inkubert i 40 minutter ved 37°C. Etter eluering fra kolonnen ble cellene pelletert og på nytt oppslemmet i 30% Percoll med 10% FCS/PBS og belagt på 40% Percoll. Etter sentrifugering i 30 minutter ved romtemperatur ble de store, granulære lymfocytter i grenseflaten utvunnet og vasket to ganger. Disse cellene ble inkubert med anti-CD56-antistoff (Becton-Dickinson, San Jose, CA) i 30 minutter ved 4°C, vasket og så farget med geite-anti-muse-FITC (Jackson Immunoresearch, Avondale, PA) før FACS-sortering. CD56+-celler omfattet ca. 35-50% av cellene underkastet sortering. Sorterte celler var mer enn 99,5% CD56+ etter reanalyse. 9 x 10^4 rensede NK-celler ble blandet med 3 x 10^4 adherente celler eller T-celler i et sluttvolum på 100 ml og dyrket med IL-2 med eller uten andre cytokiner.

Rensede NK-celler og monocytter fra den samme blodgiver ble erholdt på følgende måte: PBMC ble inkubert med røde blodlegemer fra sau over natten; rosettdannende "E+" (CD2+)- og ikke-rosettdannende "E-"-celler ble separert ved sentrifu-

gering over en gradient av Ficoll-Hypaque. E+-celler ble underkastet den samme rensefremgangsmåte som beskrevet for PBMC (se ovenfor), hvorved man fikk rensede NK-celler. E--celler ble inkubert først med anti-CD14-mAb (LeuM3)- og FITC-merket geite-anti-muse-IgG-antistoff, og CD14+-celler ble sortert på en "FACStar plus". Renheten til disse cellene var høyere enn 98%. 10^5 rensede NK-celler ble blandet med 10^4 rene monocytter i 100 ml og dyrket alene eller med IL-2 og andre tilsetninger som beskrevet ovenfor.

Alternativt ble NK-celler og monocytter anriket ved hjelp av utvelgelse med magnetisk kule og så sortert på følgende måte: PBMC ble først inkubert med monoklonale anti-CD3-, -CD4-, -CD5- og anti-CD19-antistoffer for å merke T-celler og B-celler. Etter vasking to ganger med PBS ble geite-anti-muse-IgG-belagte, magnetiske kuler ("Dynabeads M-450", Dynal Inc., Great Neck, NY) tilsatt for å fjerne de antistoffbelagte T-celler og B-celler ved hjelp av magnetisk utvelgelse. De resulterende, anrikede NK-celler og monocytter ble merket med anti-CD56-PE og anti-CD14-FITC, og CD56+- og CD14+-celler ble isolert på cellesortereren. Renhet for de to sorterte cellepopulasjonene var mer enn 98,5%.

Cytotoksisitetsanalyse

PBMC ble inkubert med 200 U/ml IL-2 ved 10^6 celler/ml i 3 dager i Yssels medium inneholdende 1% human-AB+-serum. Dyrkningene ble utført i 1-ml brønner i en Linbro 24-brønners plate (Flow Laboratories, McLean, VA). Etter dyrkningsperioden ble cellene innhøstet, vasket to ganger og brukt som effektorceller i en ^{51}Cr-frigivelsesanalyse. Se Spits et al. (1988), J. Immunol., 141, fra s.29. 1000 ^{51}Cr-merkede målceller (COLO eller Daudi) ble blandet med varierende antall effektorceller i Iscoves medium inneholdende 0,25% BSA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) i U-formede 96-brønners plater. Platene ble sentrifugert i 5 minutter ved 50 x g før inkubasjon i 4 timer ved 37°C i en fuktig 5% CO_2-atmosfære. Prøvene ble innhøstet og tellet i en gammateller (LAB, Bromma, Sverige).

Rekombinant hIL-10, vIL-10 og hIL-4 ble testet med hensyn på virkningene på syntese av IFNγ og TNFα, og på LAK-aktivitet indusert ved hjelp av IL-2 i mononukleære celler fra

perifert blod (PBMC). PBMC ble dyrket ved 200 U/ml rIL-2 med enten rIL-4 (200 U/ml) eller COS7-supernatanter inneholdende hIL-10, vIL-10 eller ikke noe cytokin (falsk) i 5 dager, hvoretter cytokinsyntese ble målt. IL-2-indusert IFNγ- og TNFα-syntese i kulturer inneholdende hIL-10, vIL-10 eller IL-4, ble inhibert i vesentlig grad (figur 2A, 2B).

Resultatet som ble oppnådd med IL-4, bekrefter observasjoner om at IL-4 inhiberer IL-2-indusert ekspresjon av IFNγ-mRNA og protein. Inhibering av cytokinsyntese ved hjelp av både IL-4 og IL-10 er doseavhengig og reverseres ved å blokkere henholdsvis monoklonale anti-hIL-4- og anti-hIL-10-antistoffer, men ikke av isotypekontrollimmunglobuliner (figur 2C, 2D).

LAK-aktivitet ble også fastlagt mot Burkitt-lymfomcellelinjen Daudi og tykktarmskarsinomlinjen COLO som drepes effektivt ved hjelp av LAK-celler, men ikke av nyfremstilte NK-celler. IL-2-indusert LAK-aktivitet mot Daudi- og COLO-celler ble inhibert bare i kulturer som inneholdt IL-4, og var uendret eller til og med litt forhøyet i hIL-10- og vIL-10-kulturene (figur 3A). IL-2-indusert LAK-aktivitet formidles primært ved hjelp av CD56(Leu19)+-NK-celler. At LAK-aktivitet mot COLO-celler ikke ble inhibert ved hjelp av IL-10, indikerte at cytotoksisitet formidlet ved hjelp av aktiverte NK-celler, ikke ble påvirket av dette cytokin. Ettersom aktiverte CD3+-gd+-T-celler imidlertid kan drepe Daudi-celler, var det mulig at IL-10 stimulerte IL-2-indusert gd+-T-cellecytotoksisitet mot Daudi samtidig som det blokkerte IL-2-indusert NK-aktivitet mot denne målcellen.

For å bestemme fenotypen til anti-Daudi-LAK-celler indusert i PBMC dyrket med IL-2 og hIL-10, ble CD56+- og CD56--populasjoner sortert ved hjelp av FACS og testet med hensyn på cytotoksisitet mot Daudi-celler. Figur 3B viser at, på samme måte som med IL-2 alene, ble betydelig LAK-aktivitet observert bare i CD56+-populasjonen. Mens både IL-4 og IL-10 inhiberer IL-2-indusert syntese av IFNγ og TNFα, inhiberer således bare IL-4 IL-2-indusert cytotoksisitet ved hjelp av aktiverte NK-celler som er til stede i PBMC.

Eksempel A2

IL-10 inhiberer ikke IFNγ-syntese med, eller proliferasjon av, IL-2-stimulerte, rensede NK-celler

Proliferasjonsanalyse

Celler ble fordelt ved 10^5 celler/brønn i 96-brønners rundbunnede plater og inkubert i nærvær eller fravær av cytokiner i fire dager ved et sluttvolum på 200 µl/brønn. Så ble 1 mCi i ^{3}H-tymidin i 10 µl tilsatt til hver brønn. Etter seks timer ble kulturene innhøstet, og inkorporert radioaktivitet ble fastslått ved scintillasjonstelling.

Majoriteten av IL-2-indusert IFNγ-syntese i PBMC er angivelig avledet fra NK-celler og ikke fra T-celler. Effekten av hIL-10, vIL-10 og IL-4 på IL-2-indusert IFNγ-syntese ble derfor testet ved hjelp av FACS-rensede NK-celler (renhet >99,5%). IL-4 inhiberte IL-2-indusert IFNγ-sekresjon av disse cellene; i motsetning til dette undertrykket hverken hIL-10 eller vIL-10 IFNγ-syntese med rensede, nyfremstilte NK-celler (figur 4A). IL-4 inhiberte dessuten signifikant IL-2-indusert proliferasjon med PBMC eller rensede NK-celler, mens IL-10 ikke hadde noen effekt på IL-2-formidlet proliferasjon (figur 4B).

I motsetning til IL-4 påvirker ikke IL-10 NK-cellen direkte, men inhiberer monocyttens evne til å gi et kostimulerende signal. Denne konklusjonen understøttes klarest av effektene av IL-10 på IL-2-indusert IFNγ-produksjon. Som angitt ovenfor, produserte bicellepreparater ikke IFNγ. Selv om IL-2-stimulerte NK-celler produserte betydelige nivåer av IFNγ uten biceller (figur 4A, 5A og 5B), resulterte tilsetning av både plastisk adherente celler og rensede CD14+-celler til rensede NK-celler i en sterk forøkning av IFNγ-syntese. Fraværet av en direkte effekt av IL-10 på NK-cellen (figur 4A og 4B) tyder på at IL-10 inhiberer IL-2-indusert IFNγ-produksjon ved å virke på monocytten. Inhibering av T-cellecytokinsyntesen med IL-10 formidles likeledes av monocytt/makrofag-biceller.

Eksempel A3

Monocytter formidler inhibering med IL-10 av IL-2-stimulert IFNγ- og TNFα-syntese ved hjelp av NK-celler

At IFNγ-syntese ble inhibert med IL-10 i kulturer av PMBC, men ikke rene NK-celler, tyder på at denne effekten av IL-10 ble formidlet ved hjelp av biceller. For å undersøke egenskapene til disse bicellene ble NK-celler renset ved å sortere CD56+-celler fra lavdensitetscellefraksjonen erholdt ved hjelp av Percoll-gradientsentrifugering, eller fra T-celle-, B-celle- og monocyttuttømt PBMC, og ble blandet med plastisk adherente celler eller med høydensitetscellepopulasjonen (98% T-celler) fra Percoll-gradienten. Tilsetning av adherente celler til NK-cellene forøkte sterkt IL-2-indusert IFNγ-produksjon med NK-celler; denne stimulatoreffekten av adherente celler ble blokkert med IL-10 (figur 5A). Den adherente cellepopulasjon produserte ikke i seg selv påvisbare nivåer av IFNγ som respons på IL-2. I motsetning til dette hadde den T-celleholdige fraksjon ingen virkning på IL-2-indusert IFNγ-produksjon med NK-celler og formidlet ikke inhibering av IFNγ-produksjon med IL-10 (figur 5A).

Plastisk adherente celler er anriket på monocytter, men kan inneholde andre cellepopulasjoner. For å bekrefte at monocytter både forøker IL-2-indusert IFNγ-produksjon og formidler dens inhibering med IL-10, ble NK-celler og CD14+-monocytter renset ved sortering og ble dyrket i nærvær av IL-2 og IL-10. Figur 5B viser at tilsetning av rensede monocytter til NK-celler økte IL-2-indusert IFNγ-produksjon, og at IL-10 inhiberte denne økningen.

Kvalitativt lignende resultater ble observert for TNFα-syntese. Figur 5C viser at NK-celler, som forventet, produserte påvisbar TNFα som respons på IL-2. CD14+-celler produserer TNFα uavhengig av IL-2. IL-10 inhiberer TNFα-produksjon ved hjelp av monocytter både i nærvær (figur 5C) og fravær av IL-2. I motsetning til dette ble TNFα-syntese ved hjelp av NK-celler ikke inhibert med IL-10. Stimulering av NK- og CD14+-celler sammen resulterte i et nivå for TNFα-produksjon som var i det vesentlige høyere enn det som ble observert for hver celle alene, og denne forøkning ble blokkert ved hjelp av IL-10.

Monocytter og deres produkter er blitt påvist å forhøye IL-2-indusert IFNγ-produksjon av hvilende NK-celler vesentlig (figur 5B). Flere monokiner, slik som IL-1 og TNFα, har vært implisert som kostimulatorer i IFNγ-syntese av human- og muse-NK-celler under forskjellige betingelser. At IL-10 inhiberer syntese av monokiner, slik som IL-1, IL-6 og TNFα ved hjelp av LPS- eller IFNγ-stimulerte monocytter/makrofager, tyder på at effektene av IL-10 som her er rapportert, skyldtes IL-10's inhiberende produksjon av kostimulatormolekyler av biceller. Supernatanter av adherente celler (for det meste inneholdende monocytter) ble observert å øke IFNγ-produksjon med IL-2-stimulerte, rensede NK-celler, mens supernatanter av adherente celler dyrket i nærvær av IL-10, mangler denne evne, selv når de er uttømt for IL-10. Hvorvidt denne supernatantaktiviteten er ansvarlig for hele kostimulatoreffekten av biceller, er ikke klart. Det er blitt observert at IL-1α og IL-1β, men ikke IL-6 eller TNFα, kostimulerer IL-2-indusert IFNγ-produksjon av NK-celler; tilsetning av opptil 1000 U/ml IL-1 reverserer imidlertid ikke inhibitoreffekten av IL-10 på IL-2-indusert IFNγ-syntese av ufraksjonert PBMC. Den mulighet foreligger derfor at én eller flere ytterligere aktiviteter virker i dette systemet, eller at IL-10 induserer syntese av en sekundærfaktor som inhiberer cytokinsyntese ved hjelp av NK-celler.

UNDERSØKELSE B. <u>IL-10 inhiberer cytokinsyntese ved hjelp av humanmonocytter: en autoregulatorrolle for IL-10 produsert ved hjelp av monocytter</u>

Dataene presentert i dette avsnittet, ble publisert etter prioritetsdatoen i de Waal Malefyt et al. (1990), J. Exptl. Med., <u>174</u>, s. 1209-1220.

<u>Oppsummering</u>

Dette avsnittet viser at humanmonocytter aktivert ved hjelp av LPS, er i stand til å produsere høye nivåer av interleukin-10 (IL-10), tidligere betegnet cytokinsynteseinhibitorfaktor (CSIF), på en doseavhengig måte. IL-10 var påvisbart 7 timer etter aktivering av monocyttene, og maksimale nivåer av IL-10-produksjon ble observert etter 24-48 timer. Disse

kinetikkene indikerte at produksjonen av IL-10 ved hjelp av humanmonocytter var forholdsvis sen sammenlignet med produksjonen av IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, TNFα og G-CSF, som alle ble utskilt ved høye nivåer 4-8 timer etter aktivering. Produksjonen av IL-10 ved hjelp av LPS-aktiverte monocytter ble, på samme måte som for IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, TNFα, GM-CSF og G-CSF, inhibert av IL-4. IL-10 tilsatt til monocytter, aktivert ved hjelp av IFNγ, LPS eller kombinasjoner av LPS og IFNγ ved oppstartingen av dyrkingene, inhiberte dessuten sterkt produksjonen av IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, TNFα, GM-CSF og G-CSF på transkripsjonsnivået. Virus-IL-10, som har lignende biologiske aktiviteter på humanceller, inhiberte også produksjonen av TNFα og GM-CSF ved hjelp av monocytter etter LPS-aktivering. Aktivering av monocytter med LPS i nærvær av nøytraliserende anti-IL-10-mAb-er resulterte i produksjon av større mengder cytokiner i forhold til LPS-behandling alene, noe som indikerer at endogent fremstilt IL-10 inhiberte produksjonen av IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, TNFα, GM-CSF og G-CSF. I tillegg hadde IL-10 autoregulatoreffekter ettersom det sterkt inhiberte IL-10-mRNA-syntese i LPS-aktiverte monocytter. Endogent fremstilt IL-10 ble dessuten funnet å være ansvarlig for reduksjonen i klasse II-MHC-ekspresjon etter aktivering av monocytter med LPS. Til sammen indikerer disse resultatene at IL-10 har viktige regulatoreffekter på immunologiske og inflammatoriske responser på grunn av dets evne til å nedregulere klasse II-MHC-ekspresjon og inhibere produksjonen av proinflammatoriske cytokiner ved hjelp av monocytter.

Murint interleukin-10 (IL-10) ble nylig identifisert og dets gen klonet basert på dets cytokinsynteseinhibitoraktivitet (CSIF). I murine systemer ble IL-10 fremstilt ved hjelp av $CD4^+$-Th2-undersettet og inhiberer cytokinproduksjonen, særlig IFNγ, ved hjelp av Th1-kloner. Inhiberingen av cytokinproduksjon med IL-10 ble observert bare når makrofager, men ikke B-celler, ble brukt som antigenpresenterende celler (APC). I tillegg til dets CSIF-aktivitet ble IL-10 påvist å være pleiotropt og virke på forskjellige celletyper, inkludert tymocytter, cytotoksiske T-celler, mastceller, B-celler og makrofager.

Human-IL-10 oppviser også CSIF-aktivitet. Produk-

sjonen av IFNγ og GM-CSF ved hjelp av PBMC aktivert ved hjelp av PHA eller anti-CD3-mAb-er, ble sterkt inhibert av IL-10, og denne inhiberingen inntrådte på transkripsjonsnivået. Både human- og murin-IL-10 har omfattende sekvenshomologi med en tidligere ukarakterisert, åpen leseramme i Epstein-Barr-virusgenomet, BCRF-1. Ekspresjon av denne åpne leseramme ga et aktivt protein betegnet virus-IL-10 (v-IL-10), som hadde de fleste egenskaper til felles med human- og murin-IL-10, inkludert CSIF-aktivitet på muse- og human-T-celler.

Human-IL-10 og v-IL-10 er i stand til å inhibere antigenspesifikke, proliferative T-celleresponser ved å redusere antigenpresenterende kapasitet til humanmonocytter via nedregulering av klasse II-MHC-molekyler. De her presenterte resultater viser at humanmonocytter er i stand til å produsere høye nivåer av IL-10 etter aktivering med LPS, og at denne produksjonen er forholdsvis sen sammenlignet med produksjonen av andre monokiner. I tillegg er det rapportert her at IL-10 inhiberer produksjonen av de proinflammatoriske cytokiner sterkt, f.eks. IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8 og TNFα, og av hematopoesevekstfaktorene, GM-CSF og G-CSF, ved hjelp av monocytter aktivert med LPS, IFNγ eller LPS og IFNγ. Endogent fremstilt IL-10 har ikke bare autoregulatoreffekter på IL-1α-, IL-1β-, IL-6-, IL-8-, TNFα-, GM-CSF- og G-CSF-produksjon med monocytter, men nedregulerer også sin egen produksjon og klasse II-MHC-ekspresjon på monocytter på en autoregulerende måte. Disse resultatene indikerer at IL-10 har viktige regulatoreffekter på immunologiske og inflammatoriske responser.

Eksempel B1

IL-10 fremstilles ved hjelp av humanmonocytter

Isolering og dyrkning av humanmonocytter

Monocytter fra humant, perifert blod ble isolert fra 500 ml blod fra normale blodgivere. Mononukleære celler ble isolert ved densitetssentrifugering i en blodkomponentseparator etterfulgt av sentrifugering i lymfocytter og monocytter ved sentrifugeelutriasjon. Monocyttpreparatet var >95% rent, bedømt ved hjelp av ikke-spesifikk esterasemerking, og inneholdt mer enn 98% levedyktige celler. Monocytter ble dyrket i Yssels medium inneholdende humanserumalbumin (HSA) supplert

med 1% sammenslått, varmeinaktivert human-AB$^+$-serum. Dette dyrkningsmediet var endotoksinfritt, bestemt ved hjelp av Limulus-amøbocyttlysatanalysen (<0,2 ng/ml endotoksin). Monocyttene ble dyrket ved en konsentrasjon på 4 x 10^6 celler/ml i teflonposer (Jansen, MNL, St. Niklas, Belgia), som forhindret adhesjon av disse cellene. Etter dyrking i de angitte tidsrom ble monocytter samlet opp og analysert med hensyn på celleoverflateekspresjon ved hjelp av indirekte immunfluorescens eller analysert med hensyn på lymfokingenekspresjon ved hjelp av Northern- og PCR-analyse. I tillegg ble monocyttkultursupernatanter samlet opp for bestemmelse av IL-1α-, IL-1β-, IL-6-, IL-8-, IL-10-, TNFα-, GM-CSF- og G-CSF-produksjon etter aktivering av disse cellene. Levedyktigheten til cellene etter dyrking overskred alltid 95%, bestemt ved hjelp av trypanblått-utelukkelse.

Reagenser

Rekombinant human-IL-10 og v-IL-10 ble uttrykt i *E. coli* som glutation-S-transferase-fusjonsproteiner, renset og fordøyd med trombin for å fjerne N-endefusjonsdelen, noe som resulterte i aktivt human- og virus-IL-10. Renset human-r-IL-4 og -r-IFNγ ble levert av Schering-Plough Research (Bloomfield, NJ). LPS (*E. coli* 0127:B8) ble erholdt fra Difco Laboratories (Detroit, MI). Det nøytraliserende anti-IL-10-mAb-19F1 ble frembrakt mot v-IL-10 og nøytraliserte både human- og virus-IL-10 effektivt.

Lymfokinbestemmelser

Produksjonen av IL-1α og TNFα ved hjelp av monocytter ble målt ved lymfokinspesifikke ELISA-er erholdt fra Endogen (Boston, MA). Den nedre påvisningsgrense til disse ELISA-ene var henholdsvis 50 pg/ml og 10 pg/ml. Fremstilling av IL-1β ble bestemt ved hjelp av lymfokinspesifikk ELISA erholdt fra Cistron (Pine Brook, NJ). Sensitiviteten til denne ELISA var 20 pg/ml. IL-6-nivåer ble bestemt ved hjelp av lymfokinspesifikk ELISA levert av Genzyme (Boston, MA). Sensitiviteten til denne analysen var 0,313 ng/ml. IL-8- og G-CSF-spesifikke ELISA-er ble erholdt fra R&D Systems (Minneapolis, MN) og

brukt til å kvantifisere IL-8- og G-CSF-produksjon. Sensitiviteten til disse ELISA-er var henholdsvis 4,7 pg/ml og 7,2 pg/ml. GM-CSF-produksjon ble bestemt ved hjelp av lymfokinspesifikk ELISA. Sensitiviteten til denne ELISA var 50 pg/ml. IL-10-produksjon ble bestemt ved hjelp av en spesifikk ELISA hvor et anti-IL-10-mAb (JES 9D7) ble brukt som et beleggantistoff og et annet anti-IL-10-mAb (JES3-12G8) som et sporantistoff. Sensitiviteten til denne ELISA var 50 pg/ml.

IL-10 fremstilles ved hjelp av aktiverte T-cellekloner, aktiverte T- og B-celler fra perifert blod, EBV-transformerte B-cellelinjer og monocytter. Høyrensede humanmonocytter isolert ved sentrifugeelutriasjon, produserte IL-10 etter aktivering med LPS. I tillegg er det påvist at disse humanmonocyttene var i stand til å produsere høye nivåer av IL-6, TNFα og GM-CSF (figur 6). Kinetikk for cytokinproduksjon med LPS-aktiverte monocytter indikerte at IL-10-produksjon med LPS-aktiverte monocytter var forholdsvis sen. Den ble først påvist i supernatanter innhøstet etter 7,5 timer, men maksimal produksjon ble observert 20-48 timer etter aktivering. I motsetning til dette ble TNFα og IL-6 produsert hurtig etter aktivering og nådde maksimale produksjonsnivåer henholdsvis 3,5 og 7,5 timer etter aktivering (figur 6). GM-CSF-produksjon ble imidlertid også først påvist 7,5 timer etter aktivering av monocytter med LPS, men i dette tilfellet ble maksimale produksjonsnivåer nådd etter 20 timer. Doseresponsundersøkelser indikerte at aktivering av monocytter med LPS ved 10 ng/ml allerede resulterte i betydelige nivåer av IL-10-produksjon, mens den maksimale IL-10-syntese ble observert ved LPS-konsentrasjoner på 1 µg/ml. (Figur 7).

Eksempel B2

IL-10 inhiberer cytokinproduksjon med humanmonocytter

IL-10 er blitt påvist å inhibere IFNγ- og GM-CSF-produksjon med aktivert PBMC. For å bestemme effektene av IL-10 på produksjonen av cytokiner med monocytter ble høyrensede monocytter aktivert i 24 timer med LPS i fravær eller nærvær av IL-10. I tillegg ble monocytter aktivert med LPS i 24 timer i nærvær av IL-4 (100 U/ml) eller ved nøytralisering av anti-IL-10-mAb-19F1, som var frembrakt mot v-IL-10, men som effek-

tivt nøytraliserte både human-IL-10 og v-IL-10. Cytokinproduksjon ble bestemt i supernatantene til disse kulturene, innhøstet 24 timer etter aktivering, ved hjelp av cytokinspesifikke ELISA-er. Som vist i tabell B1, produserte monocytter som ble inkubert i medium alene ved 37°C, ikke IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-10, TNFα, GM-CSF og G-CSF. Under disse betingelsene ble bare betydelige nivåer av IL-8 syntetisert. Aktivering av monocytter med LPS (1 µg/ml) resulterte i produksjon av høye nivåer av IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, TNFα, GM-CSF og G-CSF. Interessant nok inhiberte IL-10 produksjonen av IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, TNFα, GM-CSF og G-CSF i varierende utstrekning (tabell B1). De sterkeste inhibitoreffektene av IL-10 ble observert på produksjonen av IL-1α, TNFα, GM-CSF og G-CSF som ble blokkert ved 80-100%. Inhiberingen av IL-1β- og IL-6-produksjon var mindre uttalt, mens syntesen av IL-8 bare ble svakt påvirket av IL-10.

TABELL B1

Effekter av eksogent IL-10, endogent IL-10 og IL-4 på humanmonocytters cytokinproduksjon

	IL-1α	IL-1β	IL-6	IL-8	IL-10	TNFα	GM-CSF	G-CSF
				ng/ml				
Medium 37°C	0	0	0	150	0	0	0	0
LPS	1,2	44,8	261,7	479	30,6	21,2	0,6	90
LPS+IL-4	0	9,7	135,7	418	11,9	5,1	0	17,5
LPS+IL-10	0	13,6	78	434	ND	2,6	0	21,1
LPS+αIL-10	2,7	50,6	323	672	ND	47,6	5,5	110

Humanmonocytter, isolert ved sentrifugeelutriasjon, ble dyrket i teflonposer ved en konsentrasjon på 4 x 10^6/ml og aktivert med LPS (1 mg/ml) i fravær eller nærvær av IL-10 (100 U/ml), IL-4 (100 U/ml) eller anti-IL-10-mAb-19F1 (10 µg/ml) i 24 timer, og produksjon av cytokiner ble bestemt i supernatantene ved hjelp av cytokinspesifikke ELISA-er. ND: ikke utført.

Eksempel B3

IL-10 inhiberer også cytokinproduksjon av monocytter aktivert med IFNγ

IL-10 inhiberte også cytokinproduksjon med monocytter aktivert med IFNγ, eller kombinasjoner av IFNγ og LPS. Figur 8 viser at IFNγ med optimale konsentrasjoner på 100 U/ml generelt ble mindre sterkt indusert av cytokinutskillelse enn det LPS ble ved optimale konsentrasjoner på 1 µg/ml. Dessuten er det vist at effektene av kombinasjoner av IFNγ og LPS på cytokinproduksjon med monocytter generelt var additive. De sterkeste inhibitoreffektene av IL-10 ble observert på IL-1α-, TNFα- og GM-CSF-produksjon. TNFα- og GM-CSF-sekresjon ble undertrykket med mer enn 90%, selv etter aktivering av monocyttene med optimale LPS- og IFNγ-konsentrasjoner. Selv om betydelige inhibitoreffekter på IL-1β- og IL-6-sekresjon ble observert ved optimale stimuleringsbetingelser, var deres inhibering mer uttalt når monocyttene ble stimulert med suboptimale konsentrasjoner av LPS, enten i fravær eller nærvær av optimale konsentrasjoner av IFNγ.

Eksempel B4

Virus-IL-10 inhiberer cytokinproduksjon med monocytter

Virus-IL-10 og human-IL-10 har like effekter på humanceller. Figur 9 viser at både IL-10 og v-IL-10 inhiberte TNFα- og GM-CSF-produksjon med monocytter på en lik måte. IL-10 og v-IL-10, tilsatt ved konsentrasjoner på 100 U/ml, hadde betydelige inhibitoreffekter på TNFα- og GM-CSF-produksjon med monocytter etter aktivering med LPS (1 µg/ml). Disse inhibitoreffektene av IL-10 og v-IL-10 på TNFα- og GM-CSF-sekresjon ble reversert når inkubasjoner ble utført i nærvær av mAb-19F1 (figur 9), noe som viser spesifisiteten av inhibitoreffektene til v-IL-10. I virkeligheten resulterte aktivering av monocytter med LPS i nærvær av IL-10 eller v-IL-10, og det nøytraliserende anti-IL-10-mAb, til og med i forøkt produksjon av TNFα og GM-CSF, noe som indikerer at endogent fremstilt IL-10 undertrykket produksjonen av disse cytokinene.

Inhibitoreffektene av endogent fremstilt IL-10 på cytokinproduksjon med monocytter ble evaluert ytterligere ved å kvantifisere cytokinnivåer produsert av LPS-aktiverte mono-

cytter i nærvær av nøytraliserende anti-IL-10-mAb. I tabell B1 er det vist at LPS pluss anti-IL-10-behandling av monocytter resulterte i høyere nivåer av cytokinproduksjon sammenlignet med aktivering med LPS alene, noe som indikerer at endogent produsert IL-10 i tillegg til sine inhibitoreffekter på TNFα- og GM-CSF-produksjon, blokkerte produksjonen av IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8 og G-CSF. De mest betydelige inhibitoreffektene ble funnet på produksjonen av IL-1α, GM-CSF og TNFα, mens inhibitoreffektene på IL-1β-, IL-6-, IL-8- og G-CSF-ekspresjon var betydelige, men mindre uttalte. Til sammen indikerer disse resultatene at både eksogent IL-10 og endogent produsert IL-10 inhiberer produksjonen av IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, TNFα, GM-CSF og G-CSF med LPS-aktiverte monocytter.

Eksempel B5

IL-4 inhiberer IL-10-produksjon med aktiverte monocytter

IL-4 inhiberer produksjon av IL-1β, IL-6 og TNFα med LPS-aktiverte monocytter. For å bestemme hvorvidt IL-10 også inhiberte IL-10-produksjon, ble monocytter aktivert med LPS i 24 timer og IL-10-sekresjon ble målt. Tabell B1 viser at IL-4 sterkt inhiberte IL-10-produksjon med LPS-aktiverte monocytter. I tillegg til sine inhibitoreffekter på IL-1β-, IL-6- og TNFα-sekresjon blokkerer IL-4 dessuten produksjonen av GM-CSF og G-CSF effektivt. Som observert for IL-10, ble imidlertid produksjonen av IL-8 bare svakt påvirket av IL-4. Til sammen indikerer disse data at IL-4 og IL-10 har sammenlignbare inhibitoreffekter på cytokinproduksjon med aktiverte monocytter.

Eksempel B6

Inhibering av monokinproduksjon inntrer på transkripsjonsnivået

Prober

De følgende prober ble brukt for Northern-analyse: 600 bp Sma I-fragment (nt 1299 - 1899) av pCD-hTGFβ, se Yokota et al. (1987) i Lymphokines, vol. 13, Goeddel og Webb (red.), Academic Press, New York; 1200 bp Pst I-fragment av pAL (b-actin), se Vieira et al. (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, s. 1172-1176; 567 bp BamHI-Xba I-fragment (nt 1 - 567) av

pCD-hIL-6, se Yokota et al. (1987); 268 bp Hind III-fragment (nt 29 - 297) av SP64-3-10c (IL-8), se Schmid et al. (1987), J. Immunol., 139, s. 250-___; 760 bp Bgl II - Hind III-fragment (nt 159 - 919) av pCD-SRa-hIL-10, se Vieira et al. (1991). De følgende oligonukleotider ble brukt til Southern-analyse av PCT-produkter: IL-1α: 5'-CATGGGTGCTTATAAGTCATC-3' (nt 500 - 521), se March et al. (1985), Nature, 315, s. 641-___; IL-1β: 5'-CGATCACTGAACTGCACGCTCCGGG-3' (nt 444 - 469), se March et al. (1985), Nature; IL-6: 5'-GAGGTATACCTAGAGTACCTC-3' (nt 510 - 531), se Hirano et al. (1986), Nature, 324, s. 73-__; IL-8: 5'-TAAAGACATACTCCAAACCTT-3' (nt 200 - 221), se Schmid et al. (1987), J. Immunol.; IL-10: 5'-CAGGTGAAGAATGCCT-TTAATAAGCTCCAAGAGAAAGGCATCTACAAAGCCATGAGTGAGTTTGACATC-3' (nt 429 - 498), Vieira et al. (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA; TNFα: 5-GGCGTGGAGCTGAGAGATAAC-3' (nt 500 - 521), se Pennica et al. (1984), Nature, 312, s. 724-___; GM-CSF: 5'-CCGGCGTCTCCTGAACCT-3' (nt 150 - 168), se Lee et al. (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, s. 4360-4364; actin: 5'-CTGAACCCTAAGGCCAACCGTG-3' (nt 250 - 272), se Alonso et al. (1986), J. Mol. Evol., 23, s. 11-___; og G-CSF: 5'-GCCCTGG-AAGGGATCTCCCCC-3' (nt 400 - 421), se Nagata et al. (1986), Nature, 319, s. 415-___. Nukleotidsekvenser er også tilgjengelige fra GENBANK, c/o Intelligenetics, Inc., Menlo Park, CA, og BCCG-databasen, og University of Wisconsin Biotechnology Center, Madison, Wisconsin. Syntetisk nukleotidbiosyntese er beskrevet i Gait (1984), Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford.

mRNA-isolering og Northern-analyse

Total-RNA ble isolert fra 20 x 10^6 monocytter ved hjelp av en guanidinium-tiocyanat-CsCl-fremgangsmåte. For Northern-analyse ble 10 µg total-RNA pr. prøve separert etter størrelse på 1% agarosegeler inneholdende 6,6% formaldehyd, overført til "Nytran" nylonmembraner (Schleicher & Schuell, Keene, NH) og hybridisert med prober, merket for høyspesifikk aktivitet (>10^8 cpm/mg). Filtre ble hybridisert, vasket under strenge betingelser og fremkalt.

PCR-analyse

1 µg total-RNA ble reverstranskribert under anvendelse av oligo $(dT)_{12-18}$ som primer (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) og AMV reverstranskriptase (Boehringer Mannheim) i en 20 µl reaksjonsblanding. 2 µl av reverstranskriptet (ekvivalent med 100 ng total-RNA) ble brukt direkte for hver amplifikasjonsreaksjon. Betingelser for PCR var som følger: i en 50 µl reaksjonsblanding, 25 nmol av hver primer, 125 µM hver av dGTP, dATP, dCTP og dTTP (Pharmacia, Uppsala, Sverige), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 1,5 mM $MgCl_2$, 1 mg/ml gelatin, 100 µg/ml ikke-acetylert BSA og 1 enhet "Vent" DNA-polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA). Anvendte primere var som følger: IL-1α "sense"-primer 5'-CATCGCCAATGACTCAGAGGAAG-3' (nt 302 - 325); IL-1α anti-"sense"-primer 5'-TGCCAAGCACACCCAGTAGTCTTGCTT-3' (nt 770 - 743); IL-1β "sense"-primer 5'-CCAGCTACGAATCTCGGACCACC-3' (nt 230 - 253); IL-1β anti-"sense"-primer 5'-TTAGGAAGACACAAATTGCATGGTGAAGTCAGT-3' (nt 896 - 863); IL-6 "sense"-primer 5'-ATGAACTCCTTCTCCACAAGC-3' (nt 1 - 21); IL-6 anti-"sense"-primer 5'-CTACATTTGCCGAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG-3' (nt 810 - 777); IL-8 "sense"-primer 5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTG-3' (nt 1-21); IL-8 anti-"sense"-primer 5'-TTATGAATTCTCAGCCCTCTTCAAAAA-CTTCTC-3' (nt 302 - 269); IL-10 "sense"-primer 5'-ATGCCCCAAGCTGAGAACCAAGACCCA-3' (nt 323 - 349); IL-10 anti-"sense"-primer 5'-TCTCAAGGGGCTGGGTCAGCTATCCCA-3' (nt 674 - 648); TNFα "sense"-primer 5'-AGAGGGAAGAGTTCCCCAGGGAC-3' (nt 310 - 333); TNFα anti-"sense"-primer 5'-TGAGTCGGTCACCCTTCTCCAG-3' (nt 782 - 760); GM-CSF "sense"-primer 5'-GCATCTCTGCACCCGCCC-GCTCGCC-3' (nt 76 - 100); GM-CSF anti-"sense"-primer 5'-CCTGCTTGTACAGCTCCAGGCGGGT-3' (nt 276 - 250); G-CSF "sense"-primer 5'-GAGTGTGCCACCTACAAGCTGTGCC-3' (nt 233 - 258); G-CSF anti-"sense"-primer 5'-CCTGGGTGGGCTGCAGGGCAGGGGC-3' (nt 533 - 508); β-actin "sense"-primer 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3' (nt 1 - 20); β-actin anti"sense"-primer 5'-GTCCTTAA-TGTCACGCACGATTTC-3' (nt 548 - 530). Reaksjoner ble inkubert i et Perkin-Elmer/Cetus "DNA Thermal cycler" i 20 sykluser (denaturering 30 s 94°C, annealering 30 s 55°C, forlengelse 60 s 72°C). Reaksjonsblandingene ble ekstrahert med $CHCl_3$, og 40 µl pr. prøve ble fylt på 1% agarosegeler i TAE-buffer. Produktet ble visualisert ved hjelp

av etidiumbromidfarging. Deretter ble geler denaturert i 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl, nøytralisert i 10 M ammoniumacetat og overført til "Nytran" nylonmembraner. Membraner ble forhybridisert i 6 x SSC, 1% SDS, 10 x Denhardts oppløsning (0,2% Ficoll, 0,2% polyvinylpyrrolidon, 0,2% BSA, pentax-fraksjon V), og 200 µg/ml *E. coli*-tRNA (Boehringer, Mannheim, BRD) i 4 timer ved 55°C. Oligonukleotidprober (200 ng), spesifikke for en sekvens innenfor primerne som ble brukt ved amplifikasjonen, ble merket i 5'-enden med T4-polynukleotidkinase (New England Biolabs) og γ-^{32}P-ATP (Amersham, Arlington Heights, IL). Prober ble separert fra ikke-inkorporerte nukleotider ved passering over en "Nick"-kolonne (Pharmacia, Uppsala, Sverige) og tilsatt til hybridiseringsblandingen. Etter hybridisering i 12 timer ved 55°C ble filtere vasket i 0,1 x SSC (1 x SSC:150 mM NaCl, 15 mM Na-sitrat, pH = 7,0), og 1% SDS ved romtemperatur, og eksponert mot Kodak XAR-5-filmer i 1-2 timer.

For å bestemme på hvilket nivå IL-10 inhiberte produksjonen av cytokiner med monocytter, ble det utført sammenlignende PCR-analyser på RNA isolert fra monocytter, aktivert med LPS i fravær eller nærvær av IL-10, IL-4 eller det nøytraliserende anti-IL-10-mAb i 24 timer. Cytokinmålingene i dette forsøket er vist i tabell B1. mRNA isolert fra disse prøvene, ble reverstranskribert inn i cDNA og deretter amplifisert med cytokinspesifikke primere. Et forholdsvis lite antall sykluser ble brukt for amplifikasjon for å sikre at mengden av amplifisert DNA var proporsjonal til syklusantallet og korrelerte med mengden av spesifikk mRNA i den opprinnelige prøve. Figur 10 viser at under disse betingelsene ble ekvivalente mengder av β-actin-spesifikt cDNA amplifisert. Monocytter inkubert ved 4°C i medium alene i 24 timer, uttrykte svært lave nivåer av IL-8-mRNA. Inkubasjon av disse cellene ved 37°C resulterte i en forøkt ekspresjon av IL-8-mRNA, men induserte ikke ekspresjon av IL-1α-, IL-1β-, IL-6-, IL-10-, TNFα-, GM-CSF- eller G-CSF-mRNA. LPS-aktivering resulterte i en sterk ekspresjon av IL-1α-, IL-1β-, IL-6-, IL-8- og G-CSF-mRNA, mens TNFα- og GM-CSF-mRNA ble middels indusert. Figur 10 viser dessuten at IL-1α-, IL-6-, TNFα-, GM-CSF- og G-CSF-ekspresjon

ble sterkt inhibert med IL-10 og IL-4 på mRNA-nivået, mens IL-1β- og IL-8-ekspresjon bare ble svakt påvirket av IL-10. Aktivering av monocytter med LPS i nærvær av anti-IL-10-mAb-et resulterte i en middels forøkning i ekspresjon av IL-1α-, IL-1β-, IL-6-, IL-8- og G-CSF-mRNA og en sterk økning i TNFα- og GM-CSF-mRNA-syntese. Ekspresjonsnivåene for cytokinspesifikt mRNA og deres modulering med eksogent og endogent IL-10 eller IL-4 korrelerte godt med sekresjon av de tilsvarende proteiner som vist i tabell B1, noe som indikerer at IL-10 og IL-4 inhiberte cytokinekspresjon med LPS-aktiverte monocytter på transkripsjonsnivået.

Eksempel B7

IL-10 regulerer IL-10-mRNA, men ikke TGFβ-mRNA-ekspresjon hos aktiverte monocytter

Etter å ha vist at humanmonocytter produserte IL-10 forholdsvis sent etter aktivering med LPS, ble det bestemt hvorvidt IL-10 kunne påvirke endogen IL-10-mRNA-syntese. Humanmonocytter ble aktivert av LPS i nærvær eller fravær av IL-10 i 7 timer, og mRNA-ekspresjon ble analysert ved hjelp av Northern-blotting. Figur 11 viser at IL-10-mRNA ble påvist 7 timer etter aktivering med LPS, og at IL-10 ikke hadde noen eller bare minimale inhibitoreffekter på IL-10-mRNA-ekspresjon på dette tidspunkt. I motsetning til dette ble ekspresjonen av IL-6- og IL-8-mRNA sterkt inhibert av IL-10. I en annen forsøksserie hvor monocytter ble aktivert i 24 timer med LPS, reduserte imidlertid IL-10 ekspresjonen av IL-10-mRNA sterkt, som vist ved Northern-analyse i figur 12. Figur 12 viser dessuten at aktivering av monocytter med LPS i nærvær av et nøytraliserende anti-v-IL-10-mAb resulterte i en oppregulering av IL-10-mRNA-ekspresjon etter 24 timer. Disse resultatene ble bekreftet av PCR-analyse med IL-10-spesifikke primere ettersom den anvendte RNA i dette sistnevnte forsøk også ble brukt til PCR-analysene vist i figur 10. Det er vist i figur 12B at de kvantitative forskjellene som ble observert i IL-10-mRNA-ekspresjon ved hjelp av Northern-analyse, korrelerte med de som ble observert ved sammenlignende PCR-analyse. I tillegg muliggjorde mer følsom PCR-analyse påvisning av lave nivåer av IL-10-mRNA som ble indusert 24 timer etter dyrking av mono-

cytter i medium alene ved 37°C. Disse resultatene indikerer at IL-10 har autoregulerende effekter på IL-10-mRNA-syntese, og dersom mRNA-nivåer nøyaktig gjenspeiler IL-10-proteinproduksjon, sannsynligvis også på IL-10-produksjon med humanmonocytter. Nedregulering av IL-10-produksjon inntrådte imidlertid ganske sent i aktiveringsprosessen. TGFβ-mRNA som ble uttrykt konstitutivt i nyisolerte, ikke-aktiverte monocytter, ble ikke forøkt ved hjelp av LPS-aktivering i 7 eller 24 timer (figurene 11 og 12). I tillegg viser figurene 11 og 12 at nivåene av TGFβ-mRNA ikke ble påvirket når aktiveringer ble utført i nærvær av IL-4, IL-10 eller nøytraliserende anti-IL-10-mAb-er.

Eksempel B8

IL-10 har autoregulerende effekter på klasse II-MHC-ekspresjon med monocytter

Immunfluorescensanalyse

Celler (10^5) ble inkubert i mikrotiterplater med V-bunn (Flow Laboratories, McLean, VA) med 10 µl renset mAb (1 mg/ml) i 30 minutter ved 4°C. Etter to vaskinger med PBS inneholdende 0,02 mM natriumazid og 1% BSA (Sigma, St. Louis, MO), ble cellene inkubert med 1/40 fortynning av FITC-merkede $F(ab')_2$-fragmenter av geite-anti-muse-antistoff (TAGO, Inc., Burlingame, CA) i 30 minutter ved 4°C. Etter tre tilleggsvaskinger ble de merkede celleprøver analysert ved hjelp av strømningsmikrofluometri på et "FACScan" (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA). Anti-MHC-klasse-II-mAb-ene PdV5.2 (HLA-DR/DP/DQ), Q5/13 HLA-DR/DP og L243 (HLA-DR) var beskrevet tidligere, se Koning et al. (1984), Hum. Immunol., 9, s. 221-___; Quaranta et al. (1980), J. Immunol., 125, s. 1421-1425; og Lampson et al. (1980), J. Immunol., 125, s. 293-___.

IL-10 nedregulerer ekspresjonen av klasse II-MHC-molekyler på celleoverflaten til humanmonocytter. IL-10 ble påvist å nedregulere konstitutivt IL-4- eller IFNγ-indusert ekspresjon av MHC av klasse II. Ettersom monocytter produserer høye nivåer av IL-10 etter aktivering med LPS, ble det undersøkt hvorvidt endogent IL-10 kunne inhibere klasse II-MHC-ekspresjon ved hjelp av LPS-aktiverte monocytter. Monocytter ble aktivert ved forskjellige konsentrasjoner av LPS i nærvær

eller fravær av nøytraliserende anti-IL-10-mAb. Figur 13 viser at aktivering av monocytter med LPS reduserte den konstitutive HLA-DR/DP-ekspresjon på disse cellene på en doseavhengig måte. I nærvær av det nøytraliserende anti-IL-10-mAb-19F1 ble det imidlertid observert sterk induksjon av HLA-DR/DP-ekspresjon. Identiske resultater ble oppnådd med flere HLA-DR- eller HLA-DR/DP-spesifikke mAb. Disse resultatene indikerer at endogent produsert IL-10 er, på en autoregulatorisk måte, ansvarlig for nedreguleringen av klasse II-MHC-ekspresjon på humanmonocytter etter LPS-aktivering.

UNDERSØKELSE C. IL-10 inhiberer cytokinproduksjon ved hjelp av aktiverte makrofager

Dataene presentert i dette avsnittet, ble publisert etter prioritetsdatoen i Fiorentino et al. (1991), J. Immunology, 147, s. 3815-3822.

Oppsummering

IL-10 inhiberer evnen til makrofag-, men ikke B-celleantigenpresenterende celler (APC) når det gjelder å stimulere cytokinsyntese ved hjelp av Th1-T-cellekloner. De direkte effektene av IL-10 på både makrofagcellelinjer og normale peritonealmakrofager ble undersøkt. LPS-indusert (eller LPS- og IFNγ-indusert) produksjon av IL-1-, IL-6- og TNFα-proteiner ble betydelig inhibert med IL-10 i to makrofagcellelinjer. Dessuten synes IL-10 å være en sterkere inhibitor for monokinsyntese enn IL-4 når den ble tilsatt ved lignende konsentrasjoner. LPS- eller LPS- og IFNγ-indusert ekspresjon av IL-1α-, IL-6- eller TNFα-mRNA ble også inhibert med IL-10, som vist ved hjelp av halvkvantitativ PCR- eller Northern-blotanalyse. Inhibering av LPS-indusert IL-6-sekresjon med IL-10 var mindre markert i FACS-rensede peritonealmakrofager enn i makrofagcellelinjene. IL-6-produksjon med peritonealmakrofager ble imidlertid forøkt ved tilsetning av anti-IL-10-antistoffer, noe som tyder på tilstedeværelsen i disse kulturene av endogent IL-10 som resulterer i en intrinsisk reduksjon av monokinsyntese etter LPS-aktivering. LPS-stimulerte peritonealmakrofager ble dessuten påvist å produsere direkte IL-10 påvisbart ved hjelp av ELISA. IFNγ ble funnet å øke IL-6-prod-

uksjon ved hjelp av LPS-stimulerte peritonealmakrofager, og dette skriver seg sannsynligvis fra suppresjonen av IL-10-produksjon med denne samme populasjon av celler. I tillegg til dets effekter på monokinsyntese induserer IL-10 også en betydelig endring i morfologi hos IFNγ-stimulerte peritonealmakrofager. Den sterke virkning av IL-10 på makrofagene, særlig på monokinproduksjonsnivået, indikerer en viktig rolle for dette cytokinet, ikke bare i reguleringen av T-celleresponser, men også ved akutte, inflammatoriske responser.

IL-10 ble først beskrevet som et cytokin fremstilt ved hjelp av Th2-T-hjelpercellekloner som inhiberer makrofag-APC-avhengig cytokinsyntese med Th1-T-hjelperceller, og utviser pleiotrope effekter på forskjellige andre celler og fremstilles ved hjelp av andre celler. Th1-celler utskiller IL-2 og IFNγ og induserer fortrinnsvis makrofagaktivering og forsinket type hypersensitivitet (DTH), mens Th2-celler produserer IL-4 og IL-5 og gir hjelp til B-celleresponser. Når de først er aktivert, vil hver type av Th-celle være i stand til å regulere proliferasjonen og/eller funksjonen av den andre. Slik kryssregulering formidles ved hjelp av forskjellige cytokiner og gir en forklaring på den observasjon at noen antistoff- og DTH-responser kan være gjensidig utelukkende. IL-10 virker på makrofagen, men ikke på B-cellen, for inhibering av cytokinsyntese med Th1-kloner, og IL-10 utøver en direkte effekt på makrofager.

Makrofagprodukter, slik som IL-1, IL-6 og TNFα, har vært implisert i mange inflammatoriske og immunologiske responser utløst under infeksjon eller vevsskade. TNFα og IL-1 er endogene pyrogener som i tillegg forårsaker et antall metabolske endringer hos flere forskjellige celletyper. IL-1 og IL-6 er dessuten de viktigste induksjonsmidlene for syntesen av hepatiske akuttfaseproteiner. De følgende eksempler viser at IL-10 inhiberer produksjonen av cytokiner, slik som IL-1, TNFα og IL-6, ved LPS-aktiverte makrofager. IL-10 spiller således en viktig rolle i inflammatoriske responser ved å regulere makrofagfunksjon i tillegg til dets rolle i T-celleaktivering.

Eksempel C1

IL-10 inhiberer APC-funksjon til forskjellige makrofag-linjer

Cytokiner

Renset, rekombinant mIL-1α ble erholdt som en generøs gave fra P. Lomedico, Hoffman-La Roche, Nutley, NJ. Rekombinant mIL-2 og mIFNγ ble erholdt fra Schering Research, Bloomfield, NJ. Rekombinant, renset muse-IL-6, vennligst tilveiebrakt av M. Pearce, DNAX, ble uttrykt i Cos 7-celler og immunaffinitetsrenset. Muse-TNFα ble erholdt fra Genzyme Corporation (Boston, MA). Rekombinant muse-IL-10 (CSIF), erholdt ved å transfektere COS7-celler med F115-cDNA-klonen som beskrevet ovenfor, og kontrollsupernatanter fra skinntransfekterte celler, ble brukt ved 2% sluttkonsentrasjon med mindre annet var angitt. Alternativt ble rekombinant muse-IL-10, vennligst tilveiebrakt av Warren Dang, uttrykt i *E. coli* og affinitetsrenset under anvendelse av SXC2-anti-IL-10-antistoffet.

Antistoffer

Nøytraliserende, monoklonale antistoffer (mAb-er) mot IFNγ (XMG1.2) og IL-10 (SXC1) ble brukt, se Cherwinski et al. (1987), J. Expt'l Med., 166, s. 1229-1244; og Mosmann et al. (1990), J. Immunol., 145, s. 2938-2945. J5, en isotypetilpasset kontroll for SXC-1, ble vennligst tilveiebrakt av Robert Coffman (DNAX). Monoklonale antistoffer mot IL-6 (20F3 og 32C11), se Starnes et al. (1990), J. Immunol., 145, s. 4185-4191, og mot TNFα (MP6.XT3.11 og XT22.11) ble renset og generøst tilveiebrakt av John Abrams (DNAX). Antistoffer anvendt for FACS-sortering, omfattet rotte-anti-muse-B220 (RA3-6B2), se Coffman et al. (1981), Nature, 289, s. 681-683, og rotte-anti-muse-Mac-1 (M1/70), se Springer et al. (1978), Eur. J. Immunol., 8, s. 539-542. Det monoklonale rotte-anti-muse-antistoff mot Fc-gR var 2.4G2, se Unkeless (1979), J. Expt'l Med., 150, s. 580-596.

Medier

Analysemedium (cRPMI) besto av RPMI 1640 (J.R.

Scientific Inc., Woodland, CA) med 10% varmeinaktivert kalvefosterserum (FCS) (J.R. Scientific Inc.), 0,05 mM 2-ME (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) og 10 mM Hepes-buffer (Gibco Laboratories, Grand Island, NY). For T-cellevekst ble rekombinant mIL-2 (330 U/ml) tilsatt til cRPMI.

Antigener

Nøkkelhullalbuskjellhemocyanin (KLH) erholdt fra Pacific Bio-Marine Laboratories, Inc. (Venice, CA) eller Cal-Biochem Labs (La Jolla, CA), ble brukt ved en sluttkonsentrasjon på 100-500 µg/ml, og ovalbumin fra Sigma ble brukt ved en sluttkonsentrasjon på 1 mg/ml.

Cellelinjer

Th1-klonen, HDK1, (spesifikk for I-A^d/KLH), se Cherwinski et al. (1987), J. Expt'l Med., og T-cellehybridomet DO11-10, (spesifikt for I-A^d/ovalbumin), se Kappler et al. (1981), J. Expt'l Med., 153, s. 1198-___, ble brukt til inhiberingsanalysen for cytokinsyntesen (CSIF). Th2-klonen, D10.G4.1 (D10), AKR/J-anti-conalbumin, erholdt fra C. Janeway (Yale University, New Haven, CT), se Kaye et al. (1983), J. Expt'l Med., 153, s. 836-856, ble brukt til en IL-1-analyse, se Suda et al. (1989), J. Immunol. Methods, 120, s. 173-178. Alle klonene ble holdt ved periodisk stimulering med antigen (Ag) og bestrålt APC, etterfulgt av dyrking i IL-2-holdig medium, se Cherwinski et al. (1987), J. Expt'l Med. Den klonede 1G.18.LA-makrofagcellelinje (H-2^d) ble avledet fra thymusstromacellekulturene og holdt i 20% L-cellesupernatant. PU5.1-makrofagcellelinjen (H-2^d), se Ralph et al. (1977), J. Immunol. Methods, 119, s. 950-954, ble erholdt i cRPMI med 10% FCS. For anvendelse som APC ble 1G.18.LA- og PU5.1-cellelinjene aktivert i 20-24 timer med IFNγ (0,5-2 ng/ml). WEHI.164.13-cellelinjen som er ansvarlig for TNFα og TNFβ, se Espevik et al. (1986), J. Immunol. Methods, 65, s. 55-63, ble holdt i cRPMI/5% FCS.

Immunometriske analyser med hensyn på cytokiner

Cytokinnivåer (IL-6, IFNγ og CSIF/IL-10) ble målt i et toseters sandwich-ELISA-format.

Bioanalyser

En kolorimetrisk MTT-proliferasjonsanalyse ble brukt for TNFα- (WEHI 164.13-celler), IL-2- (HT-2-celler) og IL-1- (D10-celler) (10^4 celler/brønn for alle analyser) bioanalyser. Aktivitet uttrykkes enten som enheter/ml i forhold til en kjent standard, eller pg eller ng/ml. I hvert tilfelle representerer én enhet pr. ml mengden av et bestemt cytokin som gir 50% av den maksimale respons av den bioanalysen.

Induksjon og måling av Th1-cytokinsyntese

1-5 X 10^4 Th1, HDK.1-celler, eller DO-11.10-T-cellehybridomceller ble kombinert med varierende antall levende APC i nærvær eller fravær av antigen i 96-brønners flatbunnede mikrotiterbeholdere ved et totalvolum på 200 µl/brønn. Nivåer av cytokiner ble målt i supernatanter etter 20 eller 48 timer.

Stimulering av makrofagcellelinjer

Makrofagcellelinjene 1G.18.LA og PU 5.1 ble innhøstet ved forsiktig skraping, vasket og på nytt oppslemmet i cRPMI/5% FCS ved 10^6 celler/ml i 9,5 cm vevskulturskåler (Becton Dickinson, NJ), ved 37°C i 5% CO_2/95% luft, i 6 timer for RNA-ekspresjon, eller 24 timer for cytokinpåvisning i supernatantene. Stimulering med LPS skjedde ved 10 µg/ml, eller i noen tilfeller LPS og IFNγ ved 100 enheter/ml, i nærvær eller fravær av IL-10 (200 enheter/ml) eller IL-4 (200 enheter/ml). Supernatanter ble samlet opp, sentrifugert (800 x g) og lagret ved -80°C, og så brukt til analysenivåer for IL-1, IL-6 eller TNFα. I tillegg ble makrofagcellelinjene stimulert med IFNγ i 24 timer som ovenfor, og i noen tilfeller ytterligere stimulert i 24 timer i nærvær av Th1-klonen, HDK.1 og dens spesifikke antigen-KLH. I dette tilfellet ble supernatantene ytterligere konsentrert under anvendelse av et "Amicon"-filter med en membran med molekylvektgrense 10.000, og IL-2 og IFNγ ble fjernet under anvendelse av immunoaffinitetskolonner. Disse supernatantene og gjennomstrømningene fra konsentrasjonstrinnet ble så testet med hensyn på evne til å kostimulere antigenspesifikk og APC-avhengig Th1-cytokinsyntese. For anvendelse som APC ble i tillegg makrofagcellelinjene 1G18.LA og PU5.1 først aktivert i 20-24 timer med IFNγ

(0,5-2 ng/ml).

IL-10 vil inhibere APC's evne til å stimulere IFNγ-produksjon med Th1-celler når normale peritoneal- eller miltmakrofager eller makrofagcellelinjen 1G18.LA ble brukt som APC. IL-10 er også effektivt på PU5.1-makrofaglinjen som har en annen opprinnelse enn 1G18.LA (figur 14), selv om stimuleringen som ble oppnådd under anvendelse av PU5.1-cellelinjen som APC for Th1-celler ikke var så stor som den som ble observert med 1G18.LA-makrofagcellelinjen. Figur 14B viser at 1G18.LA-cellelinjen også kan formidle antigenspesifikk induksjon av IL-2-produksjon både med Th1-klonen og det ovalbuminspesifikke T-cellehybridom DO11.10. Begge stimuleringer ble signifikant inhibert av IL-10.

Eksempel C2

IL-10 induserer en morfologisk endring hos IFNγ-stimulerte peritonealmakrofager

Rensing og stimulering av peritonealmakrofager

Peritonealceller ble erholdt ved injeksjon og fjerning av 7 ml kald cRPMI/10% FCS, og makrofager ble sortert på grunnlag av Mac-1 og B220 (makrofager er Mac-1^{+} ^{lys}; B220^{-}). Cellene ble stimulert med 10 µg/ml LPS i nærvær eller fravær av IL-10, monoklonale anti-IL-10-antistoffer eller IFNγ. Supernatanter ble samlet opp etter inkubasjon i 20 timer, ved 8 x 10^5 celler/ml, i en fuktig atmosfære med 5% CO_2 ved 37°C. Supernatantene ble analysert med hensyn på TNFα og IL-6 under anvendelse av en enzymbundet, immunologisk analyse.

FACS-rensede peritonealmakrofager ble inkubert med IFNγ i nærvær eller fravær av IL-10 i forskjellige tidsrom. Supernatanter ble så fjernet, cellene lufttørket, fiksert og farget med Wright's-Giemsa. Som vist i figur 15, induserer IL-10 avrunding av cellene og opphevelse av adherens, noe som kan være av betydning med hensyn til inhiberingen av makrofag-APC-funksjon.

Eksempel C3

IL-10 nedregulerer produksjon av biologisk aktive eller utskilte cytokiner hos aktiverte makrofagcellelinjer

Tidligere funn tyder på at IL-10 har en direkte

effekt på makrofagers evne til å virke som APC og aktivere Th1-cytokinsyntese. Den direkte effekt av IL-10 på monokinproduksjon hos disse makrofagcellelinjene ble testet. Supernatanter samlet opp fra makrofagcellelinjer stimulert med IFNγ, LPS eller IFNγ pluss LPS, i nærvær eller fravær av IL-10, ble testet med hensyn på deres nivåer av cytokin(er). Når det var mulig, ble IL-4 brukt som en kontroll ettersom denne faktor er blitt påvist å inhibere cytokinproduksjon med aktiverte makrofager. Stimulering av makrofagcellelinjene med IFNγ alene induserte ikke påvisbare nivåer av monokinene, IL-1, IL-6 eller TNFα i supernatantene. I motsetning til dette induserte LPS, eller LPS pluss IFNγ, signifikant nivåer av disse cytokiner (figur 16). D10.G4.1-analysen brukt til å påvise IL-1, utført i fravær av Concanavalin A (ConA), påviser ikke andre cytokiner uttrykt av makrofager. 1G.18.LA- og PU5.1-makrofagcellelinjene ble begge signifikant inhibert med hensyn til sin evne til å produsere IL-1-bioaktivitet etter induksjon med LPS (figur 16). IL-10 har også en svært signifikant inhibitoreffekt på LPS-, eller IFNγ- pluss LPS-indusert produksjon av TNFα i supernatantene fra begge makrofagcellelinjene, som vist i WEHI.164.13.-bioanalysen (all aktiviteten i disse makrofagsupernatantene ble påvist å kunne tilskrives TNFα ved å bruke et bestemt blokkeringsantistoff). Likeledes inhiberer IL-10 produksjonen av IL-6-protein med makrofagcellelinjene, stimulert med IFNγ pluss LPS og/eller LPS indusert som målt i den enzymbundne immunologiske analyse for IL-6. I alle forsøkene som ble gjort, hadde IL-10 en mye mer signifikant inhibitoreffekt enn IL-4 på LPS- eller IFNγ- pluss LPS-indusert monokinproduksjon (på proteinnivået).

Eksempel C4

IL-10 nedregulerer cytokin-mRNA-ekspresjon hos aktiverte makrofager

RNA-ekstraksjon og analyse av RNA

Totalt celle-RNA ble ekstrahert fra makrofagcellelinjene under anvendelse av en guanidiniumisotiocyanatfremgangsmåte. Konsentrasjonen av RNA ble målt ved absorpsjon ved 260 nm. RNA-blotanalyse var som beskrevet i Moore et al. (1990), Science, 248, s. 1230-1234, eller PCR av revers-

transkribert RNA, se O'Garra et al. (1990), Intn'l Immunol., 2, s. 821-832. En bestemt mengde av hver cDNA-prøve (fortynninger på 1/20 av cDNA) ble amplifisert med 2,5 enheter Thermalase (*Thermus aquaticus*-DNA-polymerase) (IBI) og et Cetus/Perkin-Elmer "thermocycler" under de følgende betingelser: 94°C smelting, 30 s; 55°C annealering, 30 s; og 72°C forlengelse, 1 minutt, ved bruk av spesifikke primere for HPRT ("husholdningsenzym"), TNFα og IL-6 som vist: HPRT-"sense": 5'-GTA ATG ATC AGT CAA CGG GGG AC-3' (nt 422-444); HPRT-anti-"sense": 5'-CCA GCA AGC TTG CAA CCT TAA CCA-3' (nt 598-575); HPRT-probe: 5'-GCT TTC CCT GGT TAA GCA GTA CAG CCC C-3' (nt 543-570); TNFα-"sense": 5'-GCG ACG TGG AAC TGG CAG AAG-3' (nt 4499-4519); TNFα-anti-"sense": 5'-GGT ACA ACC CAT CGG CTG GCA-3' (nt 5865-5845); TNFα-probe: 5'-CAG TTC TAT GGC CCA GAC CCT C-3' (nt 5801-5821); IL-6-"sense": 5'-CCA GTT GCC TTC TTG GGA CTG-3' (nt 1520-1540); IL-6-anti-"sense"; 5'-GGT AGC TAT GGT ACT CCA-3' (nt 6093-6075); IL-6-probe: 5'-GTG ACA ACC ACG GCC TTC CCT ACT-3' (nt 1547-1570).

Alle primerne spente over mellomliggende sekvenser i genet. Sensitivitet og spesifisitet ble ytterligere forøkt ved å prøve "dot blots" av de amplifiserte produkter med radioaktivt merkede (^{32}-P, γ-ATP) oligonukleotider innenfor det amplifiserte produkt. Radioaktive flekker ble kvantifisert under anvendelse av "Ambis Image Scanner" og visualisert ved å eksponere mot røntgenfilm. I hvert tilfelle ble en standardkurve for P388D1-RNA tatt med for å sikre reproduserbarhet av analysen, og tilfeldig valgte enheter i forhold til pg for tilført RNA ved en endelig "dot blot" ble erholdt fra den. I tillegg ble det brukt en intern standard for husholdningsenzymet HPRT for å sikre at nøyaktig den samme mengde RNA ble brukt, og at alle prøvene ble reverstranskribert og amplifisert med PCR ved den samme virkningsfullhet.

RNA ble ekstrahert fra makrofagcellelinjene, 1G18.LA og PU5.1, 6 timer etter stimulering med LPS eller LPS og IFNγ, i nærvær eller fravær av IL-10 eller IL-4. RNA-flekkanalyse av 10 µg total-RNA avslørte at IL-10 nedregulerer ekspresjon av TNFα-RNA, indusert med LPS eller IFNγ pluss LPS, i begge cellelinjene (figur 17), riktignok i en mindre utstrekning i

det sistnevnte tilfellet. Dette ble bekreftet under anvendelse av en halvkvantitativ PCR-metode for analysering av revers-transkribert RNA fra begge cellelinjene. Ved å ta med en standardkurve for hvert cytokin som beskrevet i tabell C1, var det mulig å oppnå vilkårlige enheter i forhold til pg totalt standard-RNA representert i hver flekk, og således presentere dataene i nummerorden. Tabell C1 viser at IL-10 og IL-4 inhiberer LPS- og IFNγ- pluss LPS-indusert ekspresjon av TNFα i 1G18.LA-makrofagcellelinjen. Dette illustreres best med verdier oppnådd fra den lineære del av standardkurven, og teksten til tabell C1 forklarer metoden som ble brukt for å utlede de numeriske data. Analyse av RNA-ekspresjon med PU5.1-makrofagcellelinjen som respons på LPS og IFNγ pluss LPS, under anvendelse av den samme metode, viste at ekspresjon av IL-6 og TNFα også ble inhibert med IL-10 (tabell C2).

TABELL C1

TABELL I

Inhibering av LPS-indusert TNFα-ekspresjon i 1G18.LA-makrofagcellelinje med IL-10 og IL-4[a]

Stimulus	cDNA-fortynningsfaktor	0		IL-4			IL-10		
		cpm	*pg RNA	cpm	*cpm	*pg RNA	cpm	*cpm	*pg RNA
LPS+IFNγ	1:9	1260	300	1987	2682	Plateau	1232	1034	200
	1:27	984	160	601	769	110	713	589	90
	1:81	722	110	110	332	57	411	312	50
LPS	1:9	1114	210	210	1587	330	1387	1068	200
	1:27	896	120	120	403	60	460	271	45
	1:81	472	72	72	403	60	310	220	33

[a]1G18.LA-makrofagcellelinjen ble stimulert som i figur 3. Supernatanter ble fjernet etter 6 timer, og guanidiniumisotiocyanatoppløsning ble tilsatt for innhøsting av cellene for RNA-fremstilling. 1 mikrogram total-RNA fra 1G18.LA-makrofagcellelinjen ble reverstranskribert i totalt 20 µl. Fortynninger ble gjort av cDNA (vist i figuren), og 1 µl av hver fortynning ble amplifisert med PCR med spesifikke primere for HPRT (intern standard) eller TNFα. 10 µl av det amplifiserte cDNA-produkt ble "dot-blotted" og prøvd videre med hver respektiv, radioaktivt merket probe (innenfor primerne). Det påviste signal ble målt med bruk av en Ambis bildescanner. For hver fortynning ble den ubearbeidede cpm for TNFα standardisert (*cpm) ifølge en korreksjonsfaktor (*) erholdt fra HPRT-cpm i forhold til "0"-prøven (dvs. intet IL-10 eller IL-4). Tilfeldige enheter, i forhold til en titrering av den positive kontroll, og korrigert for innholdet av HPRT (*pg RNA/flekk), kunne så bestemmes ved å bruke en standardkurve (ikke vist).

TABELL C2

Virkningsmekanisme for IL-10

TABELL II

IL-10 inhiberer LPS-indusert ekspresjon av RNA som koder for IL-6 og TNFα i PU5.1-makrofagcellelinjen[a]

Cytokin-RNA-testet	Stimulus							
	LPS+IFN-γ				LPS			
	+0		+IL-10		+0		+IL-10	
	cpm	*pg RNA	cpm	*pg RNA	cpm	*pg RNA	cpm	*pg RNA
TNF-α	1031	370	587	80	1864	730	469	23
IL-6	589	1000	207	700	108	90	27	44

[a]Prøver av PU5.1 ble behandlet hovedsakelig som beskrevet i tabell I og analysert med hensyn på HPRT-, TNFα- og IL-6-nivåer. Den ubehandlede cpm vist ovenfor, ble først korrigert etter nivåene av HPRT pr. prøve som beskrevet i tabell I. Ved å bruke standardkurvene for kjente mengder av positive kontroller for TNFα eller IL-6, ble en tilfeldig enhet *pg RNA pr. "dot blot" tildelt som beskrevet i tabell I. Verdier for begge TNFα ble erholdt fra en 1 til 27, og IL-6 fra 1 til 9 fortynning av 1 µl cDNA (1 µg RNA ble reverstranskribert i et totalvolum på 20 µl).

Eksempel C5

IL-10 nedregulerer produksjon av IL-6-protein hos LPS-aktiverte peritonealmakrofager

Peritonealmakrofager (sortert på grunnlag av Mac-1 og B220) (makrofagene er Mac-1^{+} $^{(lys)}$; B220^{-}) allerede påvist å bli inhibert av IL-10 for APC-funksjon til Th1-celler, ble testet videre med hensyn på deres produksjon av TNFα og IL-6 som respons på LPS. TNFα var ikke påvisbar i supernatantene fra LPS-stimulerte, FACS-sorterte makrofager (celletetthet 7 x 10^5 celler/ml). I motsetning til dette var signifikante nivåer av IL-6 påvisbare i supernatanter erholdt fra peritonealmakrofager fra BALB/c- eller CBA/J-mus, stimulert med LPS som ovenfor (figur 18). IL-6-nivåer ble redusert dersom celler ble stimulert med LPS i nærvær av IL-10, men overraskende nok var nivået av inhibering mindre markert (figur 18) enn det som ble observert med makrofagcellelinjene (figur 16). Nivået av IL-6-produksjon indusert med LPS, kunne imidlertid økes ved innlemmelsen av et monoklonalt antistoff rettet mot IL-10 ved LPS-stimuleringen (figur 18). At makrofager produserte IL-10 som respons på LPS, ble bekreftet i en spesifikk ELISA for IL-10 (CBA/J- eller BALB/c-peritonealmakrofager stimulert med LPS som ovenfor, produserte henholdsvis 2 enheter/ml eller 4,5 enheter/ml IL-10).

Figur 18 viser også at rensede BALB/c-peritonealmakrofager produserer høyere nivåer av IL-6 når de ble stimulert med LPS i nærvær av IFNγ, i motsetning til når de ble stimulert med LPS alene. Dette kan forklares ved resultatene av et ytterligere forsøk på IL-10-produksjon med peritonealmakrofager fra BALB/c-mus. I dette tilfellet produserte makrofager stimulert med LPS, 12 enheter/ml IL-10, og dette ble redusert til mindre enn 3 enheter/ml dersom cellene ble stimulert med LPS i nærvær av IFNγ.

Eksempel C6

Test med hensyn på en oppløselig kostimulatormekanisme for IL-10-inhibering av makrofag-APC-funksjon

IL-10 vil inhibere Th1-cytokinsyntese bare i nærvær av levende, antigenpresenterende celler (APC) (makrofager). Én mulig mekanisme for IL-10-virkning er undertrykkelse av prod-

uksjon av en oppløselig kofaktor som trengs for optimal cytokinfrigjørelse fra Th1-celler. Supernatanter ble erholdt fra makrofager stimulert med IFNγ, i nærvær eller fravær av Th1-celler og spesifikt antigen. Slike supernatanter (figur 19A), eller gjennomstrømningene frembrakt under deres oppkonsentrering, var ikke i stand til å reversere den IL-10-formidlede inhibering av makrofag-APC-funksjon for Th1-celler. Disse data gir ikke noe bevis på at IL-10 nedregulerer en oppløselig kostimulator påkrevet for Th1-cytokinsyntese. Lignende forsøk gir ikke noe bevis på at IL-10 induserer makrofager til å produsere en oppløselig inhibitorfaktor som virker direkte på T-cellen, selv om en slik inhibitor kan være labil eller membranbundet. For å teste dette ble det utført et cellebland-ingsforsøk på følgende måte. Milt-B-celler og makrofager ble FACS-sortert (på grunnlag av B220 og Mac-1). Graderte doser makrofager, i nærvær eller fravær av B-celler, og også i nærvær eller fravær av IL-10, ble brukt som APC for antigenspesifikk stimulering av HDK.1-celler. Makrofag- men ikke B-celle-stimulering av Th1-cytokinsyntese ble inhibert med IL-10 (figur 19B). Blanding av graderte doser av makrofager med et konstant antall B-celler ga en additiv stimulering av Th1-cytokinsyntese (figur 19B). Tilsetning av IL-10 til denne blandingen av APC brakte imidlertid nivået av Th1-cytokinsyntese bare ned til det nivået som ble oppnådd med B-celle-APC alene, en observasjon som taler mot tilstedeværelsen av en korttids- eller labil inhibitor som virker direkte på Th1-cellen, eller B-celle-APC.

UNDERSØKELSE D. <u>IL-10 beskytter mus mot superantigen-indusert, dødelig sjokk</u>

<u>Oppsummering</u>

Rollen til IL-10 ved beskyttelse mot det dødelige sjokk indusert av stafylokokk-enterotoksin B (SEB) i en musemodell, ble undersøkt. Forbehandling av mus med IL-10 forhindret død av mus senere injisert med SEB og D-galaktosamin (det sistnevnte var nødvendig for å overvinne den naturlige resistens hos mus mot SEB). Denne effekten indikerer at IL-10 er i stand til å inhibere T-celleaktivering *in vivo*, sannsyn-

ligvis gjennom dets evne til å inhibere evnen til makrofager når det gjelder å aktivere T-celler.

Superantigener er T-cellemitogener som aktiverer T-celler på en Vβ-spesifikk måte i en T-cellereseptor (TCR) ved å binde TCR-Vβ-kjeder og β-kjeden i klasse II-MHC-molekyler. Superantigener omfatter endogene molekyler produsert av murine brysttumorvirus og eksogene superantigener som omfatter slike enterotoksiner som de som produseres av *Staphylococcus aureus*. Den giftige effekt av superantigenene avhenger av tilstedeværelsen av antigenpresenterende celler (APC). I de senere år er det blitt erkjent at den giftige effekt av disse toksinene skyldes deres T-celle-mitogene aktivitet, en konklusjon som er blitt vist *in vivo*.

IL-10 er et cytokin som oppviser pleiotrope aktiviteter på mange forskjellige cellelinjer. Disse omfatter: vekstkofaktor for murine T-celler og mastceller, Ia-induksjon i B-celler og evnen til å inhibere T-celleaktivering. Den sistnevnte effekt er blitt påvist å være indirekte, ved å inhibere makrofagenes evne til å virke som APC. Denne effekten synes å være en del av en generell inhibitoreffekt av IL-10 på makrofagfunksjon, inkludert deres evne til å produsere cytokiner som IL-1, TNFα og IL-6.

Ved foreliggende undersøkelse ble det brukt stafylokokkenterotoksin B- (SEB) indusert sjokk hos mus som en modell *in vivo* for T-celleformidlet, dødelig sjokk. Ved denne modellen gjøres mus sensitive overfor de toksiske effekter av SEB ved forbehandling med D-galaktosamin. Denne behandlingen senker den naturlige motstandsevne som mus har mot enterotoksiner, sannsynligvis ved å påvirke leverklaringsmekanismene. Etterfølgende administrering av små doser SEB resulterer i død innen 2 dager. Ved denne modellen påvises toksisitet og skyldes massiv T-celleaktivering hvor T-celleprodusert TNFα-produksjon er blitt påvist å spille en avgjørende rolle. Behandling av musene med IL-10 inhiberer SEB-formidlet toksisitet, sannsynligvis gjennom dets evne til å inhibere makrofagavhengig T-celleaktivering.

Eksempel D1

IL-10 forhindrer SEB-formidlet toksisitet *in vivo*

Mus

4 til 5 uker gamle BALB/c H-2^d-hannmus ble levert av Simonsen Laboratories, Gilroy, California.

Reagenser. Materialene som ble brukt, var: murint interleukin-10 (mIL-10) ble fremstilt ved hjelp av standardfremgangsmåter av Satish Menon hos DNAX Research Institute (Palo Alto, CA). D(+)-galaktosamin (G-0500) ble levert av Sigma, St. Louis, MO. Stafylokokkenterotoksin B (SEB) brukt ved det innledende forsøk, ble også levert av Sigma. SEB brukt ved etterfølgende forsøk, var fra Toxin Technology, Madison, WIS, vennligst levert av P. Hugo (National Jewish Center for Immunology, Denver, CO). Alle materialer ble fortynnet i balansert saltoppløsning.

Behandling

4 til 5 uker gamle hannmus ble injisert (i.p.) med forskjellige konsentrasjoner av mIL-10. 3 til 4 timer senere ble de samme musene injisert (i.p.) med D-galaktosamin. 1 time etter den andre injeksjon ble musene injisert med SEB ved flere forskjellige konsentrasjoner. Musene ble inspisert 24, 36 og 48 timer etter injeksjon.

De innledende forsøk fastslo at IL-10 ville endre toksisiteten av SEB i en musemodell *in vivo*. Foreløpige forsøk ble utformet for å bestemme den minimale dose SEB som var påkrevet for å observere høy dødelighet i denne modellen. Denne dosen varierte avhengig av opprinnelsen (leverandøren) og partielt av SEB. Når denne dosen først var bestemt for et bestemt parti SEB, ble forbehandling med IL-10 (10 µg/mus) testet. Figur 20 viser at forbehandling med IL-10 resulterte i overlevelse av alle mus injisert med 10 µg SEB/mus. Selv om forbehandling med IL-10 ikke forhindret at dyrene som var injisert med 20 µg SEB/mus, døde, forlenget den deres overlevelse.

UNDERSØKELSE E. Interleukin-10 beskytter mus mot dødelig endotoksemi

Oppsummering

IL-10 reduserer produksjon av IL-1, IL-6 og TNFα *in vitro*, og nøytralisering av IL-10 hos mus fører til forøkelse av de samme monokiner. Den foreliggende undersøkelse tester hvorvidt denne monokinundertrykkende egenskap til IL-10 gir evnen til å beskytte mus mot LPS-indusert sjokk, en monokinformidlet betennelsesreaksjon. En eneste injeksjon med 0,5-1 µg rekombinant murin-IL-10 beskyttet BALB/c-mus reproduserbart mot en dødelig, intraperitoneal injeksjon av endotoksin. Dette resultatet ble oppnådd uansett om IL-10 ble administrert samtidig med eller 30 minutter etter injeksjonen av endotoksin. Den beskyttende effekt av IL-10 ble reversert ved tidligere injeksjon av nøytraliserende anti-IL-10-antistoffer og korrelerte med en vesentlig reduksjon i endotoksinindusert TNFα-frigjørelse. Disse data gjør IL-10 til en kandidat for behandling av bakteriell sårbetennelse, og mer generelt til et effektivt antiinflammatorisk reagens.

Alvorlige bakterieinfeksjoner kan resultere i svære fysiologiske endringer, inkludert hypotensjon, feber, vevsnekrose, utbredt organdysfunksjon og til sist død. I tilfellet med gramnegative bakterier skyldes denne toksisiteten endotoksin, en lipopolysakkaridkomponent (LPS-komponent) i bakteriecelleveggen. Injeksjon av passende doser LPS i kaniner, mus og andre dyr gir virkelig endringer som er typiske for sårbetennelsessjokksyndromet, og utgjør således en enkel dyremodell for denne betennelsesreaksjon. Endotoksinindusert toksisitet synes å skyldes frigjørelsen av TNFα, IL-1 og/eller IL-6 fra endotoksinstimulerte makrofager/monocytter, ettersom dyr kan beskyttes mot bakterie- og endotoksinindusert sjokk ved nøytralisering av disse monokinene, under anvendelse av enten monoklonale antistoffer eller en fysiologisk IL-1-antagonist kalt IL-1Ra.

Interleukin-10 (IL-10) har et stort antall egenskaper *in vitro*, inkludert undertrykkelse av IFNγ-produksjon med hjelper-T-celler og NK-celler; vekstkostimulering av tymocytter, mastceller og B-celler; og undertrykkelse av monokinprod-

uksjon. Når det gjelder den sistnevnte egenskap, undertrykker IL-10 i stor grad den induserte produksjon av TNFα, IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8 og GM-CSF med humanmonocytter og museperitonealmakrofager. I motsetning til dette har IL-10 ingen effekt på konstitutiv ekspresjon av TGFβ hos monocytter og oppregulerer faktisk monocyttproduksjon hos IL-1Ra. Disse *in vitro*-data understøttes av forsøk *in vivo* som viser at nøytralisering av IL-10 under anvendelse av bestemte monoklonale antistoffer fører til forhøyede nivåer av TNFα og IL-6 i blodomløpet hos mus. Hvorvidt evnen til IL-10 når det gjelder å undertrykke produksjon av TNFα, IL-1 og IL-6, kombinert med dets evne til å øke IL-1Ra, ville gjøre dette cytokinet i stand til å beskytte mus mot endotoksinindusert sjokk, ble testet.

Eksempel E1

Effekt av IL-10 på dødelig endotoksemi hos mus

Mus

8 uker gamle BALB/c-hunnmus ble erholdt fra Simonsen Laboratories (Gilroy, CA).

Reagenser

Lipopolysakkarid (LPS) fra *Escherichia coli* serotype 0111:B4_ ble innkjøpt fra Sigma Chemical Co. Rekombinant murin-IL-10 ble uttrykt i *E. coli og renset* til høy spesifikk aktivitet med affinitetsrensing og ionebytterkromatografi. Dette materialet inneholdt minimalt med endotoksin og forble stabilt ved 4°C i minst 4 måneder. Den spesifikke aktivitet til murint IL-10 ble evaluert i både cytokinsynteseinhiberingsanalysen, se Fiorentino et al. (1989), J. Expt'l. Med., 170, s. 2081-2095, og MC/9-mastcelle-kostimuleringsanalysen, se Thompson-Snipes et al. (1991), J. Exp. Med., 173, s. 507-510. I forsøk med nøytraliserende antistoff ble det benyttet 2A5, et monoklonalt rotte-IgG1-anti-muse-IL-10-antistoff, eller et isotypekontrollantistoff betegnet GL113.

TNFα-analyse

Serumnivåer av TNFα ble evaluert ved å bruke en cytokinspesifikk ELISA.

Grupper à 20 BALB/c-mus ble injisert intraperitonealt med enten en dødelig dose LPS alene, eller den samme mengde LPS sammen med varierende mengder rekombinant murin-IL-10. I flere forsøk av denne type ble mus fullstendig beskyttet mot død som skrev seg fra LPS-indusert sjokk, når enten 0,5 µg, 1,0 µg eller 10 µg IL-10 ble administrert til dyret samtidig med LPS (figur 21). I noen av disse forsøkene ble det også observert delvis beskyttelse hos mus som fikk 0,1 µg eller 0,05 µg IL-10 samtidig med LPS-administrering (figur 21).

Eksempel E2

Nøytralisering av beskyttelse ved hjelp av anti-IL-10-antistoffer

IL-10-formidlet beskyttelse mot dødelig endotoksemi kunne blokkeres ved forutgående administrering av nøytraliserende anti-IL-10-antistoffer, men ikke med et isotypekontrollantistoff (figur 22), noe som bekrefter spesifisiteten ved denne effekten.

Eksempel E3

Forsinket administrering av IL-10 forblir effektiv i beskyttelse

En kinetikkundersøkelse avslørte at IL-10-formidlet beskyttelse mot dødelig endotoksemi ble oppnådd selv dersom IL-10 ble administrert 30 minutter etter LPS-injeksjonen (figur 23). Ytterligere forsinkelser i IL-10-administrering reduserte imidlertid beskyttelse vesentlig, og ingen beskyttelse ble observert når IL-10 ble administrert 5 timer etter LPS-injeksjonen (figur 23).

Eksempel E4

Effekt på TNFα av IL-10

Dødelig endotoksemi er en uønsket monokinformidlet betennelsesreaksjon. IL-10 er blitt påvist å undertrykke monokinproduksjon ved hjelp av aktiverte makrofager og monocytter

in vitro, noe som tyder på at den ovenfor nevnte IL-10-formidlede beskyttelse gjenspeiler en undertrykkelse av monokinproduksjon ved den endotoksininduserte respons. Sera samlet opp 1, 2 og 3 timer etter LPS- ± IL-10-injeksjon, indikerte virkelig en svært sterk reduksjon i TNFα-nivåer i blodomløpet til dyr beskyttet med IL-10. Ettersom anti-TNF-antistoffer likeledes beskytter mus mot dødelig endotoksemi, er det sannsynlig at IL-10-indusert undertrykkelse av TNFα minst bidrar til beskyttelsen som dette cytokinet gir mot dødelig endotoksemi. Andre effekter av IL-10 på makrofag/monocytt-funksjon, kan også bidra til dets evne til å beskytte mot dødelig endotoksemi. Undersøkelser *in vitro* har indikert at IL-10 ikke bare undertrykker IL-1 og IL-6, men oppregulerer IL-1Ra, følger som også vil beskytte mot dødelig endotoksemi, som antydet av rapporter hvor det brukes nøytraliserende anti-cytokinantistoffer, eller direkte IL-1Ra-administrering.

UNDERSØKELSE F. Kontinuerlig anti-interleukin-10-antistoff-administrering fjerner Ly-1-B-celler, men ikke vanlige B-celler fra mus

Oppsummering

Ly-1-B-celler har den særegne egenskap med kontinuerlig selvkomplettering og kan videre skjelnes fra vanlige B-celler på grunnlag av svært forhøyet konstitutiv og induserbar produksjon av det nylig beskrevne cytokin-interleukin-10 (IL-10). Hvorvidt IL-10 virker enten som en autokrin eller parakrin vekstfaktor for Ly-1-B-celler, ble testet ved å behandle mus kontinuerlig fra fødselen av inntil 8 ukers alder med et monoklonalt rotte-IgM-antistoff som spesifikt nøytraliserer muse-IL-10. Mus behandlet på denne måte, manglet Ly-1-B-celler i peritoneum, inneholdt svært reduserte nivåer av serum-immunglobulin M og var ute av stand til å frembringe signifikante antistoffresponser *in vivo* mot intraperitoneale injeksjoner av α1,3-dekstran eller fosforylcholin, antigener som spesifikke B-celler befinner seg i Ly-1-B-celleundersettet for. I motsetning til dette var vanlige milt-B-celler fra anti-IL-10-behandlede mus normale med hensyn til totalantall, fenotype og evne til å gi respons *in vitro* mot B-celle-

mitogener og det thymusavhengige antigen trinitrofenyl-nøkkelhullalbuskjellhemocyanin (TNP-KLH). Mekanismen for Ly-1-B-celleuttømming syntes å være forbundet med forhøyelse av endogene interferon-γ-nivåer (IFNγ-nivåer) hos anti-IL-10-behandlede mus, ettersom samadministrering av nøytraliserende anti-IFNγ-antistoffer i vesentlig grad gjenopprettet antallet Ly-1-B-celler som befant som i peritoneum hos disse musene. Disse resultatene impliserer IL-10 som en regulator for Ly-1-B-celleutvikling og identifiserer en fremgangsmåte for spesifikt å fjerne Ly-1-B-celler, hvorved ytterligere evaluering av rollen til disse cellene i immunsystemet muliggjøres.

Ly-1-B-celler omfatter ca. 2% av det totale antall B-celler i en voksen mus og oppviser flere interessante egenskaper som skilte dem fra vanlige B-celler: (a) selv om de knapt er påvisbare i de fleste primære og sekundære lymfoidvev, er de svært anriket i peritoneal- og pleuralhulene, noe som også gjelder for deres avkom i lymfoidvev i forbindelse med tarmen; (b) de utvikles og dominerer i tidlig ontogenese og er så selvkompletterende for dyrets levetid; (c) de produserer et begrenset repertoar av lavaffinitetsantistoffer som er svært kryssreaktive med selvdeterminanter og synes ikke å modnes ved hjelp av somatisk mutasjon; og (d) de genererer mesteparten av IgM-antistoffet som finnes i serum og produserer hele antistoffresponsen som utløses av flere bakteriedeterminanter, slik som fosforylcholin og α1,3-dekstran. Selv om deres nøyaktige roller i immunsystemfunksjon er uklar, omfatter de forskjellige modellene som er blitt fremsatt, basert på spesifisitetene til antistoffer produsert av Ly-1-B-celler, roller i antibakteriell immunitet; i fjerning av vertscellerester, slik som aldrende erytrocytter; og i modulering av antistoffrepertoaret under utvikling. Vårt nylige funn at Ly-1-B-celler er sterke produsenter av IL-10, et immunologisk undertrykkende cytokin som nedregulerer produksjon av flere monokiner og T-celleavledede cytokiner, fremsetter muligheten for en bredere immunregulerende rolle for Ly-1-B-celler. Mange av disse skillende trekk er vanskelige å evaluere hos mennesker, men en populasjon av Ly-1-bærende human-B-lymfocytter med be-slektede egenskaper er blitt identifisert.

Eksempel F1

Kontinuerlig IL-10-nøytralisering fjerner Ly-1-B-celler fra mus

Mus

Drektige BALB/c-mus og C3H/HeJ-mus midt i drektighetsperioden ble erholdt fra Simonsen Laboratory (Gilroy, CA).

Anti-IL-10-behandling

5-10 alderstilpassede BALB/c-mus ble injisert intraperitonealt tre ganger pr. uke fra fødselen av og inntil 8 ukers alder med det nøytraliserende rotte-IgM-anti-muse-IL-10-antistoff betegnet SXC.1 (0,2 mg/injeksjon i uke 1, 0,5 mg/-injeksjon i uke 2, 1,0 mg/injeksjon i ukene 3 til 8), ekvivalente mengder av en isotypekontroll betegnet J5/D, eller ekvivalente volumer (100 eller 200 µl) fosfatbufret saltoppløsning (PBS). Ubehandlede, alderstilpassede BALB/c-mus ble tatt med i alle forsøkene for sammenligning. SXC.1- og J5/D-antistoffene ble erholdt fra serumfrie hybridomsupernatanter og renset ved hjelp av to sekvensvise 35% ammoniumsulfatutfellingstrinn. Ved noen forsøk fikk mus lignende mengder av et separat rotte-IgG1-anti-muse-IL-10-antistoff betegnet 2A5 eller dets isotype, kontroll GL113. Disse sistnevnte antistoffene ble administrert intraperitonealt ved 0,5 mg/injeksjon i uke 1, 1 mg/injeksjon i uke 2, 2 mg/injeksjon i ukene 3 til 8.

Immunfluorescens

Vaskede celler ble merket med kombinasjoner av de følgende reagenser: fluoresceinert anti-muse-IgM-antistoff (DS-1; Pharmingen, San Diego, CA); biotinylert rotte-anti-muse-IgD-antistoff (11-26c) fremstilt av J. Kearney); fluoresceinert anti-muse-CD3-antistoff (145-2C11, Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN); Caltag Labs., South San Francisco, CA). Biotinylerte reagenser ble brukt sammen med fykoerytrin-konjugert streptavidin (Becton Dickinson & Co., Mountain View, CA). Celler ble analysert under anvendelse av et "FACScan", og døde celler ble utelukket på grunnlag av forkant- og sidespredning. Resultatet viser fluorescensstyrkene på 5.000 levende celler tellet fra hver forsøksgruppe.

Antistoff-ELISA-er

Serumprøver samlet opp etter 8 ukers behandling, ble analysert med hensyn på tilstedeværelsen av muse-IgM under anvendelse av en sandwich-ELISA hvor rotte-anti-muse-IgM (R8-103, Pharmingen) ble belagt ved 5 µg/ml på PVC-mikrotiterplater, fortynninger av serumprøver eller en blanding av flere rensede myelom-muse-IgM-proteiner som standard, ble tilsatt, og immunkompleksene ble deretter påvist ved å bruke biotinylert rotte-anti-muse-IgM (R19-15, Pharmingen) og avidinkonjugert pepperrotperoksidase (CalBiochem Corp., La Jolla, CA), pluss 1 mg/ml substrat (2,2'-azinobis-[3-etylbenztiazolinsvovelsyre]; Sigma Chemical Corp.).

Spesifikke antistoffresponser mot fosforylcholin og α1,3-dekstran ble bestemt etter utfordring av anti-IL-10- eller kontrollmus intraperitonealt med 0,5 ml saltoppløsning, 50 µg α1,3-dekstran utledet fra *Leuconostoc mesenteroides* tilveiebrakt av dr. Slodki (U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service), eller 2 x 10^8 varmedrepte *Streptococcus pneumoniae* som en kilde for fosforylcholin. Sera ble samlet opp fra alle mus 7 dager senere og analysert med hensyn på spesifikt antistoff mot α1,3-dekstran eller fosforylcholin under anvendelse av ELISA-er. Spesifikke antistoffresponser mot TNP-KLH ble bestemt etter utfordring av mus intraperitonealt med 10 µg TNP-KLH, og oppsamling av sera 7 dager senere for IgM-analyse, og 10 og 14 dager senere for IgG-analyse. TNP-spesifikke antistoffer ble kvantifisert under anvendelse av en ELISA. I alle tilfeller ble anti-IL-10-behandling fortsatt mellom antigenutfordring og seraoppsamling.

IFNγ-ELISA

Serumprøver samlet opp fra anti-IL-10-behandlede eller kontrollmus, ble analysert med hensyn på murin-IFNγ under anvendelse av en cytokinspesifikk ELISA.

Hann- og hunn-BALB/c-mus ble injisert tre ganger ukentlig fra fødselen av og til 8 ukers alder med graderte doser av et nøytraliserende rotte-IgM-anti-muse-IL-10-mAb betegnet SXC.1, og deretter analysert med hensyn på Ly-1-B-celleantall og -funksjon. Kontrollgrupper med alderstilpassede

BALB/c-mus som ikke fikk noen behandling eller ekvivalente injeksjoner av enten PBS eller en irrelevant rotte-IgM-isotypekontroll (be-tegnet J5/D), ble tatt med for sammenligning. Antistoffer ble administrert enten intraperitonealt eller subkutant uten betydelig endring av utfallet. Antistoffinjeksjonsregimet som ble brukt, ga et gjennomsnittlig serum-rotte-IgM-nivå på 8 uker med 50 mg/ml målt ved hjelp av en rotte-IgM-spesifikk ELISA i tilfellet både med SXC.1- og J5/D-antistoffer. Etter de 8 ukene med behandling kunne de anti-IL-10-behandlede mus ikke skjelnes fra de tre kontrollgruppene med mus når det gjelder de følgende kriterier: total kroppsvekt, grov histologisk undersøkelse av lever, milt, thymus, lymfeknuter, innvoller og lunger; hematokritter; totalt antall hvite blodlegemer i milt, thymus, lymfeknuter og peritoneum; og mengdeforhold mellom B-celler, T-celler og ikke-B/T-celler i milt, lymfeknuter og thymus. I motsetning til dette avslørte immunfluorescent fenotyping av celler erholdt i de sammenslåtte peritonealutvaskinger samlet opp fra 5-10 mus som omfattet hver av de fire forsøksgruppene beskrevet, en slående uttømming av IgM^+- og IgD^+-celler hos de anti-IL-10-behandlede mus (SXC.1), men ikke hos noen av kontrolldyrene (figur 24). Identiske data ble oppnådd i 24 uavhengige forsøk, inkludert to hvor det ble brukt C3H/HeJ-mus, og flere hvor det ble brukt et separat rotte-IgG1-anti-IL-10-nøytraliserende antistoff. Anti-IL-10-behandlede dyr ble også tømt for B220-bærende peritonealceller, som evaluert ved hjelp av immunfluorescens, og av peritonealceller som gir respons på LPS, som evaluert ved hjelp av disse cellenes evne til å inkorporere $[^3H]$-tymidin etter 3 dagers samkultur med 50 µg/ml LPS. Disse funn tyder på at anti-IL-10-behandlede BALB/c-mus ikke inneholdt noen B-celler i sine peritonealhuler, i motsetning til de 1-5 x 10^6 B-celler som normalt kan utvinnes fra dette stedet. Det er av betydning at peritonealhulene til 8 uker gamle BALB/c-mus i vår dyreanstalt ved trefargers immunfluorescens inneholder svært få (<5%) vanlige B-celler. Resultatene vist i figur 24, representerer derfor en hovedsakelig uttømming av Ly-1-B-celler. Til tross for denne slående uttømming av peritoneal-B-celler atskiller ikke den totale cellularitet til peritonealhulene hos anti-IL-10-behandlede mus seg signifikant fra de

til kontrollgruppene. Videre immunfluorescensanalyse sammen med differensielle hematopoesecelletellinger, viste at tap av B-celler ble kompensert med en økning i peritoneal-CD4+-T-celler og granulocytter hos de anti-IL-10-behandlede dyr. To andre observasjoner indikerte at uttømming av Ly-1-B-celler hos anti-IL-10-behandlede mus inntrådte gjennom hele immunsystemet og var ikke begrenset til peritonealhulen. Først oppviste anti-IL-10-behandlede mus en slående 90-100% reduksjon i serum-IgM-nivåer sammenlignet med de tre kontrollgruppene, som det ble målt ved hjelp av en muse-IgM-spesifikk ELISA (figur 25). For det andre var anti-IL-10-behandlede mus svært svikt-ende i sine evner til å frembringe antistoffresponser *in vivo* mot α1,3-dekstran eller fosforylcholin (figur 26), to thymus-avhengige antigener som B-celler som gir funksjonell respons, befinner seg helt innenfor Ly-1-B-celleundersettet for.

Eksempel F2

Anti-IL-10-behandlede mus inneholder fenotypisk og funksjonelt normale, vanlige B-celler

På bakgrunn av den slående effekt av anti-IL-10-behandling av Ly-1-B-celler var det viktig å evaluere forsiktig statusen til vanlige B-celler hos disse dyr. Som angitt ovenfor, atskilte ikke det totale antall hvite blodlegemer i milter til anti-IL-10-behandlede eller kontrolldyr seg signifikant i 24 uavhengige forsøk. Figur 27 viser at andelene av B220+-B-celler, CD3+-T-celler og ikke-B/T-celler ($B220^-CD3^-$) ikke atskilte seg i noen av de fire forsøksgruppene med mus. Ekvivalente data ble oppnådd når Ig^+-B-celler eller $CD4^+$-T-celler ble sammenlignet. Disse data indikerer at det totale fenotypeantall av milt-B-celler hos anti-IL-10-behandlede mus er det samme som for hver av kontrollgruppene. Immunkompetansen til vanlige B-celler hos anti-IL-10-behandlede mus ble testet på to måter. For det første utviklet anti-IL-10-behandlede mus normale IgM- og IgG-antistoffer som svar på injeksjon med det thymusavhengige antigenet TNP-KLH (figur 28). Sekundærresponser mot TNP-KLH var også normale hos anti-IL-10-behandlede mus. For det andre utviklet milt-B-celler fra anti-IL-10-behandlede mus normale proliferative responser *in vitro*

mot 50 µg/ml LPS eller anti-IgM-antistoff (tabell F1). De proliferative bakgrunnsresponser i miltceller for anti-IL-10-behandlede mus var ofte tre til fem ganger høyere enn for kontrollene (tabell F1). Til sammen tyder disse data på at vanlige B-celler hos anti-IL-10-behandlede mus ikke lar seg skjelne kvantitativt og funksjonelt fra dataene for kontrollmus.

TABELL F1

Proliferativ respons *in vitro* av miltceller fra anti-IL-10-behandlede og kontrollmus mot LPS-, anti-IgM- og anti-CD3-stimulering

Dyre-gruppe*	[^{3}H]tymidin			
	+0	+LPS	+Anti-IgM	+Anti-CD3
	cpm			
Ubehandlet	224	22.570	3,346	90.093
PBS	320	42.298	3,821	115.692
J5/D	547	46.748	2,897	135.172
SXC.1	2.779	61.609	7.218	96.389

Dyr ble behandlet fra fødselen av og inntil 8 ukers alder som beskrevet i figur 1. Sammenslåtte miltceller ved 2 x 10^6/ml erholdt fra tre mus i hver gruppe, ble dyrket i 3 dager i medium alene, eller medium supplert med LPS (50 mg/ml), geite-anti-muse-IgM-antistoffer (50 mg/ml) eller hamster-anti-muse-CD3-antistoffer (5 mg/ml). For anti-CD3-stimulering ble antistoffet belagt på mikrotiterplaten før tilsetning av miltceller. Proliferasjon ble evaluert via inkorporering av [^{3}H]-tymidin etter en 16-timers puls med 1 mC/brønn [^{3}H]tymidin (NET 027; New England Nuclear, Boston, MA).

Eksempel F3

Mekanisme for Ly-1-B-celleuttømming

Proliferasjonsanalyser

Sammenslåtte miltceller ved 2 x 10^6 celler/ml erholdt fra 3 mus i hver gruppe, ble dyrket i 3 dager i medium alene, eller medium supplert med LPS (50 µg/ml), geite-anti-muse-IgM-antistoffer (0611-0201; Cappel Laboratories, Cochranville, PA) (50 µg/ml), eller hamster-anti-muse-CD3-antistoffer (fra D.J. Bluestone, University of Chicago, Chicago, IL) (5 µg/ml). For anti-CD3-stimulering ble antistoffet belagt på mikrotiterplaten før tilsetning av miltceller. Proliferasjon ble evaluert via inkorporering av [^{3}H]tymidin, etter en 16-timers puls med 1 mCi/brønn [^{3}H]tymidin (NET 027; New England Nuclear, Boston, MA).

Flere mulige mekanismer ble vurdert som forklaringer på uttømmingen av Ly-1-B-celler hos anti-IL-10-behandlede mus. Denne effekten syntes ikke å involvere selektiv cytotoksisitet av Ly-1-B-celler ved de anti-IL-10-behandlede antistoffer, ettersom injeksjon av disse antistoffene i voksne mus ikke hadde noen virkning på etterfølgende utvinninger av totalmengde utvaskede peritonealceller, eller totalmengde peritoneal-B-celler (figur 29) 1, 2 eller 3 dager senere. Som en alternativ forklaring vurderte vi muligheten for at Ly-1-B-celleuttømming gjenspeilte en sekundærfølge av en annen endogen cytokinforstyrrelse. Anti-IL-10-behandlede mus ble generelt virkelig funnet å ha forhøyede serum-IFNγ-nivåer (figur 30), en observasjon som var i overensstemmelse med IL-10's tidligere rapporterte evne til å undertrykke IFNγ-produksjon med Th1- og NK-celler *in vitro*. For å teste den mulighet at denne anti-IL-10-induserte forøkning av IFNγ enten direkte eller indirekte var ansvarlig for uttømming av Ly-1-B-celler, ble mus injisert fra fødselen av til voksen alder med en kombinasjon av anti-IL-10- og anti-IFNγ-nøytraliserende antistoffer, eller anti-IL-10- og et passende isotypekontrollantistoff. Resultatene viste at anti-IFNγ-antistoffer (figur 31), men ikke deres isotypekontroll, i vesentlig grad reduserte anti-IL-10-behandlingens evne til å uttømme mus for peritoneal-Ly-1-B-celler. Det er viktig å legge merke til at fort-

satt administrering av anti-IFNγ-antistoffer alene, eller kombinasjonen av anti-IL-10- pluss anti-IFNγ-antistoffer, ikke endrer utvinningen av totalmengde utvaskede peritonealceller fra mus behandlet med nettopp anti-IL-10 eller dets isotype-kontroll. Disse data understøtter det konsept at Ly-1-B-celleuttømming er i det minste delvis en følge av IFNγ-forøkning i anti-IL-10-behandlede mus.

UNDERSØKELSE G. Modifisert, immunologisk status for anti-IL-10-behandlede mus

Oppsummering

Det ble vist ovenfor at kontinuerlig behandling av mus fra fødselen av og til voksen alder med nøytraliserende anti-IL-10-antistoffer fører til spesifikk uttømming av Ly-1-B-celler, mens vanlige B-celler forblir normale når det gjelder antall, fenotype og funksjon, se undersøkelse F. Ved å utvide karakteriseringen av disse dyrene viser disse dataene at anti-IL-10-behandlede mus kan skjelnes fra ubehandlede eller isotypekontrollbehandlede mus ved hjelp av flere andre kriterier. Anti-IL-10-behandlede mus inneholdt i det vesentlige forhøyede nivåer av TNFα i omløp, og i mange tilfeller IL-6 i omløp, og var svært mottakelige for død ved hjelp av LPS-indusert sjokk, en monokinformidlet betennelsesreaksjon. Analyse av serumimmunglobulinnivåer i anti-IL-10-behandlede mus avslørte en reduksjon i serum-IgA-nivåer som ledsaget den tidligere rapporterte reduksjon i serum-IgM, pluss en slående økning i IgG2a- og IgG2b-nivåer. Videre undersøkelse av Ly-1-B-celleuttømmingen av anti-IL-10-behandlede mus avslørte at denne effekten var forbigående, noe som ble bevist av tilbakekomsten av Ly-1-B-celler i normale antall 8 uker etter at anti-IL-10-behandling var avbrutt. Ly-1-B-celleuttømmingen som inntrådte under anti-IL-10-behandling, ble funnet å bli kompensert av økning i peritoneal-T-celler og granulocytter. Selv om anti-IL-10-behandlede mus ikke var i stand til å produsere antistoffer mot fosforylcholin og α1,3-dekstran, utviklet de endelig normale antistoffresponser etter intraperitoneale injeksjoner av TNP-Ficoll. Dette resultatet tyder på eksistensen av underkategorier innenfor familien av thymusuavhengige type II-polysakkaridantigener. Disse dataene diskuteres innen-

for sammenhengen av deres implikasjoner for rollene til IL-10- og Ly-1-B-celler i immunsystemet.

Immunsystemet reguleres av en familie av oppløselige glykoproteiner kalt cytokiner som fremstilles av mange forskjellige hematopoese- og ikke-hematopoeseceller. Utstrakt karakterisering av disse immunregulatorene *in vitro* i løpet av de siste fem årene har ført til konseptet med omfattende funksjonell pleiotropi og overflødighet innenfor cytokinsystemet. Immunologer står nå overfor utfordringen med å evaluere hvorvidt dette konseptet gjenspeiler de fysiologiske rollene til cytokiner *in vivo* nøyaktig. Den fysiologiske rolle til et nylig oppdaget cytokin IL-10 har vært gjenstand for undersøkelse. En omfattende liste av egenskaper *in vitro* har kjennetegnet IL-10 som en sterk immunologisk undertrykker som er i stand til å nedregulere produksjon av flere monokiner og cytokiner og til å inhibere antigenpresentasjon av noen, men ikke alle, antigenpresenterende celler. En like lang liste med stimulatoregenskaper fremstiller det samme cytokin som en vekstkostimulator til tymocytter, perifere T-celler, B-celler og mastceller; en forsterker for cytotoksisk T-celleutvikling og -funksjon; og et induksjonsmiddel for B-cellelevedyktighet og -differensiering. For å evaluere den fysiologiske rolle til IL-10 *in vivo*, ble mus injisert 2 til 3 ganger pr. uke fra fødselen av og til voksen alder med nøytraliserende, monoklonale anti-IL-10-antistoffer. Tidlig analyse avslørte at denne behandlingen fører til en slående uttømming av et mindre undersett av B-lymfocytter, kalt Ly-1- eller B-1-B-celler, hvilket impliserer IL-10 som en regulator til Ly-1/B-1-B-celleutvikling.

Ly-1-B-celler er en subpopulasjon av B-lymfocytter som er svært sentrerende i føtalt og neonatalt lymfoidvev hos menneske og mus, men som finnes i et lite antall bare i det voksne immunsystem. Selv om de er så vidt påvisbare i voksne primære og sekundære lymfoidvev, anrikes Ly-1-B-celler svært mye i peritoneal- og pleuralhulene hos en voksen mus og finnes i lave antall i blodomløpet til voksne mennesker. Deres grundige karakterisering i murinsystemet har avslørt et stort antall interessante egenskaper, inkludert et begrenset repertoar

av lavaffinitetsantistoffer som ikke lett gjennomgår somatisk mutasjon, og som er svært kryssreaktive med autoantigener og bakteriecelleveggkomponenter. Murine rekonstitusjonsforsøk har dessuten indikert at, i motsetning til vanlige B-celler, Ly-1-B-celler er i stand til selvsupplering for hele livet til verten, og at de frembringer mest serum-IgM og hele antistoffresponsen mot flere bakteriedeterminanter, slik som fosforylcholin og α1,3-dekstran. Tidligere karakterisering av Ly-1-B-celler har vist at de kan skjelnes ytterligere fra vanlige B-celler på grunnlag av svært forhøyet og induserbar produksjon av IL-10, noe som reiser muligheten av en bredere immunologisk regulatorrolle for disse cellene. Til tross for disse interessante egenskaper forblir den nøyaktige rolle til Ly-1-B-celler i immunsystemet uklar.

Mus som er blitt behandlet kontinuerlig fra fødselen av og til voksen alder med nøytraliserende anti-IL-10-antistoffer, ble uttømt med hensyn på Ly-1-B-celler, bevist ved deres mangel på peritoneal-B-celler og det faktum at de har svært reduserte serum-IgM-nivåer og antistoffresponser mot α1,3-dekstran og fosforylcholin *in vivo*. Uttømmingen av Ly-1-B-celler ble funnet å være en sekundærkonsekvens av endogen IFNγ-forøkning og kunne forhindres ved samadministrering av anti-IFNγ-antistoffer. Følgene av spesifikt å uttømme både Ly-1-B-celler og endogent IL-10 på den senere immunstatus til disse musene, er rapportert her.

Eksempel G1

Effekt av anti-IL-10-behandling av mus på endogene cytokinnivåer

Mus

Drektige BALB/c-mus midt i drektighetsperioden ble erholdt fra Simonsen Laboratory (Gilroy, CA).

Anti-IL-10-behandling

5 til 10 alderstilpassede BALB/c-mus ble injisert intraperitonealt med ett av to anti-IL-10-antistoffer fra fødselen av og inntil 8 ukers alder i overensstemmelse med de følgende fremgangsmåter. I noen forsøk ble mus injisert tre

ganger ukentlig med SXC.1-rotte-IgM-anti-muse-IL-10-antistoff, se Mosmann et al. (1990), J. Immunol., 145, s. 2938-2945, (0,2 mg/injeksjon i uke 1, 0,5 mg/injeksjon i uke 2, 1,0 mg/injeksjon i ukene 3-8), ekvivalente mengder av en isotype-kontroll betegnet J5/D, eller ekvivalente volumer (100 eller 200 µl) fosfatbuffersaltoppløsning (PBS). I andre forsøk ble mus injisert to ganger ukentlig med 2A5, et rotte-IgG1-anti-muse-IL-10-antistoff (0,2 mg/injeksjon i uke 1, 0,5 mg/injeksjon i uke 2, 1 mg/injeksjon i ukene 3-8), ekvivalente mengder av en isotypekontroll betegnet GL113, eller ekvivalente volumer (100 eller 200 µl) fosfatbufret saltoppløsning (PBS). Ubehandlede, alderstilpassede BALB/c-mus var tatt med i alle forsøkene for sammenligning. Alle antistoffene ble erholdt fra serumfrie hybridomsupernatanter og renset ved ammoniumsulfat-utfelling. Etter dette behandlingsregimet ble sammenslåtte milter, thymuser, lymfeknuter eller peritonealutvaskede celler samlet opp fra hver av de fire gruppene med mus og analysert ved hjelp av strømningscytometri og funksjonelle analyser.

Cytokin-ELISA-er

Serumprøver samlet opp fra anti-IL-10-behandlede eller kontrollmus, ble analysert med hensyn på murin-TNFα eller murin-IL-6 under anvendelse av cytokinspesifikke ELISA-er.

Sammenhengende anti-IL-10-behandling av mus fra fødselen av og inntil voksen alder fører til tilstedeværelsen av vesentlige mengder IFNγ i sera samlet opp etter 8 uker, i motsetning til ubehandlede eller isotypekontrollbehandlede mus, som begge mangler påvisbart IFNγ i sine sera. For ytterligere å undersøke endogene cytokinforstyrrelser som skriver seg fra anti-IL-10-behandling, ble sera samlet opp etter 8 ukers behandling, evaluert med hensyn på tilstedeværelsen av TNFα og IL-6, ved å bruke cytokinspesifikke ELISA-er. Sera fra anti-IL-10-behandlede mus inneholdt svært forhøyede TNFα-nivåer (figur 32) og inneholdt ofte forhøyede IL-6-nivåer (figur 33). Økning av TNFα og IL-6 i anti-IL-10-behandlede mus er i overensstemmelse med IL-10's rapporterte evne til å undertrykke monokinproduksjon *in vitro*.

Eksempel G2

Effekt av anti-IL-10-behandling på museserum-Ig-nivåer

Endotoksinindusert sjokk

Mus ble injisert intraperitonealt med doser av endotoksin (lipopolysakkarider fra *Escherichia coli* serotype 0111:B4, Sigma Chemical Co.) varierende fra 1 µg til 500 µg. Overlevelse ble overvåket under det påfølgende 1-6-dagers tidsrom.

Effekten av anti-IL-10-behandling på endogene monokinnivåer ble analysert videre ved å evaluere disse dyrenes ømfintlighet overfor LPS-indusert sjokk, en monokinmediert betennelsesreaksjon. Tidligere presenterte data har vist at nøytraliserende, monoklonale antistoffer mot TNFα, IL-1 eller IL-6, og en fysiologisk IL-1-antagonist kalt IL-1Ra, effektivt beskytter mus mot LPS-indusert sjokk. De forsøkene indikerer at mus injisert med enten SXC.1- (rotte-IgM) eller 2A5- (rotte-IgG1) anti-IL-10-antistoffer fra fødselen av og inntil 8 uker, var svært tilbøyelige til å dø av LPS-indusert sjokk (figur 34). Mens LPS-LD_{100} for 8 uker gamle BALB/c-mus i DNAX-dyreanlegget ble funnet å være >380 µg/mus i.p., drepte så lite som 1 µg endotoksin de fleste anti-IL-10-behandlede mus (figur 34). Den nøyaktige mekanisme for denne forøkte ømfintlighet er ennå ikke blitt bestemt, men disse data er i overensstemmelse med en generalisert oppregulering av inflammatoriske monokiner hos anti-IL-10-behandlede mus.

Antistoff-ELISA-er

Serumprøver samlet opp etter 8 ukers behandling ble analysert med hensyn på tilstedeværelsen av museimmunglobuliner av alle isotyper under anvendelse av isotypespesifikke sandwich-ELISA-er. De anvendte platebindende antistoffer for dette formål var som følger: rotte-anti-muse-IgG1 (3096, generøst tilveiebrakt av R. Coffman, DNAX); rotte-anti-muse-IgG2a (R8-103; Pharmingen, San Diego, CA); rotte-anti-muse-IgG2b (R9-91, Pharmingen); rotte-anti-muse-IgG3 (R2-38, Pharmingen); rotte-anti-muse-IgA (R5-140, Pharmingen); rotte-anti-muse-IgE (EM95, generøst tilveiebrakt av R. Coffman). Platebeleggantistoffer ble brukt ved 1-5 µg/ml. De anvendte sand-

wich-antistoffer i disse ELISA-er var biotinylert rotte-anti-muse-IgG1 (3098B, generøst tilveiebrakt av R. Coffman); biotinylert av anti-muse-IgG2a (R19-15, Pharmingen); biotinylert rotte-anti-muse-IgG2b (R12-3, Pharmingen); biotinylert rotte-anti-muse-IgG3 (R40-82, Pharmingen); biotinylert rotte-anti-muse-IgA (2740B, generøst tilveiebrakt av R. Coffman); biotinylert rotte-anti-muse-IgE (R35-118, Pharmingen). Disse sandwich-antistoffene ble brukt ved 1-3 µg/ml sammen med streptavidinkonjugert pepperrotperoksidase (CalBiochem, La Jolla, CA) pluss 1 mg/ml substrat [2,2-azinobis-(3-etylbenztiazolinsvovelsyre), Sigma]. ELISA-er ble kvantifisert under anvendelse av rensede musemyelomimmunglobuliner som standarder.

Sammenhengende anti-IL-10-behandling av mus fra fødselen av og inntil voksen alder fører til en markert uttømming av serum-IgM-nivåer sammenlignet med de normale serum-IgM-nivåer observert hos isotypekontrollbehandlede mus. Måling av de øvrige immunglobulinisotypene i sera samlet opp etter 8 ukers behandling, er vist i figur 35. Nivåene for hver immunglobulinisotype i de tre kontrollgruppene av mus (dvs. ubehandlet, PBS-behandlet eller behandlet med et isotypekontrollantistoff) varierte ikke signifikant fra de tidligere dokumenterte serum-Ig-nivåområder hos normale mus. Et stort antall endringer ble imidlertid observert i serum-Ig-nivåer hos anti-IL-10-behandlede mus. Disse mus oppviste en markert reduksjon i serum-IgA-nivåer som ledsaget den tidligere rapporterte reduksjon av serum-IgM, og en slående økning i IgG2α og IgG2β (figur 35). Gjenværende isotyper (IgG1, IgG3, IgE) var enten uendret, eller var forøkt to til fire ganger i noen forsøk.

Eksempel G3

Ly-1-B-celleuttømming hos anti-IL-10-behandlede mus er forbigående

Immunfluorescens

Vaskede celler ble merket med kombinasjoner av de følgende reagenser: fluoresceinert anti-muse-IgM-antistoff (DS-1, Pharmingen, San Diego, CA); biotinylert rotte-anti-muse-IgD-antistoff (11-26c, produsert av J. Kearney, U. Bir-

mingham, Ala.); fluoresceinert anti-muse-CD3-antistoff (145-2C11, Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN); biotinylert anti-muse-B220-antistoff (RA3-6B2; Caltag, S.F); og et biotinylert rotte-anti-muse-granulocytt/eosinofil-antistoff (8C5; produsert av R. Coffman, DNAX). Biotinylerte reagenser ble brukt sammen med fykoerytrinkonjugert streptavidin (Becton-Dickinson, Mountain View, CA). Celler ble analysert under anvendelse av et "FACScan", og døde celler ble utelukket på grunnlag av forkant- og sidespredning. Resultater viser fluorescensstyrkene til 5.000 levende celler tellet fra hver forsøksgruppe.

Anti-IL-10-behandlede mus ble evaluert etter at anti-IL-10-behandling var avbrutt for å bestemme om uttømming av Ly-1-B-celler hos disse dyrene var irreversibel. Flere grupper mus ble injisert med anti-IL-10-antistoffer fra fødselen av og inntil 8 uker, hvoretter behandling ble avbrutt. Hver gruppe ble så analysert med hensyn på tilstedeværelsen av peritoneal-Ly-1-B-celler enten umiddelbart eller til forskjellige tidspunkter i løpet av de 8 uker som fulgte etter behandlingsavslutningen. Det er viktig å legge merke til at ingen signifikante forskjeller ble observert i utbytter av totalmengde peritonealutvaskede celler samlet opp til forskjellige tidspunkter. I flere forsøk av denne type forble musene uten peritoneal-Ly-1-B-celler i de første 3 uker etter avslutning av anti-IL-10-behandling. Etter dette tidsintervallet begynte Ly-1-B-celler på nytt å komme til syne i bukhulen med et normalt komplement av Ly-1-B-celler observert 8 uker etter avslutning av anti-IL-10-behandling (figur 36). Rekonstitusjon av peritoneal-B-celleområdet var kjennetegnet av en innledende tilsynekomst av $B220^{lys}IgM^{mørk}$-B-celler omtrent 4 uker etter anti-IL-10-behandling var avbrutt, etterfulgt noen uker senere av tilsynekomsten av $B220^{mørk}IgM^{lys}$-B-celler (figur 36).

Eksempel G4

Økt antall av peritoneal-T-celler og granulocytter hos anti-IL-10-behandlede mus

Differensielle hematopoesecelletellinger

Cellesuspensjoner fra milter eller peritonealutvaskinger ble brukt til å fremstille "cytospins" for cellemorfo-

ligoanalyse. Prøver ble merket med Wright's-Giemsa (Sigma, St. Louis) og analysert ved hjelp av mikroskopi med hensyn på lymfocytter, makrofager, granulocytter, eosinofiler og mastceller.

Mens mus behandlet uavbrutt fra fødselen av og inntil 8 ukers alder ble uttømt for peritoneal-B-celler, varierte ikke det totale antall peritonealutvaskingsceller som kunne fås fra slike mus, signifikant fra resultatene for kontrollmus. Differensielle hematopoesecelletellinger utført på peritonealutvaskingsceller samlet opp fra anti-IL-10-behandlede mus, indikerte at dette gjenspeilte en økning i peritonealgranulocytter/eosinofiler og tilsynelatende ikke-B-cellelymfocytter (tabell G1). Overflatemarkørfenotyping av peritonealutvaskede celler fra anti-IL-10-behandlede mus avslørte økninger i Ly1-lyse-Ig-negative celler (figur 37), CD3-positive Ig-negative celler, Mac1-lyse-Ig-negative celler (figur 38), og 8C5-lyse-Ig-negative celler. Disse analysene indikerer en økning i Ly1-positive, CD3-positive T-lymfocytter og bekrefter (tabell G1) en økning i granulocytter som uttrykker Mac1- og 8C5-overflatemarkørene.

TABELL I

Andeler av hematopoesesubpopulasjoner i anti-IL-10-behandlede eller kontrollmus

	Lymfo-cytter	Makro-fager	Neutro-filer	Eosino-filer	Mast-celler
Peritoneum†					
Ubehandlet	74	22	1,8	1,7	0,5
PBS-behandlet	66	29	1,4	34,3	0,3
Isotypekon-trollbehandlet	64	31	1,2	4,5	0,3
Anti-IL-10-behandlet	44	22	18,0	16,0	0
Milt†					
Ubehandlet	94	2,7	2,3	0,5	0
PBS-behandlet	92	3,6	3,6	1,4	0
Isotypekon-trollbehandlet	96	1,2	1,8	0,6	0
Anti-IL-10-behandlet	92	2,4	5,0	0,9	0

(† Alle grupper hadde omtrent det samme antall peritoneal- og miltceller/mus, tallene representerer prosentandel av totalt antall celler tellet)

Eksempel G5

Anti-IL-10-behandlede mus i respons på det thymusuavhengige antigen-TNP-Ficoll

Spesifikke antistoffresponser

Spesifikke antistoffresponser mot TNP-Ficoll ble bestemt etter utfordring av mus intraperitonealt med 10 µg TNP-Ficoll (tilveiebrakt av dr. James Mond, USUHS) og oppsamling av sera 5 eller 10 dager senere. Anti-IL-10- eller kontroll-antistoffinjeksjoner ble fortsatt mellom antigenutfordring og seraoppsamling. TNP-spesifikke antistoffer ble kvantifisert ved å bruke en ELISA.

Anti-IL-10-behandlede mus er mangelfulle i sin evne til å utløse *in vivo* antistoffresponser mot to thymusuavhengige type II-antigener, fosforylcholin og α1,3-dekstran. Figur 39 indikerer at anti-IL-10-behandlede mus utvikler normale antistoffresponser *in vivo* mot et tredje thymusuavhengig type II-antigen-TNP-Ficoll. Denne evne til å gi respons er i overensstemmelse med våre tidligere observasjoner om at milt-B-celler fra anti-IL-10-behandlede mus utvikler en normal proliferativ respons etter stimulering med anti-IgM-antistoffer, den antatte, polyklonale analog til thymusuavhengige type II-antigener.

UNDERSØKELSE H. Kontinuerlig administrering av anti-IL-10-antistoffer forsinker inntreden av autoimmunitet hos NZB/W-mus

Oppsummering

Kontinuerlig administrering av anti-IL-10-antistoffer til BALB/c-mus modifiserer endogene nivåer av autoantistoffer, "plex"-TNFα og IFNγ, tre immunmediatorer som er kjent for å bevirke utviklingen av autoimmunitet hos "lupus-prone"-NZB/W-mus. For å utforske følgene av IL-10-nøytralisering hos NZB/W-mus, ble dyrene injisert 2-3 ganger ukentlig fra fødselen av og inntil 8-10 måneder med anti-IL-10-antistoffer eller med isotypekontrollantistoffer. Anti-IL-10-behandling forsinket i vesentlig grad inntreden av autoimmunitet hos NZB/W-mus, som overvåket enten ved totaloverlevelse, eller ved utvikling av proteinuri, nyrenefritt eller autoantistoffer. Overlevelse

etter 9 måneder ble økt fra 10 til 80% hos behandlede mus i forhold til kontroller. Denne beskyttelsen mot autoimmunitet syntes å skyldes en anti-IL-10-indusert oppregulering av endogent TNFα ettersom beskyttede NZB/W-mus hurtig utviklet autoimmunitet når nøytraliserende anti-TNFα-antistoffer ble innført etter 30 uker i de langvarig anti-IL-10-behandlede mus. Disse data indikerer at IL-10-antagonister vil være gunstige ved behandlingen av human, systemisk lupus erythematosus.

(NZB x NZW)-F1-hybridmusen utvikler en alvorlig autoimmunsykdom som ligner svært på systemisk lupus erythematosus hos mennesker. NZB/W-mus utvikler spontant en dødelig immunkompleksformidlet glomerulonefritt etter ca. 6-9 måneder hos hunndyr og 12-18 måneder hos hanndyr. Tidligere forsøk på å definere den underliggende årsak til autoimmunitet hos NZB/W-mus har fokusert på den potensielle rolle til MHC-gener. Interferon γ (IFNγ), et cytokin som oppregulerer ekspresjon av MHC-klasse II-antigener hos mange forskjellige celletyper, fremskynder virkelig utviklingen av autoimmunitet hos NZB/W-mus. Flere nyere undersøkelser har antydet at TNFα-genet som befinner seg i MHC-komplekset, kan være involvert i patogenesen til lupus-nefritt hos NZB/W-mus. Disse undersøkelsene avslører at NZB/W-mus gir eksepsjonelt lave nivåer av TNFα, og at dette korrelerer med en restriksjonsfragmentlengdepolymorfisme i TNFα-genet j, og en polymorfisme i enkle dinukleotidtandemgjentagelser i 5'-regulatorområdet i TNFα-genet. En forårsakende rolle til disse observasjoner ligger i det faktum at erstatningsterapi med rekombinant TNFα signifikant forsinker utvikling av nefritt hos NZB/W-mus.

IL-10 er et cytokin fremstilt av undersett av aktiverte T-celler, B-celler og makrofager som formidler et variert utvalgt av både immunstimulerende og immunundertrykkende egenskaper hos mus og menneske ved analyser *in vitro*. I et nylig forsøk på å evaluere den fysiologiske rolle til IL-10 ble BALB/c-mus behandlet sammenhengende fra fødselen av og inntil 8 ukers alder med nøytraliserende anti-IL-10-antistoffer. I overensstemmelse med de kjente egenskaper til IL-10 *in vitro* er anti-IL-10-behandlede mus kjennetegnet ved forhøyede nivåer av endogent IFNγ og TNFα. Det forhøyede nivå av IFNγ

fører igjen til uttømmingen av et antallsmessig lite undersett av B-lymfocytter, kalt Ly1 eller CD5 eller B-1-B-celler, en populasjon hvorfra de fleste murine autoantistoffer avledes. Disse undersøkelsene hos normale mus tydet på at nøytralisering av IL-10 kan gi noen ønskelige følger hos NZB/W-mus, dvs. forhøyelse av endogent TNFα og reduksjon av autoantistoffproduksjon, og noen uønskede følger, dvs. forhøyelse av endogent IFNγ. De totale effekter av sammenhengende anti-IL-10-behandling på utvikling av autoimmunitet hos NZB/W-hunnmus undersøkes her. Dataene viser at nøytralisering av IL-10 signifikant forsinker inntreden av autoimmunitet hos disse musene på grunn av en oppregulering av endogent TNFα.

Mus

NZB/W-F1-mus ble oppalet i dyrekolonien til DNAX Research Institute under anvendelse av NZB-hunner innkjøpt fra Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) og NZW-hanner innkjøpt fra Simonsen Laboratories (Gilroy, CA). Bare F1-hunnmus ble benyttet på grunn av deres hurtigere inntreden av autoimmunitet.

Anti-IL-10-behandling

Grupper à 17-23 B/W-F1-hunnmus ble behandlet med et rotte-IgM-mAb eller -IgG-mAb mot IL-10, betegnet SXC.1 eller JES 2A5. Alderstilpassede 21-23 B/W-F1-hunnmus pr. gruppe ble behandlet med isotypetilpassede kontroll-mAb-er, betegnet J5/D (IgM) eller GL113 (IgG). Anti-IL-10-mAb-er og isotypekontroll-mAb-er ble innhøstet som ascites fra nakne mus (nu/nu), renset ved hjelp av to på hverandre følgende ammoniumsulfatutfellinger, dialysert mot fosfatbufret saltoppløsning (PBS) og kvantifisert ved hjelp av proteinelektroforese og måling av optisk tetthet. Behandling besto av 3 deler: (a) fra fødselen av og til første uke, 0,2 mg mAb pr. mus ble injisert intraperitonealt (i.p.) 4 ganger i IgM eller to ganger i IgG, (b) andre uke, 0,5 mg mAb pr. mus ble injisert i.p. tre ganger med IgM eller to ganger med IgG, og (c) fra tredje uke til voksen alder, 1 mg mAb pr. mus ble injisert i.p. med tre ganger IgM eller to ganger med IgG pr. uke. Foreløpige undersøkelser indikerte at dette regimet kunne opprettholde konsentrasjonen av rotte-IgM i musesera rundt 50 µg/ml.

Fastleggelse av nyresykdom

Proteinuri ble målt kolorimetrisk ved å bruke "Albustix" dyppepinner (Miles Laboratories, Inc., Elkhart, IN) og gradert i henhold til den følgende kode: spor = 10 mg/dl; 1+ = 30 mg/dl; 2+ = 100 mg/dl; 3+ = 300 mg/dl; 4+ = 1.000 mg/dl. Histologisk alvorlighet av glomerulonefritt ble gradert på en skala fra 0 til 2+ basert på styrken og omfanget av histopatologiske endringer, 0 = nyrer uten glomerulskader; 1+ = svake skader, f.eks. forøkt mesangialmatriks, mesangial/glomerulær cellularitet, halvmånedannelse eller tilstedeværelse av inflammatoriske eksudater og kapseladhesjoner; ingen merkbare røravsetninger; 2+ = alvorlige skader, f.eks. glomeruloppbygning utslettet hos mer enn 70% av glomeruler med omfattende røravsetningsdannelse.

Autoantistoff-ELISA

Serumantistoffer som er spesifikke for dobbelt- eller enkelttrådet DNA (ds- eller ss-DNA), ble kvantifisert ved hjelp av ELISA. I korte trekk ble 5 mg/ml ds- eller ssDNA brukt til å kutte ELISA-plater (Flow Laboratories, McLean, VA) ved en inkubasjon over natten ved 4°C. Antigenbelagte plater ble deretter blokkert i 1 time med PBS inneholdende 0,05% "Tween 20", 0,02% NaN_3 og så inkubert i 1 time ved romtemperatur med test- eller standardsera fortynnet 1:100. Plater ble så vasket med PBS inneholdende 0,05% "Tween 20" og inkubert i 1 time med 1 µg/ml pepperrotperoksidase (HRP) konjugert til anti-muse-IgG eller IgM (Zymed Laboratories, Inc., S. San Francisco, CA). Absorbans ble målt ved å bruke en "Vmax"-mikrotiterplateavleser (Molecular Devices, Menlo Park, CA) 30 minutter etter tilsetningen av 1 mg/ml 2,2'-azino-bis(3-etylbenztiazolin-6-sulfonsyre); ABTS (Sigma Chemicals, St. Louis, MO). Anti-DNA-titere ble uttrykt som enheter under anvendelse av en referansestandard av sammenslått serum fra 4 måneder gamle MRL/MpJ-lpr/lpr-mus tilveiebrakt av dr. Shelby Umland hos Schering-Plough Corp. En 1:100 fortynning av dette standardserum ble vilkårlig antatt å være 100 enheter/ml.

Serumkonsentrasjon av Ig og TNFα

For Ig-ELISA ble plater belagt med 1 µg/ml geite-

anti-muse-IgG (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) inkubert med 1:1000 eller 1:5000 fortynnede testsera, så med HRP-konjugert geite-anti-IgG eller -anti-IgM (Zymed Laboratories, Inc.) og farge fremkalt. IgG- og IgM-konsentrasjoner ble bestemt ut fra en standardkurve laget ved å inkubere med kjente konsentrasjoner fra vårt lager, som var blandingen av myelomproteiner.

For TNFα-ELISA ble plater belagt med 5 µg/ml rotte-anti-muse-TNFα-mAb (MP6-XT3.11) inkubert med 1:10 fortynnede testsera, så med HRP-konjugert rotte-anti-muse-TNFα-mAb (MP6-XT22) og farge fremkalt.

Søkerne har deponert separate kulturer av *E. coli* MC1061 som bærer pH5C, pH15C og pBCRF1(SRa) ved American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA (ATCC), under deponeringsnumrene henholdsvis 68191, 68192 og 68193. Disse deponeringene ble gjort under betingelser bestemt under ATCC's overenskomst for kulturdeponering for patentformål, som sikrer at deponeringen vil bli gjort tilgjengelig for US Commissioner of Patents and Trademarks i henhold til 35 USC 122 og 37 CFR 1.14, og vil bli gjort tilgjengelig for almenheten etter bevilgning av et US-patent, noe som krever at deponeringen opprettholdes. Tilgjengelighet av den deponerte stamme skal ikke fortolkes som en tillatelse til å utøve oppfinnelsen i strid med rettighetene bevilget under et lands myndighet i overensstemmelse med dets patentlover.

SEKVENSLISTE

(2) INFORMASJON FOR SEKVENS MED IDENTIFIKASJONSNR. 1:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:
(A) LENGDE: 160 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(C) TRÅD:
(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKVENS MED IDENTIFIKASJONSNR. 1:

Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe
5 10 15

Pro Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe
20 25 30

Ser Arg Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn
35 40 45

Leu Leu Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu
50 55 60

Gly Cys Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu
65 70 75

Val Met Pro Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His
80 85 90

Val Asn Ser Leu Gly Glu Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu
95 100 105

Arg Arg Cys His Arg Phe Leu Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala
110 115 120

Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly
125 130 135

(2) INFORMASJON FOR SEKVENS MED IDENTIFIKASJONSNR. 2:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 147 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(C) TRÅD:

(D) TOPOLOGI: lineær

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKVENS MED IDENTIFIKASJONSNR. 2:

Thr Asp Gln Cys Asp Asn Phe Pro Gln Met Leu Arg Asp Leu Arg
5 10 15

Asp Ala Phe Ser Arg Val Lys Thr Phe Phe Gln Thr Lys Asp Glu
20 25 30

Val Asp Asn Leu Leu Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys
35 40 45

Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr
50 55 60

Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Glu Ala
65 70 75

Lys Asp His Val Asn Ser Leu Gly Glu Asn Leu Lys Thr Leu Arg
80 85 90

Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu Pro Cys Glu Asn Lys
95 100 105

Ser Lys Ala Val Glu Gln Ile Lys Asn Ala Phe Asn Lys Leu Gln
110 115 120

Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp Ile Phe Ile
125 130 135

Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Ile Lys Ala Arg
140 145

Patentkrav

1. Anvendelse av interlukin-10 eller en analog, en agonist eller en antagonist derav ved fremstillingen av et farmasøytisk preparat for administrering til en vert for å modulere betennelse eller en T-celleformidlet immunfunksjon hos en vert, hvor betennelsen eller den T-celleformidlede immunfunksjon ledsages av et unormalt nivå av tumornekrosefaktor α.

2. Anvendelse ifølge krav 1, hvor nevnte interleukin-10 eller en analog, en agonist eller en antagonist derav, anvendes ved fremstillingen av et farmasøytisk preparat for administrering til en vert for å modulere betennelse, hvor betennelsen ledsages av et unormalt nivå av tumornekrosefaktor α.

3. Anvendelse ifølge krav 1 eller krav 2, hvor interleukin-10 anvendes ved fremstillingen av preparatet.

4. Anvendelse ifølge hvilket som helst forutgående krav, hvor administreringen også modulerer nivåer av interleukin-1 eller interleukin-6.

5. Anvendelse ifølge hvilket som helst forutgående krav, hvor det unormale nivå er forhøyet.

6. Anvendelse ifølge hvilket som helst forutgående krav, hvor det unormale nivå ledsages av en mikrobeinfeksjon.

7. Anvendelse ifølge hvilket som helst forutgående krav, hvor det unormale nivå ledsages av feber, hypotensjon, vevsnekrose, metabolsk acidose eller organdysfunksjon.

8. Anvendelse ifølge krav 6, hvor mikrobeinfeksjonen forårsaker en tilstand av septisk sjokk, toksisk sjokk, meningokokk-meningitt eller malaria.

9. Anvendelse ifølge hvilket som helst av kravene 1-7, hvor verten lider av en bakterieinfeksjon.

10. Anvendelse ifølge krav 9, hvor bakterieinfeksjonen er av en gramnegativ bakterie.

11. Anvendelse ifølge krav 10, hvor verten utviser symptomer på septisk sjokk.

12. Anvendelse ifølge krav 9, hvor bakterieinfeksjonen er av en grampositiv bakterie.

13. Anvendelse ifølge krav 12, hvor verten utviser symptomer på toksisk sjokk.

14. Anvendelse av interleukin-10 ved fremstillingen av et farmasøytisk preparat for behandling av septisk sjokk hos en vert.

15. Anvendelse av interleukin-10 ved fremstillingen av et farmasøytisk preparat for behandling av toksisk sjokk hos en vert.

16. Anvendelse av en interleukin-10-antagonisk ved fremstillingen av et farmasøytisk preparat for behandling av en autoimmunforstyrrelse hos en vert.

17. Anvendelse ifølge krav 16, hvor autoimmunforstyrrelsen er B-celleformidlet.

18. Anvendelse ifølge krav 16, hvor autoimmunforstyrrelsen er TNFα-formidlet.

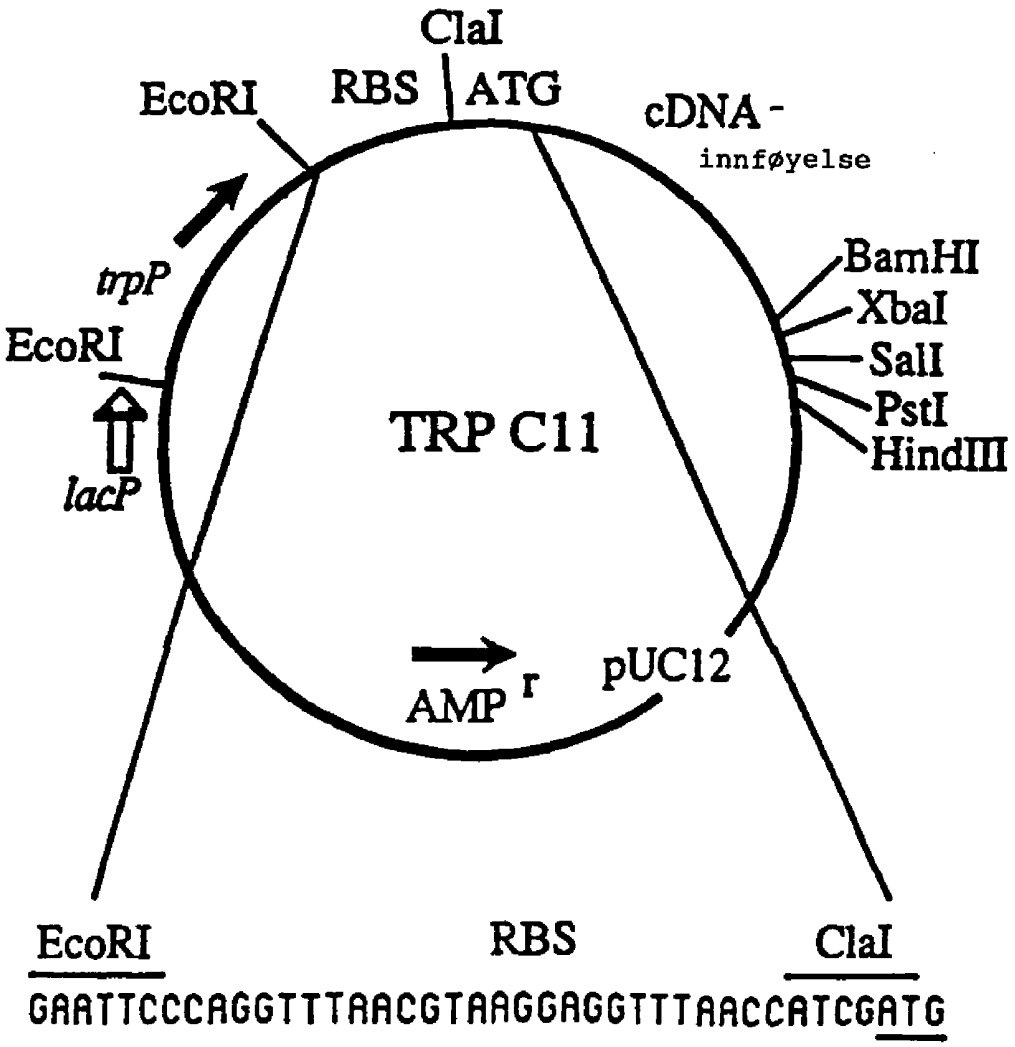
19. Anvendelse ifølge hvilket som helst av kravene 16-19, hvor interleukin-10-antagonisten er et antistoffmolekyl.

20. Anvendelse ifølge krav 19, hvor antistoffmolekylet er i stand til å bindes til interleukin-10.

21. Anvendelse ifølge hvilket som helst av kravene 16-20, hvor administreringen modulerer minst én av tumornekrosefaktor α, interleukin-6 eller interleukin-1.

22. Anvendelse ifølge hvilket som helst av kravene 16-19, hvor verten er en mus.

23. Anvendelse ifølge krav 22, hvor musen er en NZB/W-mus.


ClaI
EcoRI
RBS
ATG
cDNA -
innføyelse
trpP
EcoRI
lacP
BamHI
XbaI
SalI
PstI
HindIII
TRP C11
AMP r
pUC12
EcoRI
RBS
ClaI
GAATTCCCAGGTTTAACGTAAGGAGGTTTAACCATCGATG

FIGUR 1

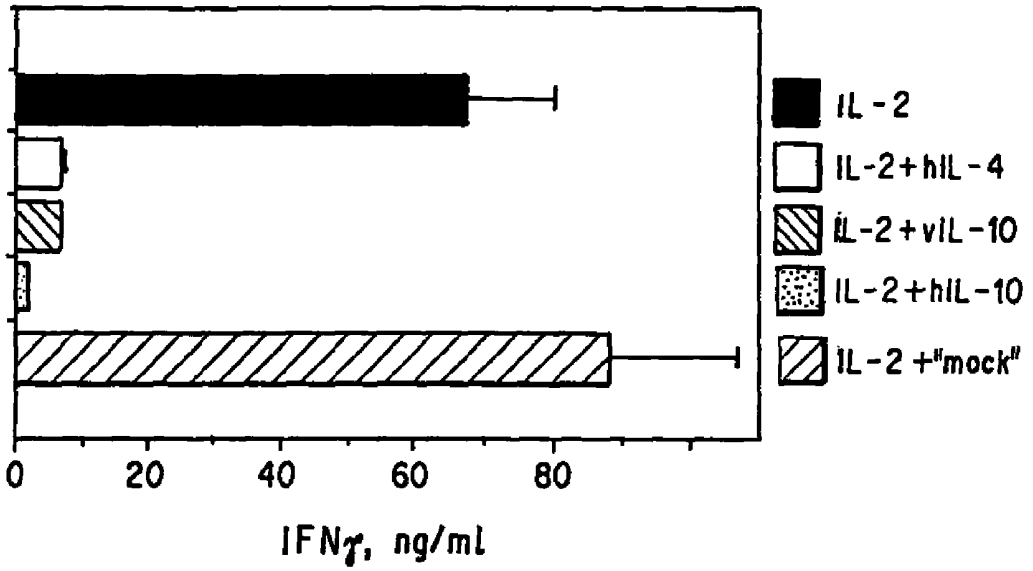

IL-2
IL-2+hIL-4
IL-2+vIL-10
IL-2+hIL-10
IL-2+"mock"
0
20
40
60
80
IFNγ, ng/ml

FIG. 2A

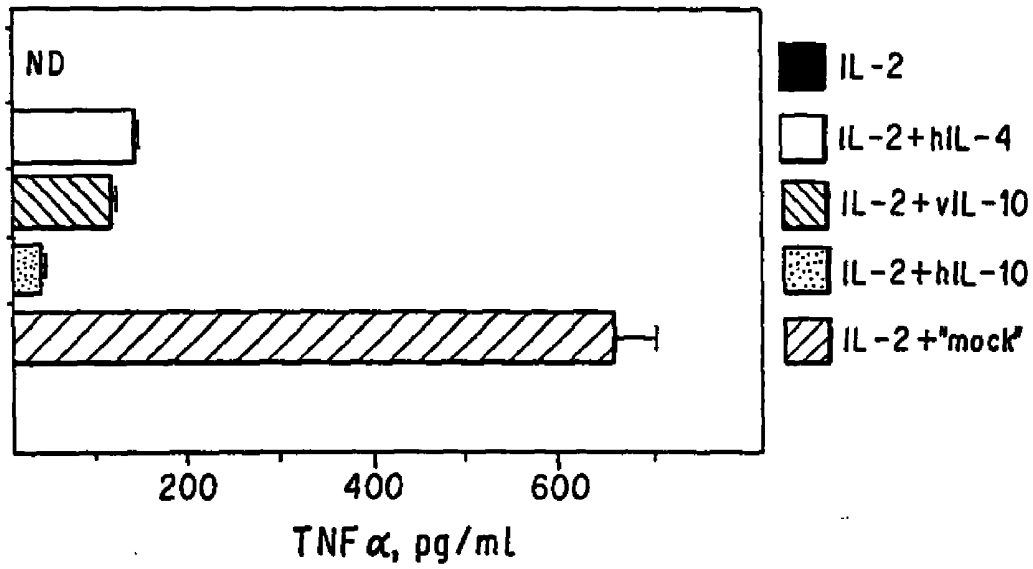

ND
IL-2
IL-2+hIL-4
IL-2+vIL-10
IL-2+hIL-10
IL-2+"mock"
200
400
600
TNFα, pg/ml

FIG. 2B

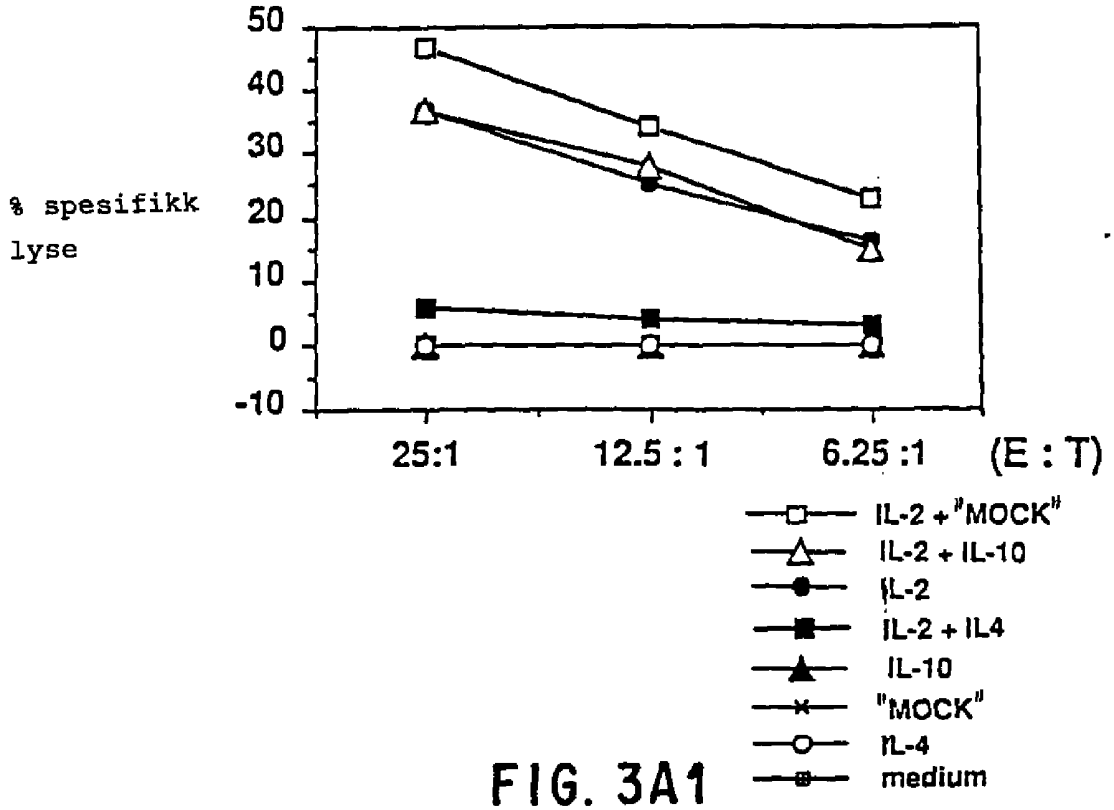


FIG. 3A1

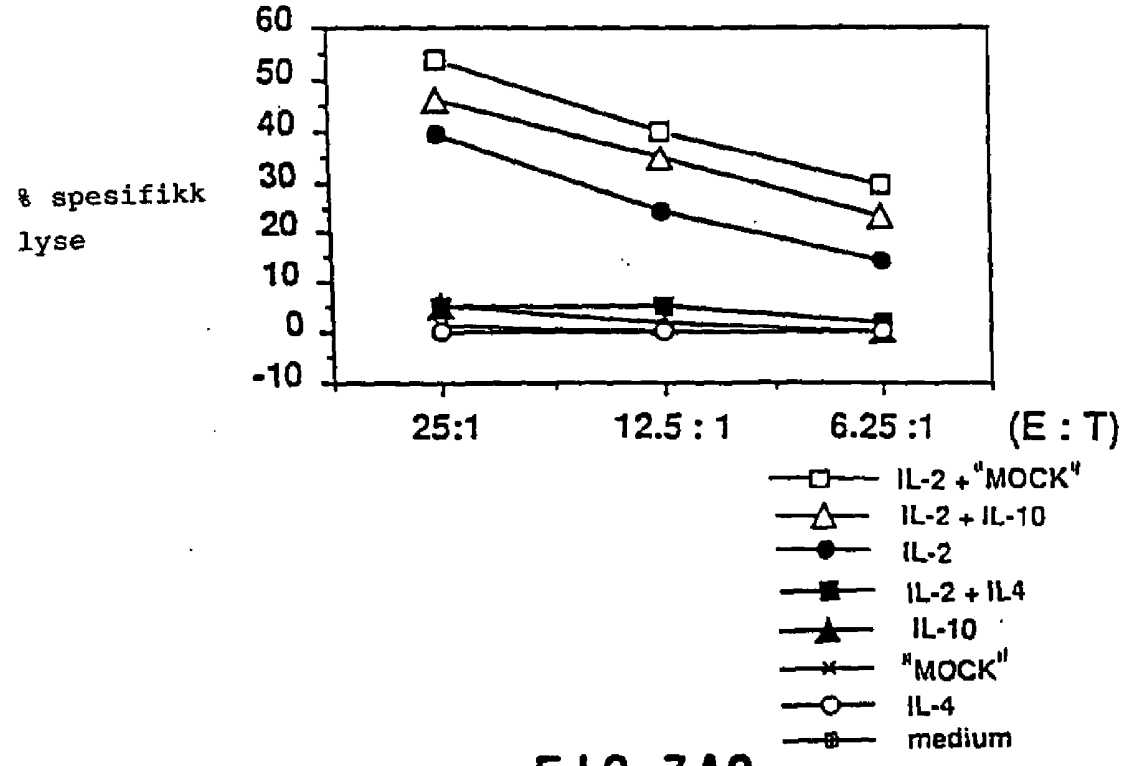
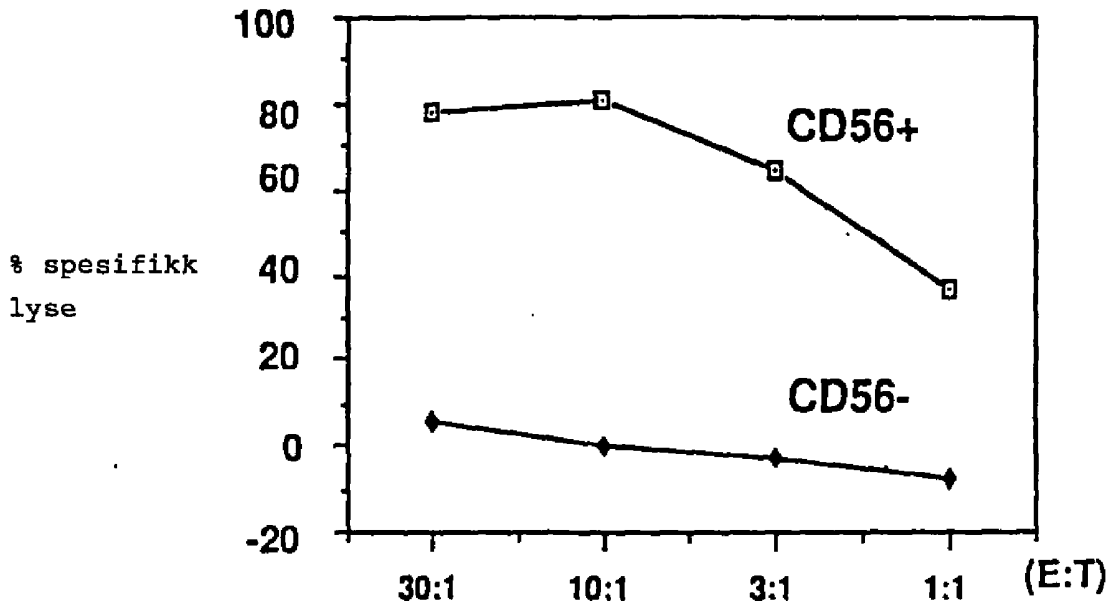
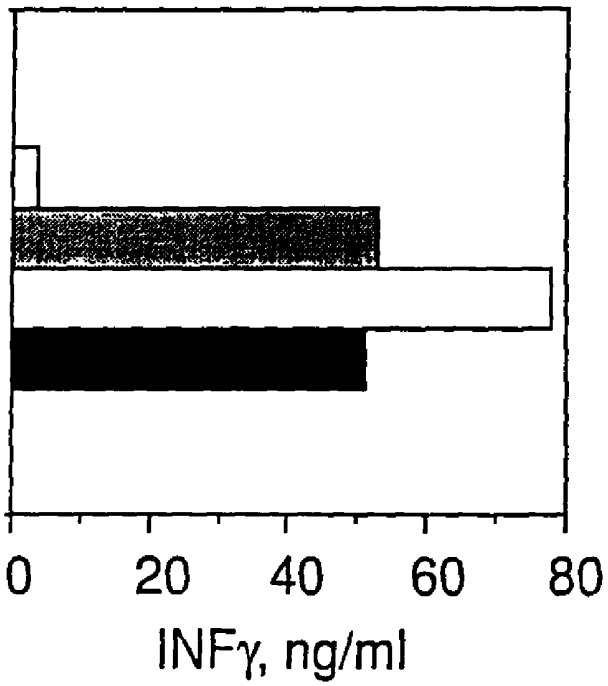


FIG. 3A2



FIGUR 3B



FIGUR 4A

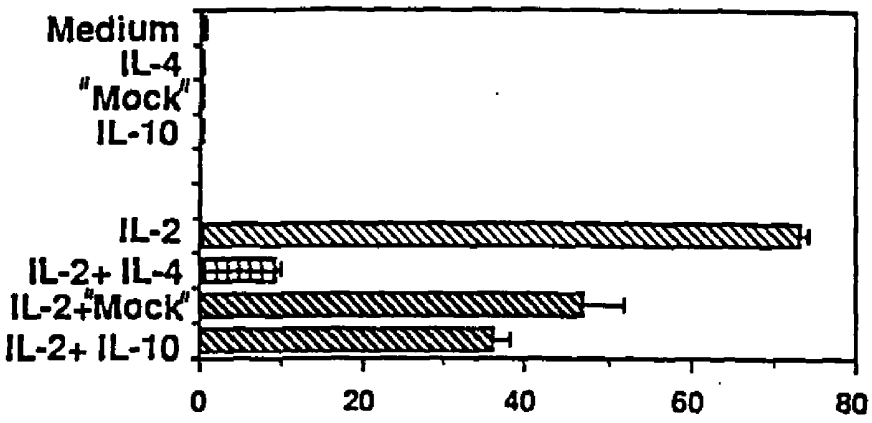


FIG. 4B1

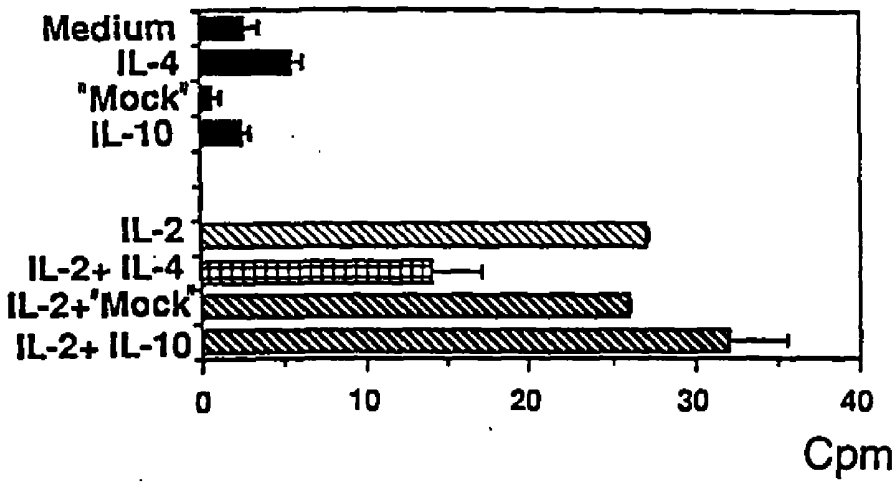


FIG. 4B2

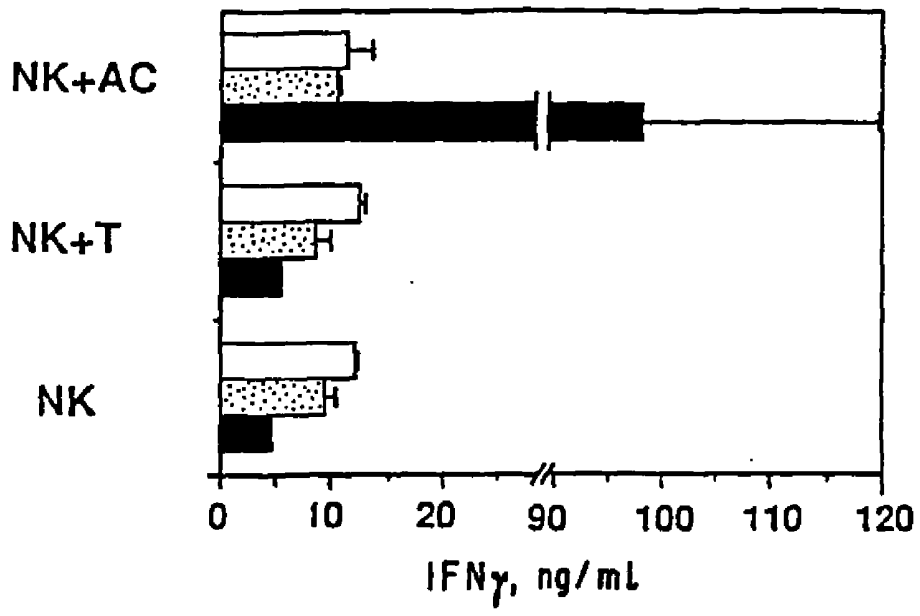

NK+AC
NK+T
NK
0
10
20
90
100
110
120
IFNγ, ng/ml
IL-2+vIL-10
IL-2+hIL-10
IL-2+"mock"

FIG. 5A

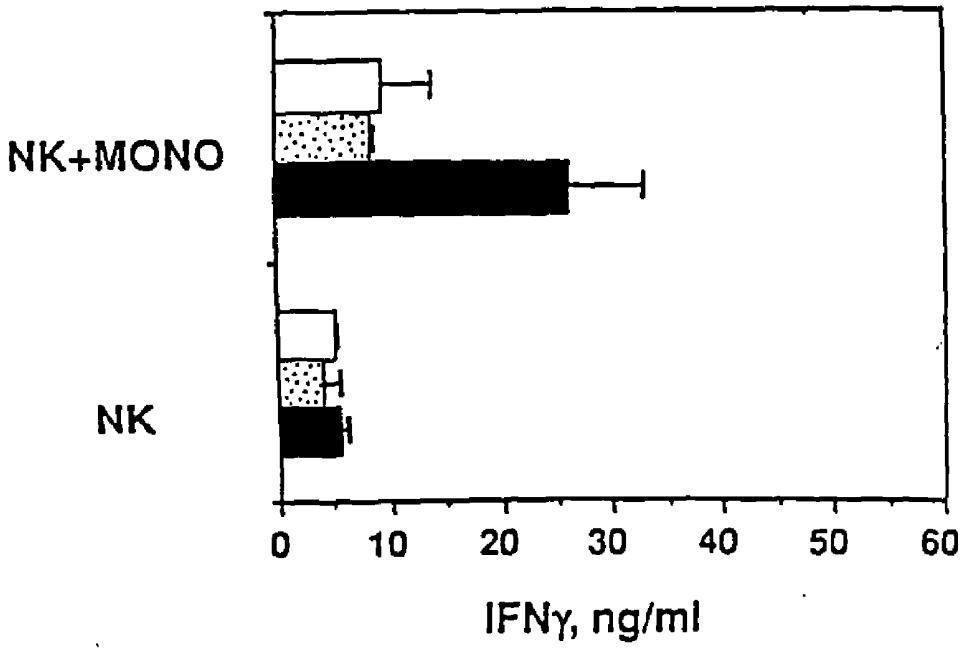
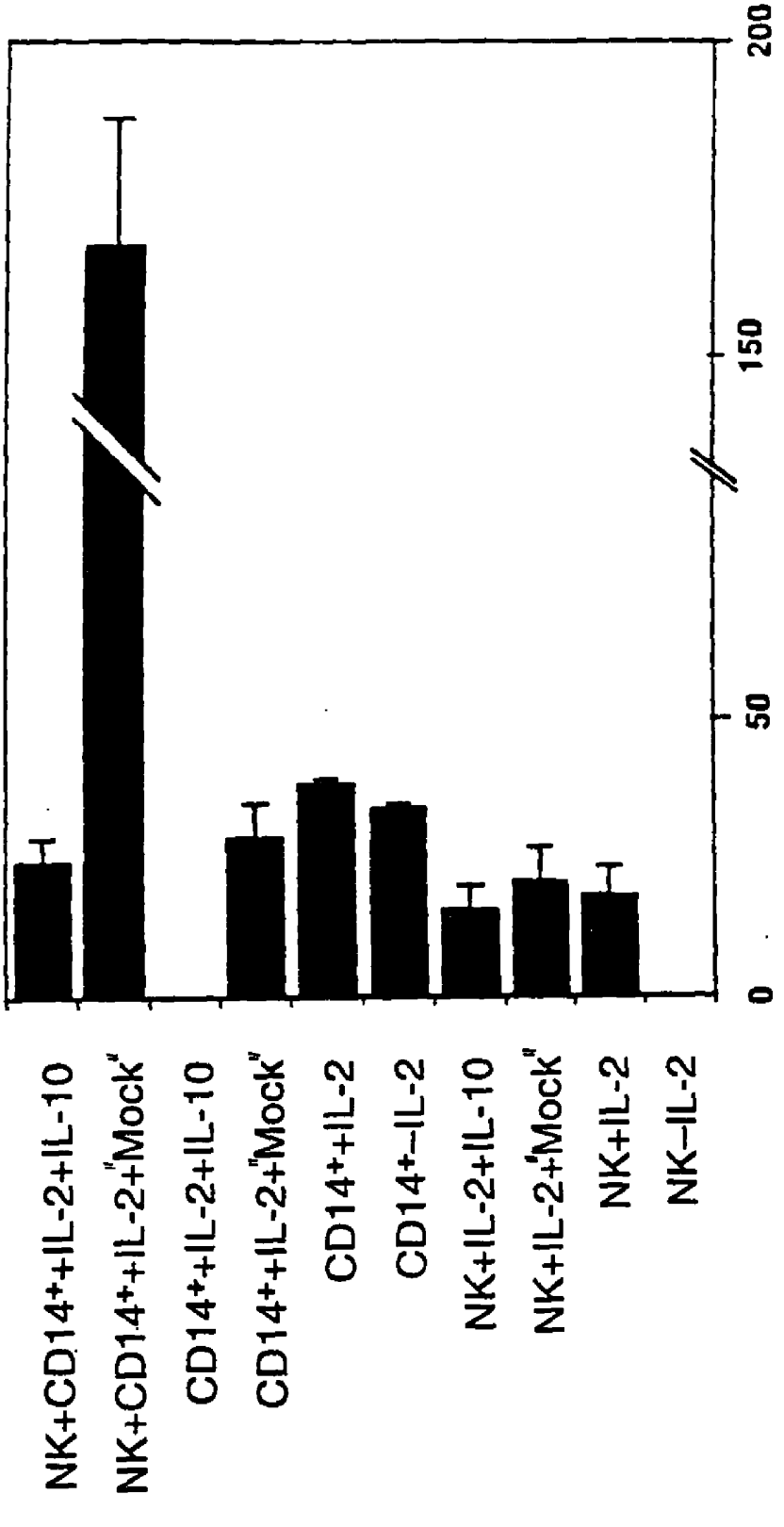

NK+MONO
NK
0
10
20
30
40
50
60
IFNγ, ng/ml
IL-2+vIL-10
IL-2+hIL-10
IL-2+"mock"

FIG. 5B


NK+CD14++IL-2+IL-10
NK+CD14++IL-2+"Mock"
CD14++IL-2+IL-10
CD14++IL-2+"Mock"
CD14++IL-2
CD14+–IL-2
NK+IL-2+IL-10
NK+IL-2+"Mock"
NK+IL-2
NK–IL-2
0
50
150
200
TNF-α, pg/ml

FIGUR 5C

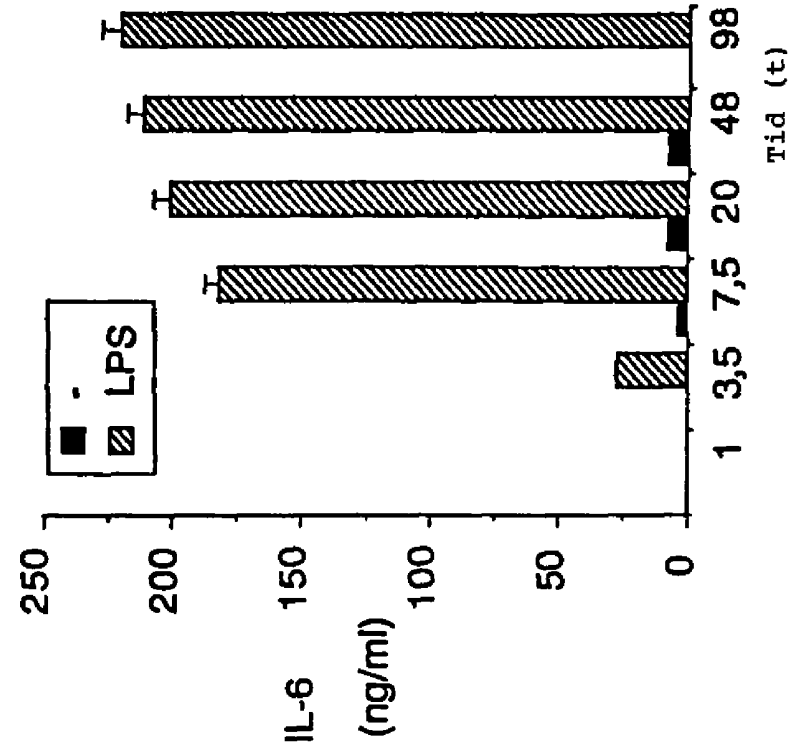

250
200
150
100
50
0
IL-6 (ng/ml)
- LPS
1 3,5 7,5 20 48 98
Tid (t)

FIG. 6B

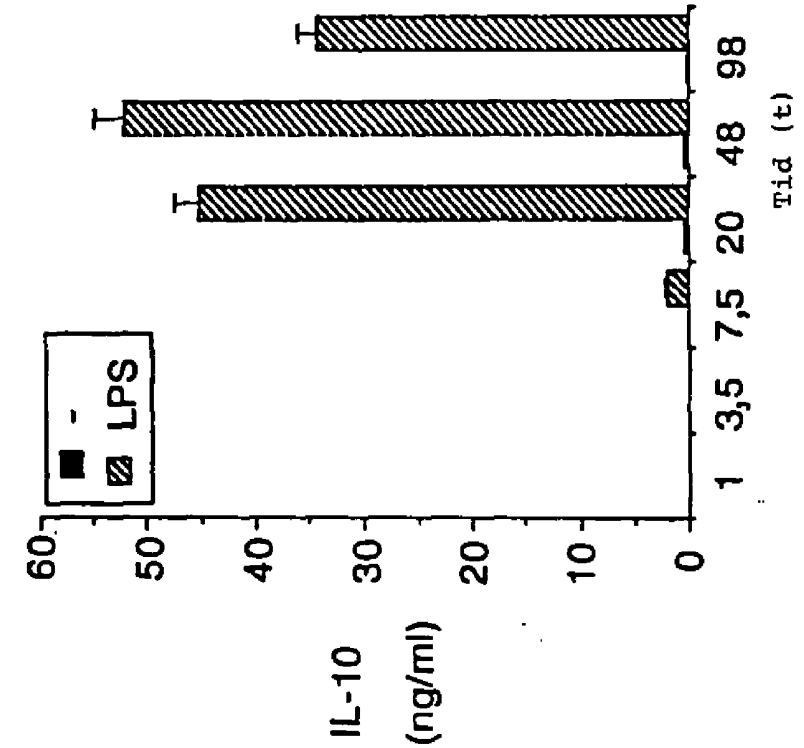

60
50
40
30
20
10
0
IL-10 (ng/ml)
- LPS
1 3,5 7,5 20 48 98
Tid (t)

FIG. 6A

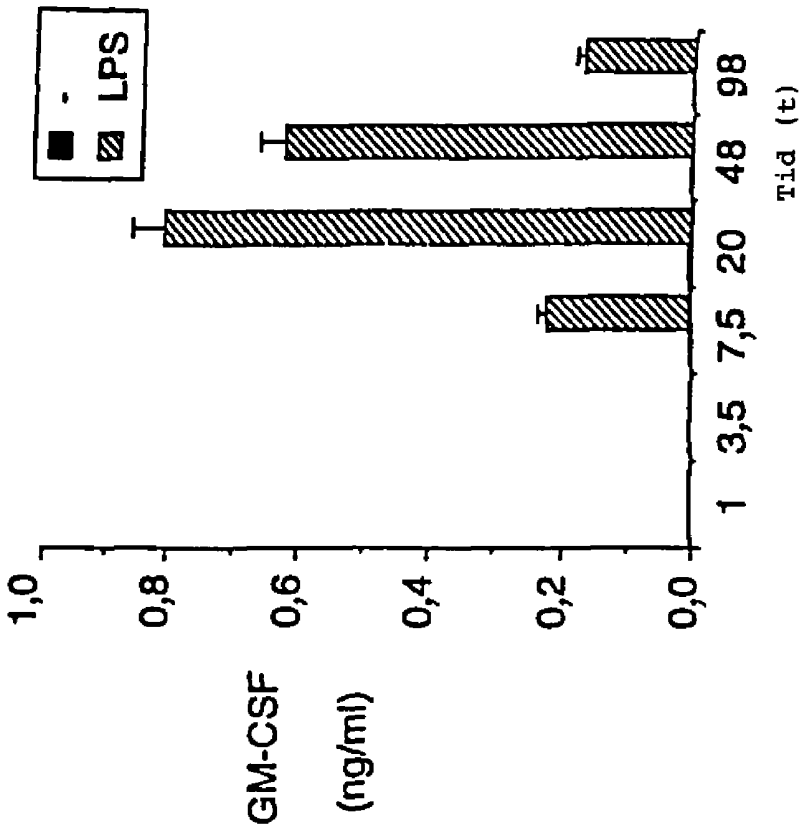

GM-CSF
(ng/ml)
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
1
3,5
7,5
20
48
98
Tid (t)
-
LPS

FIG. 6D

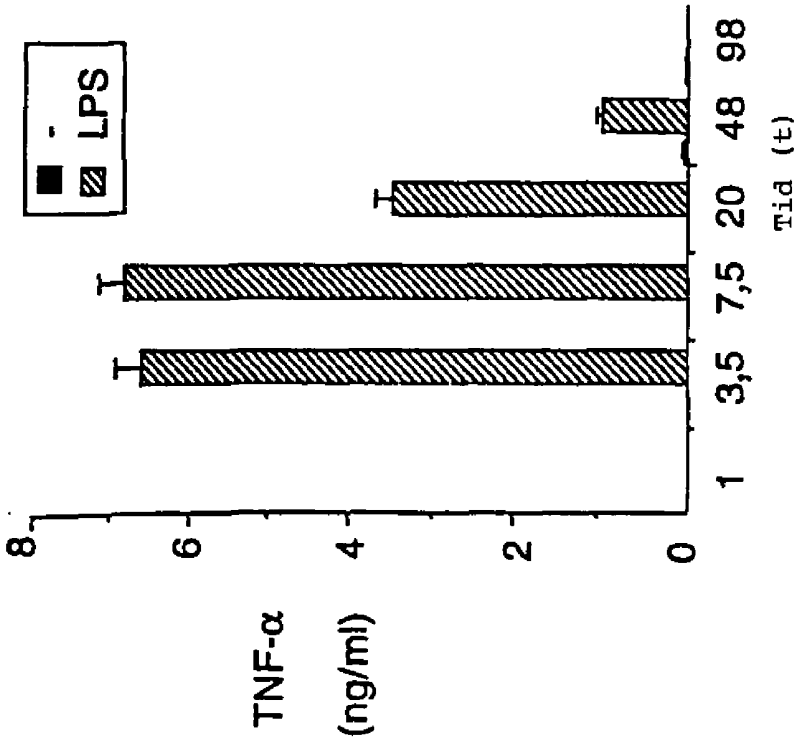
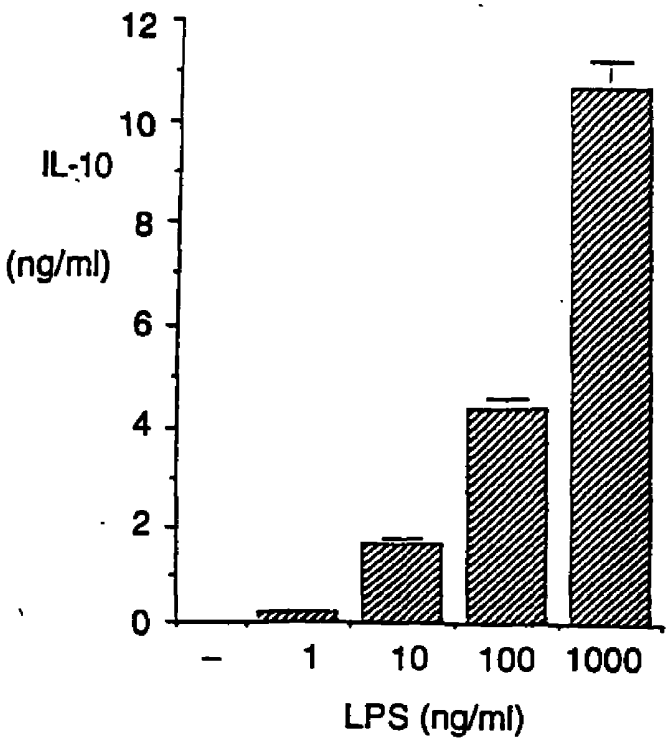

TNF-α
(ng/ml)
8
6
4
2
0
1
3,5
7,5
20
48
98
Tid (t)
-
LPS

FIG. 6C



FIGUR 7

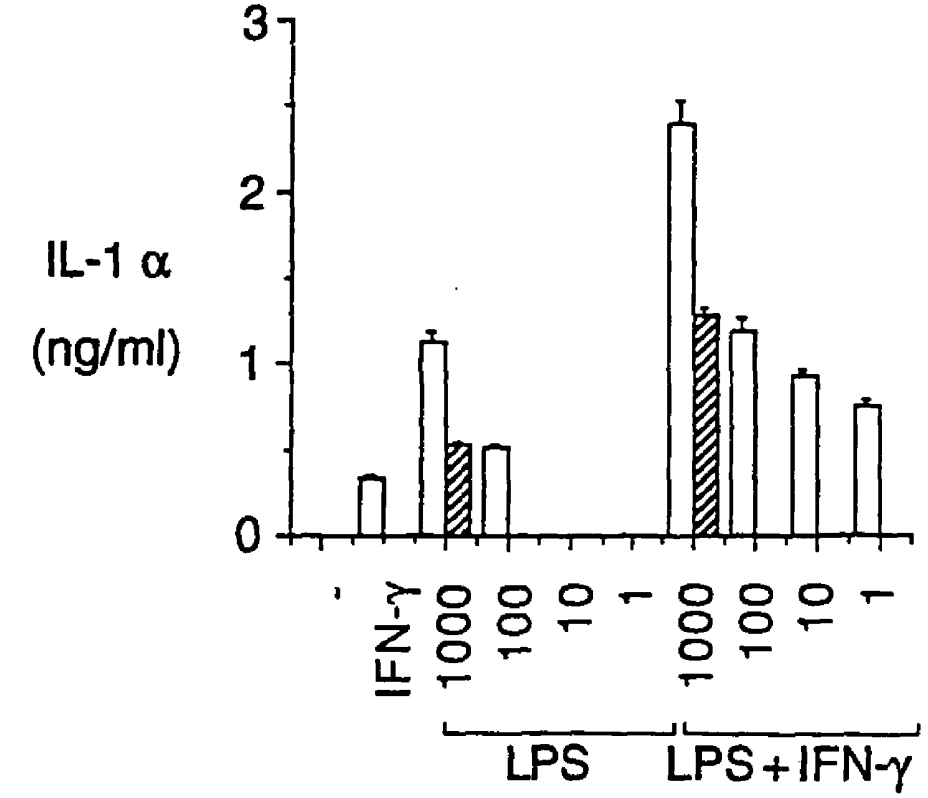

IL-1 α
(ng/ml)
3
2
1
0
-
IFN-γ
1000
100
10
1
1000
100
10
1
LPS
LPS+IFN-γ

FIG. 8A

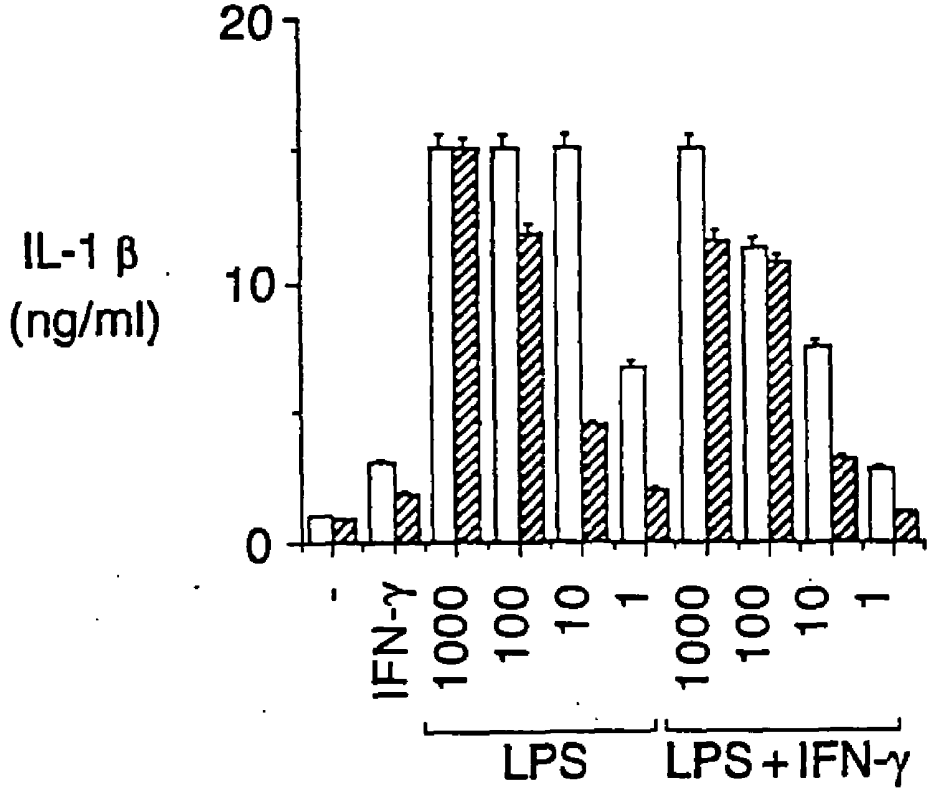

IL-1 β
(ng/ml)
20
10
0
-
IFN-γ
1000
100
10
1
1000
100
10
1
LPS
LPS+IFN-γ

FIG. 8B

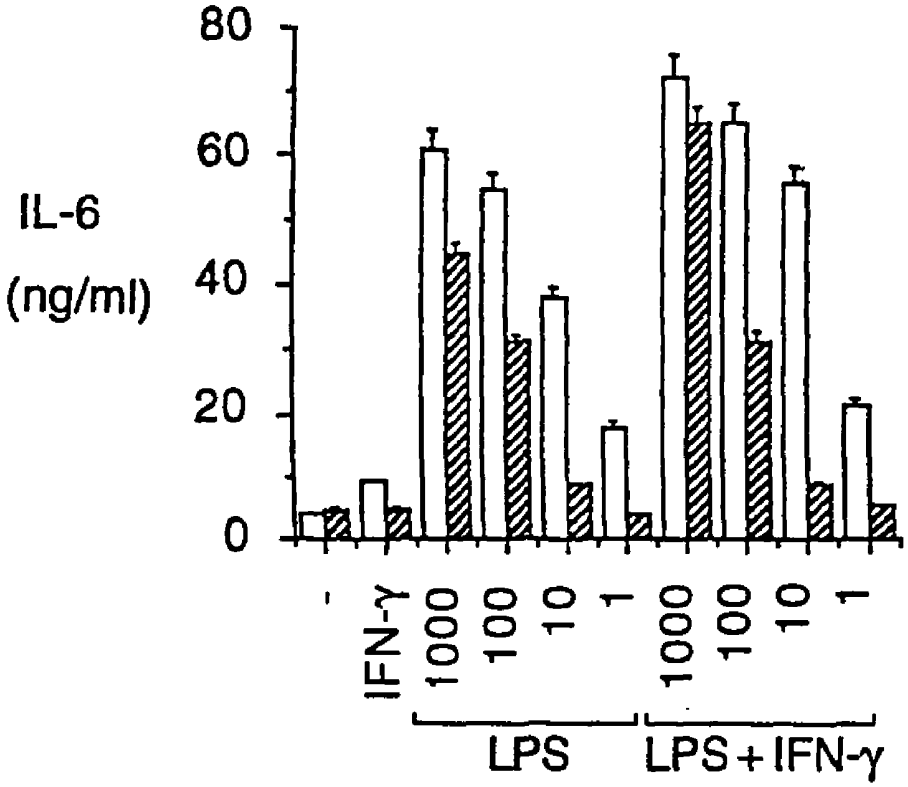

80
60
40
20
0
IL-6
(ng/ml)
-
IFN-γ
1000
100
10
1
1000
100
10
1
LPS
LPS+IFN-γ

FIG. 8C

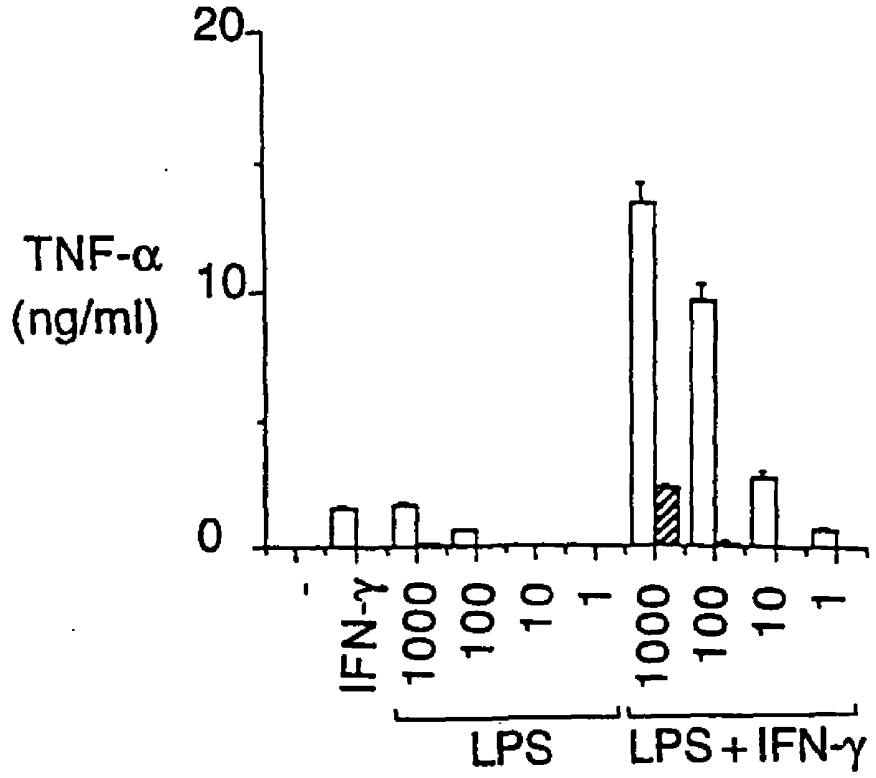

20
10
0
TNF-α
(ng/ml)
-
IFN-γ
1000
100
10
1
1000
100
10
1
LPS
LPS+IFN-γ

FIG. 8D

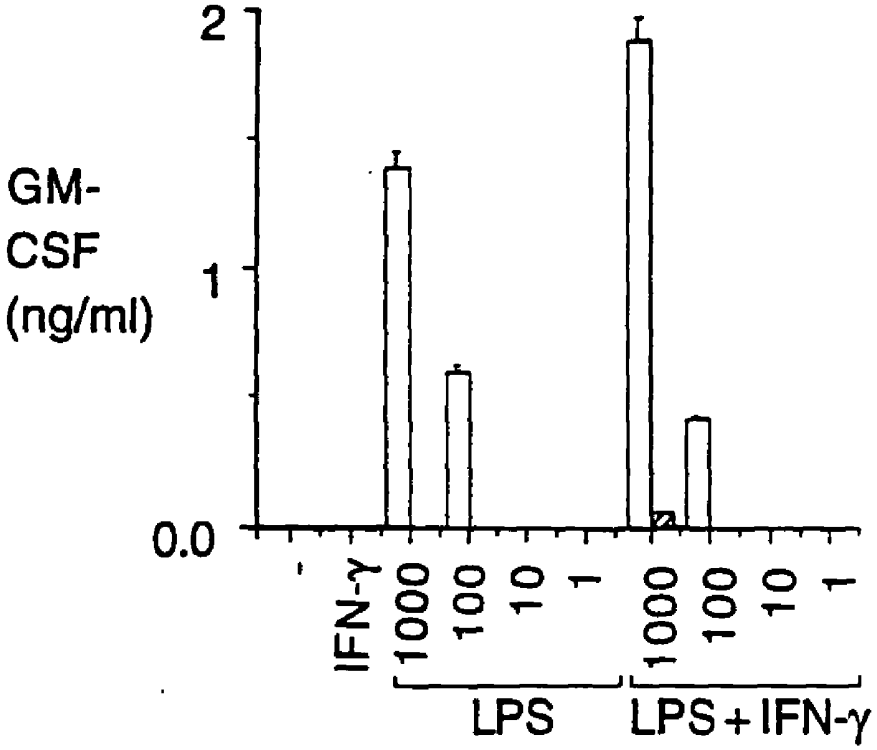


FIG. 8E

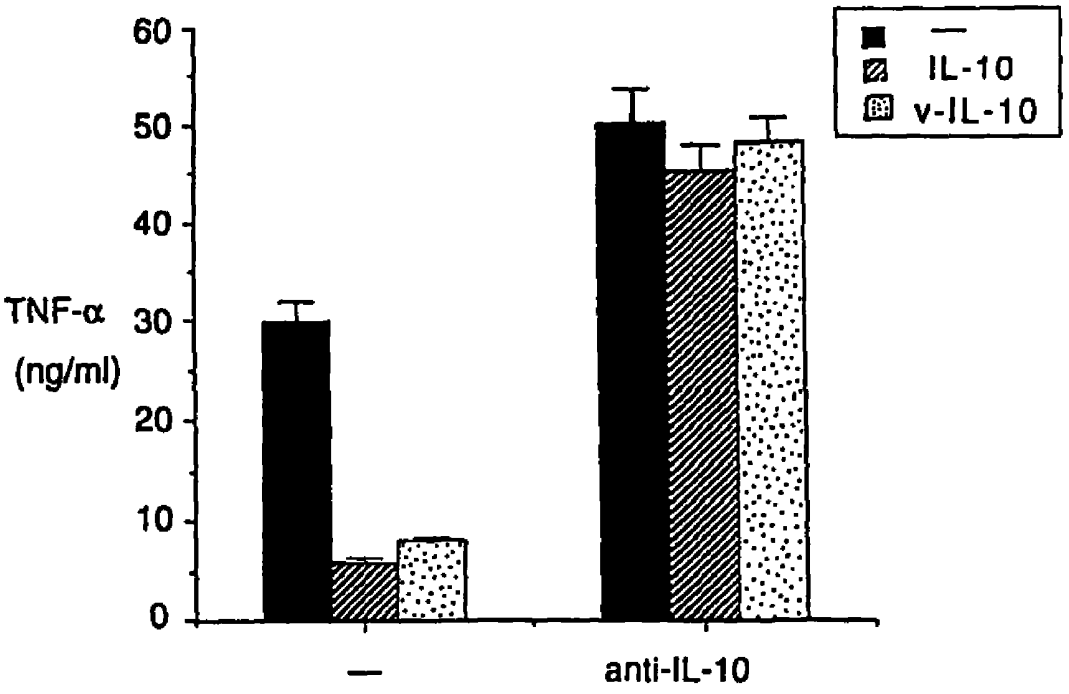

60
50
40
30
20
10
0
TNF-α
(ng/ml)
—
IL-10
v-IL-10
—
anti-IL-10

FIG. 9A

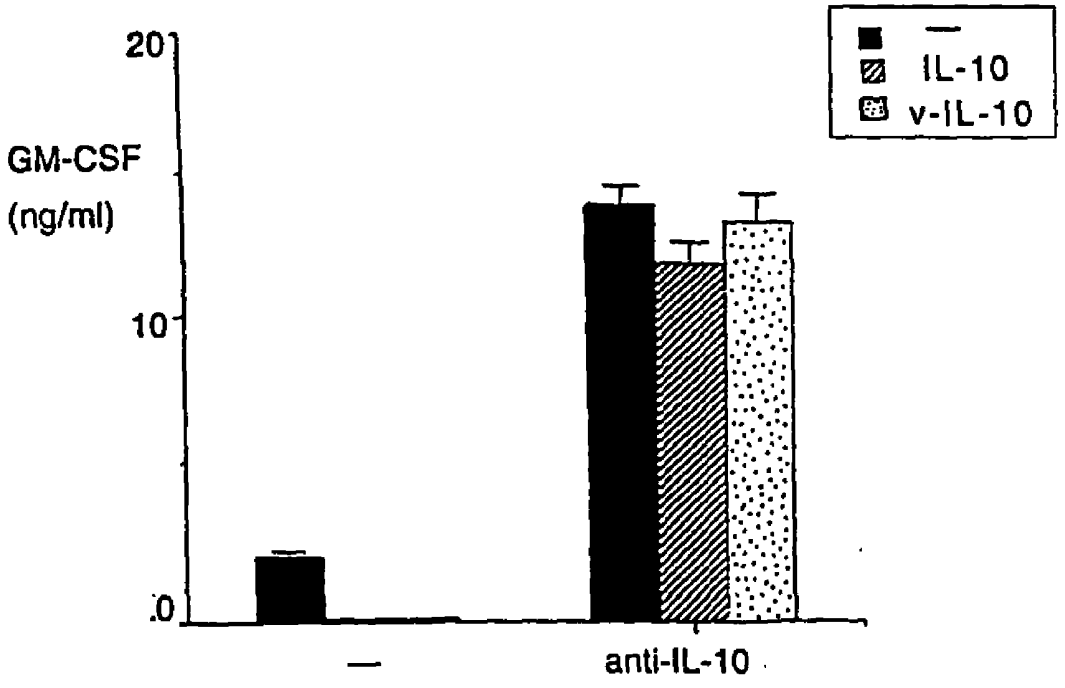

20
10
0
GM-CSF
(ng/ml)
—
IL-10
v-IL-10
—
anti-IL-10

FIG. 9B

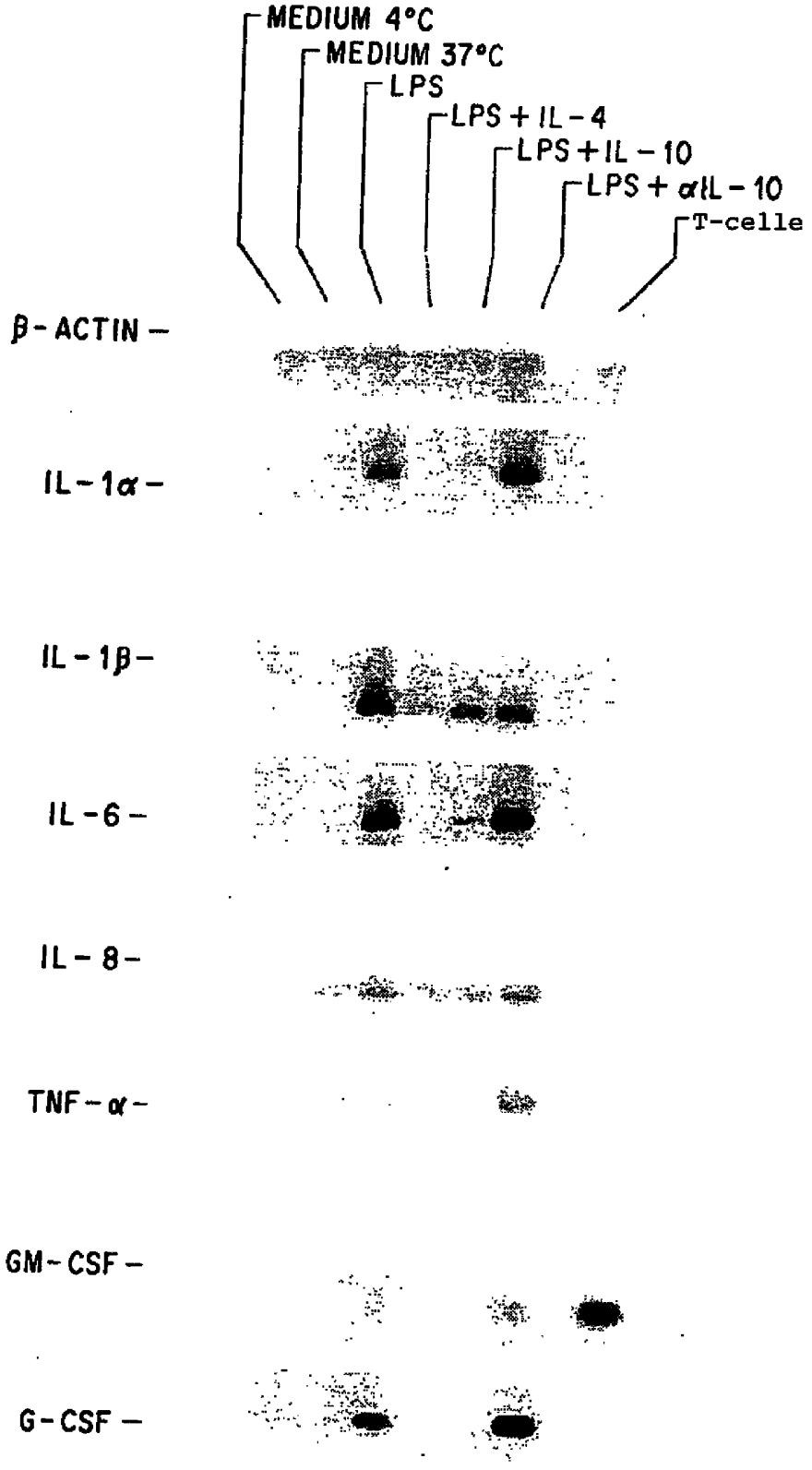

MEDIUM 4°C
MEDIUM 37°C
LPS
LPS + IL-4
LPS + IL-10
LPS + αIL-10
T-celle
β-ACTIN
IL-1α
IL-1β
IL-6
IL-8
TNF-α
GM-CSF
G-CSF

FIG. 10

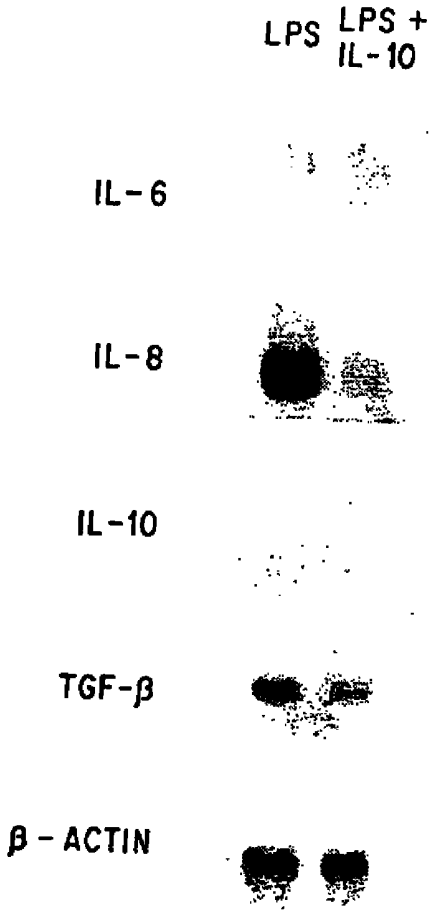


FIG. 11

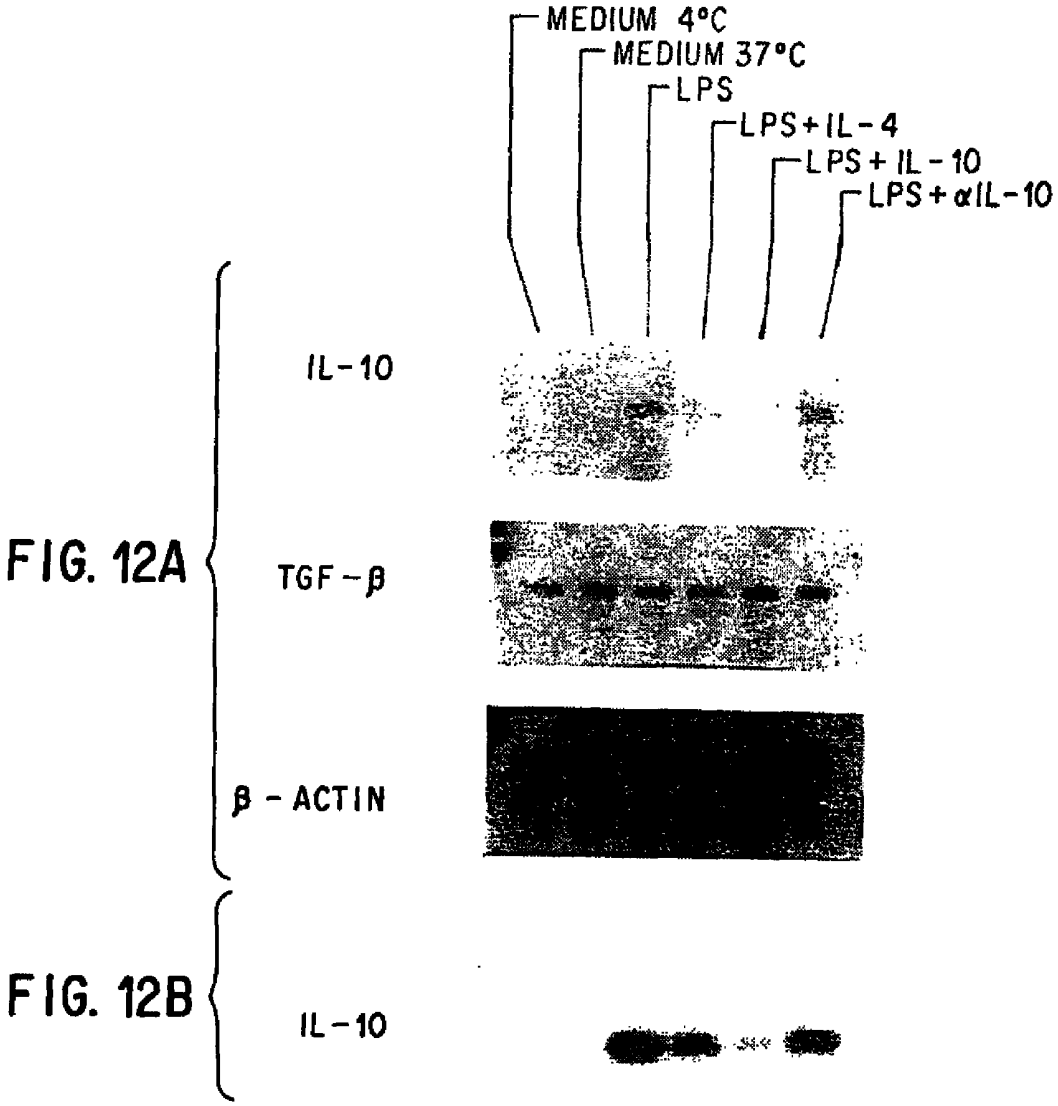


FIG. 12A

FIG. 12B

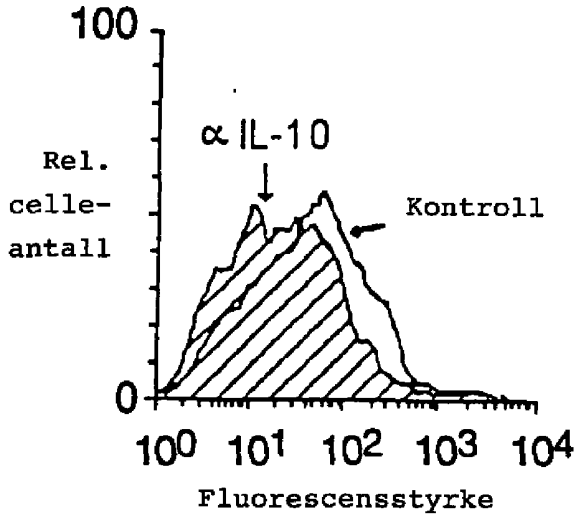


FIG. 13A

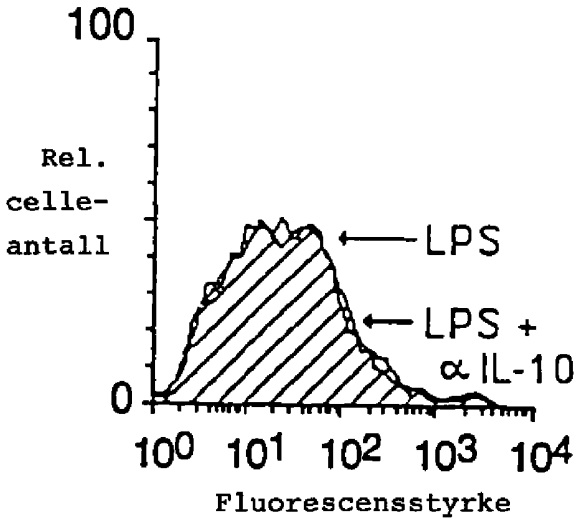


FIG. 13B

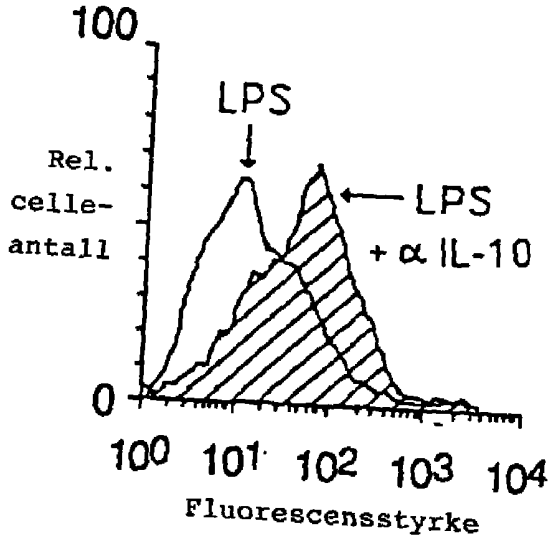


FIG. 13C

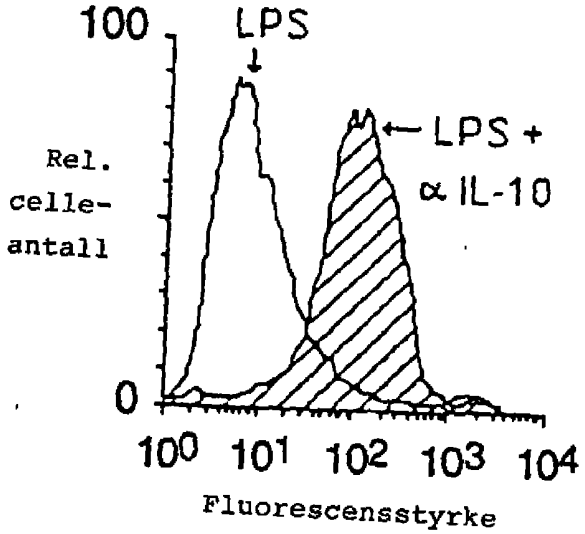


FIG. 13D

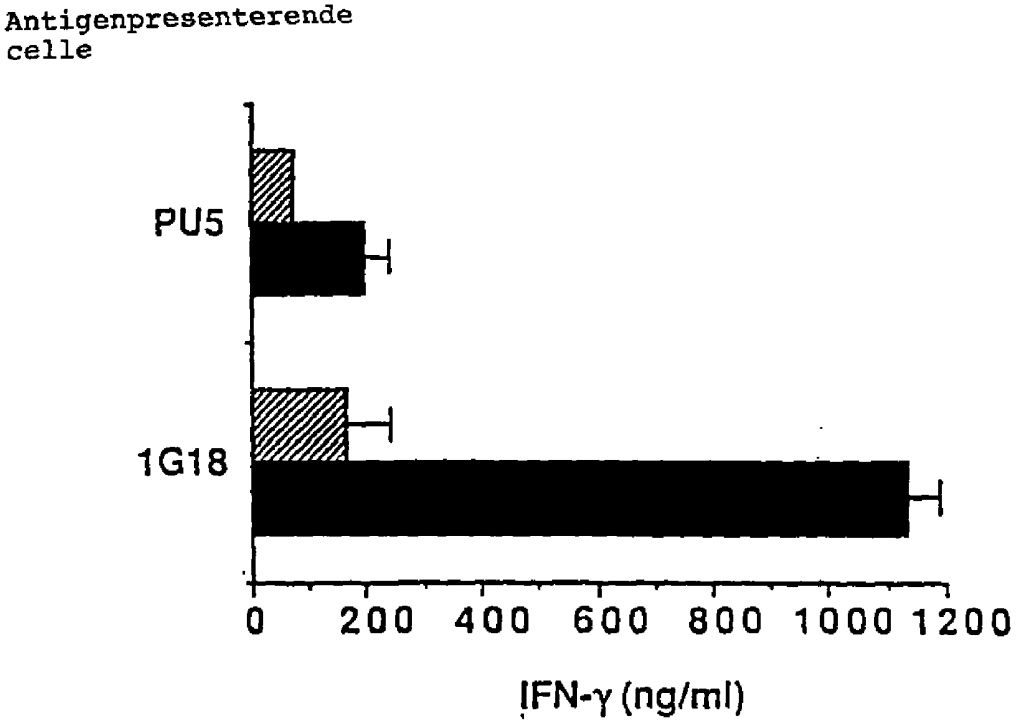


FIG. 14A

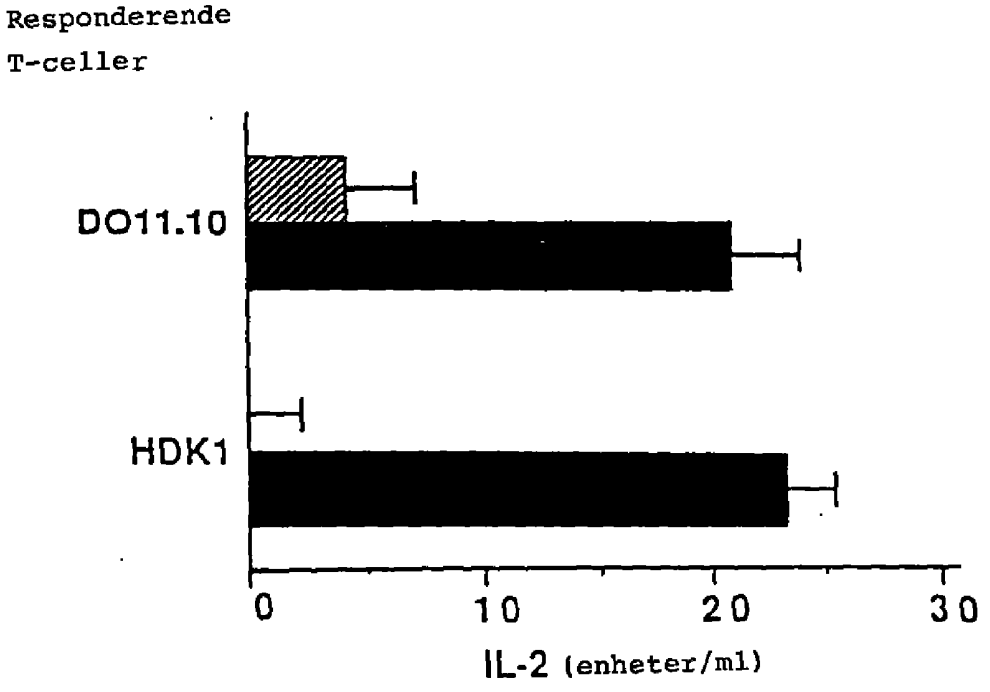


FIG. 14B

FIG. 15A

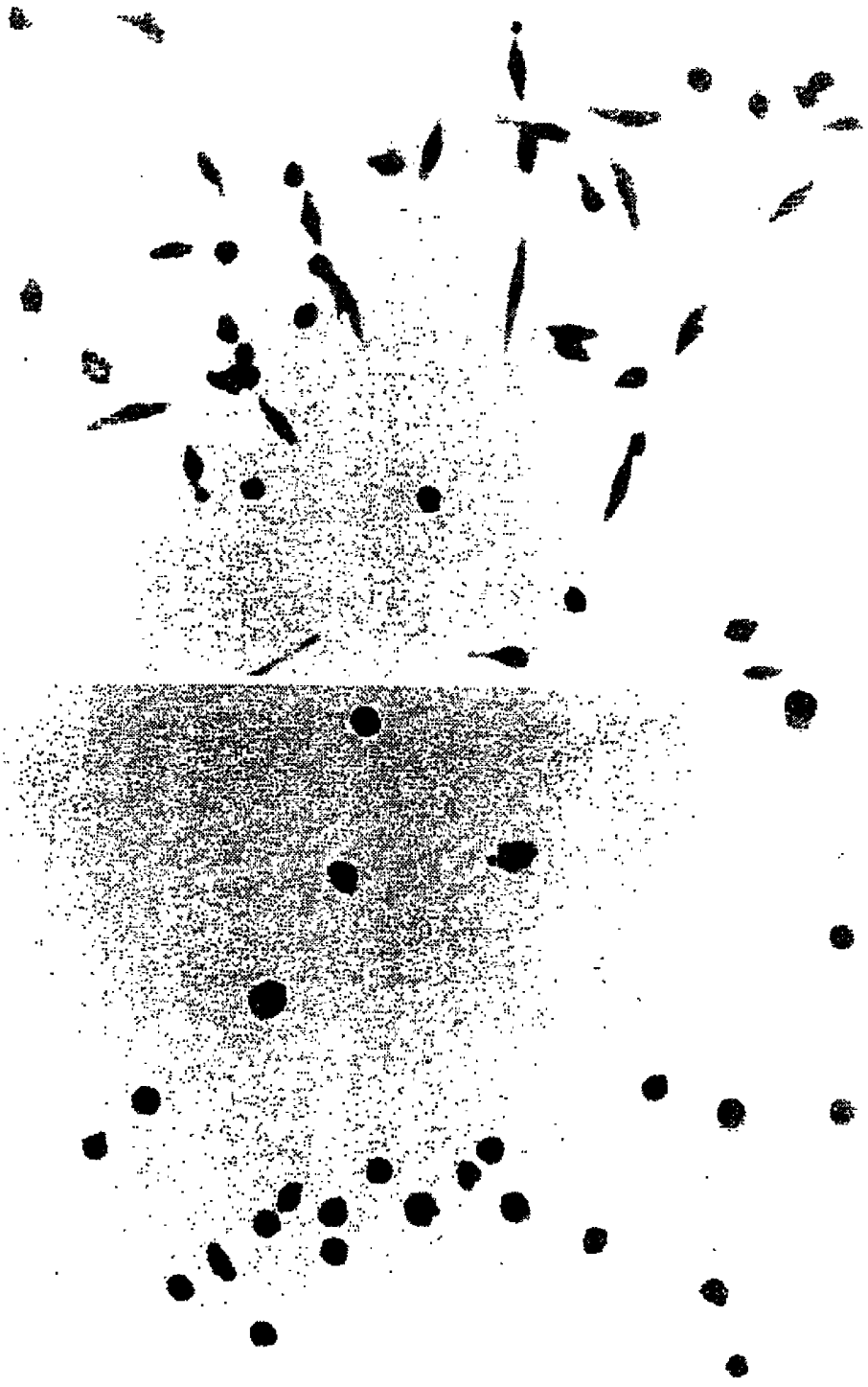
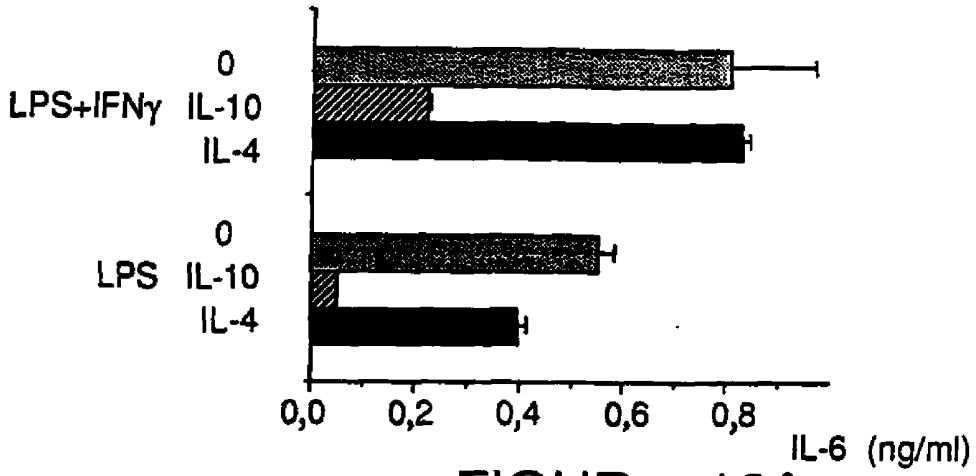
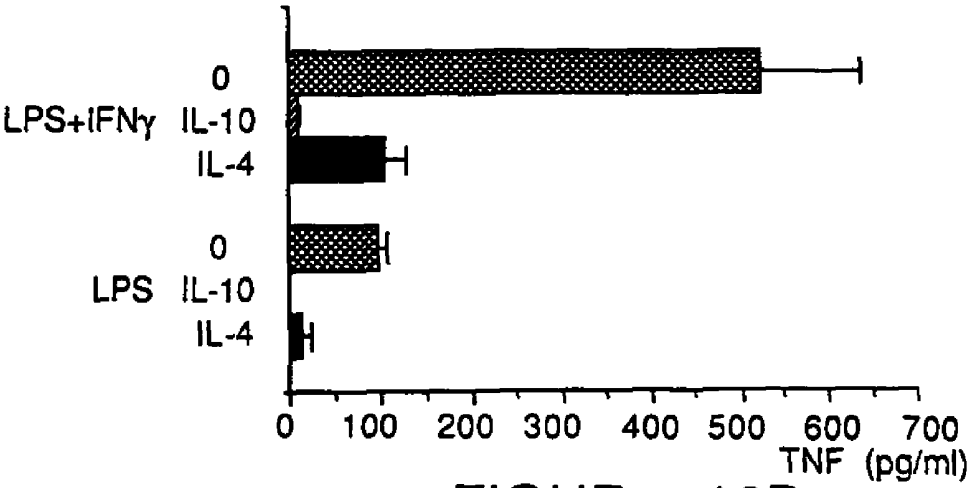


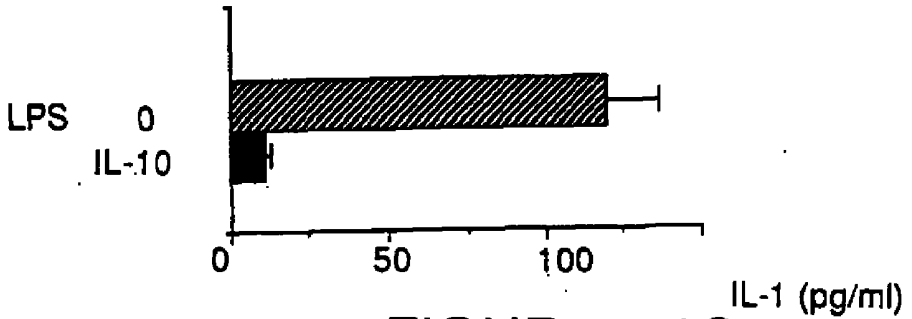
FIG. 15B



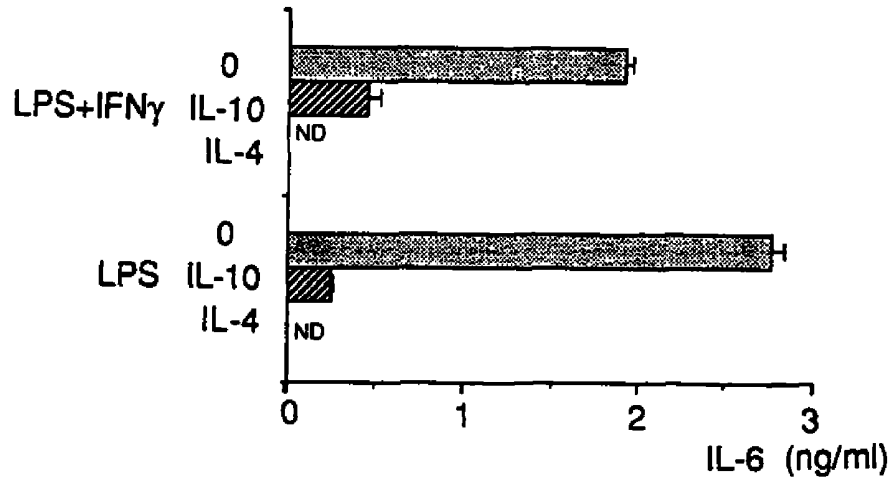
FIGUR 16A



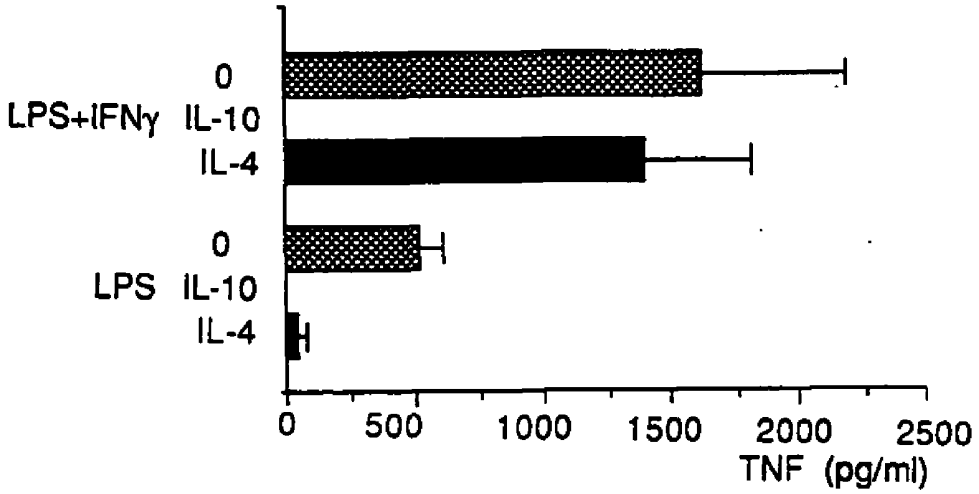
FIGUR 16B



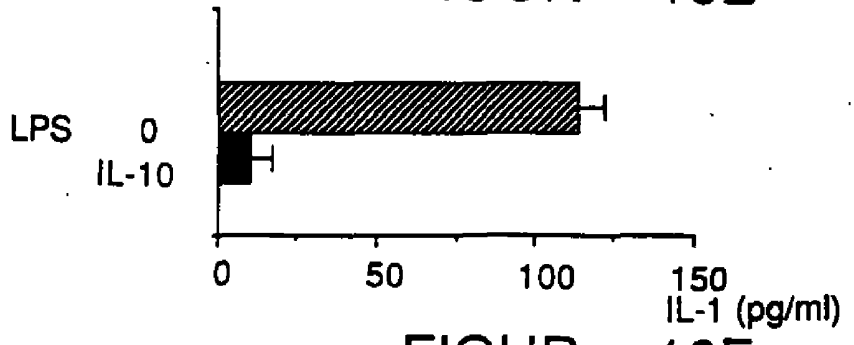
FIGUR 16C



FIGUR 16D



FIGUR 16E



FIGUR 16F

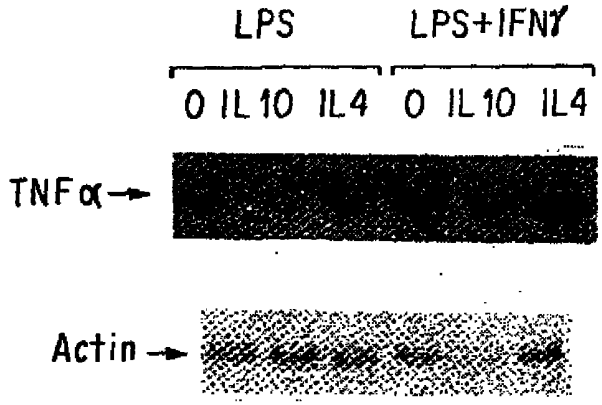


FIG. 17A

HPRT-ekspresjonsnivå

cDNA-		0		IL-4		IL-10	
	fortynnings-faktor	CPM	*	CPM	*	CPM	*
LPS + IFNγ	1:9	19831	1x	14993	1,35	22203	0,89
	1:27	12196	1x	9496	1,28	14478	0,84
	1:81	5595	1x	6002	0,93	7322	0,76
LPS	1:9	16197	1x	16485	0,98	20925	0,77
	1:27	7521	1x	9609	0,78	12676	0,59
	1:81	3924	1x	4694	0,84	5507	0,71

P388D1 Total-RNA

Mean CPM	Pg/dot
16212	1111
8309	370
3791	123
2037	41
1181	14

*Korreksjonsfaktor

FIGUR 17B1

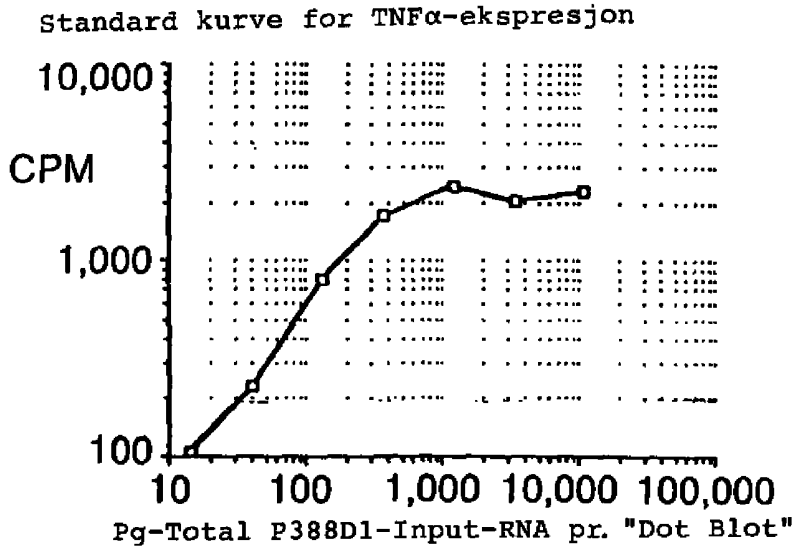
TNFα-ekspresjonsfaktor

cDNA -		0			IL-4			IL-10		
fortynnings-faktor		CPM	*	*pgRNA	CPM	*CPM	*pgRNA	CPM	*CPM	*pgRNA
LPS + IFNγ	1:9	1260	1x	300	1987	2682	Plateau	1232	1034	200
	1:27	984	1x	160	601	769	110	713	589	90
	1:81	722	1x	110	358	332	57	411	312	50
LPS	1:9	1114	1x	210	1620	1587	330	1387	1068	200
	1:27	896	1x	120	517	403	60	460	271	45
	1:81	472	1x	72	480	403	60	310	220	33

*Korreksjonsfaktor

P388D1 Total-RNA

Gjennom-snitt-CPM	Pg/dot"
2174	10,000
1956	3,333
2253	1,111
1668	370
802	123
233	41
109	14



FIGUR 17B2

HPRT-ekspresjonsnivå

	cDNA-fortynningsfaktor
LPS + IFNγ	1:9
	1:27
	1:81
LPS	1:9
	1:27
	1:81

TNFα-ekspresjonsnivå

P388D1 Gjennomsnitt-CPM	Total RNA-Pg/Dot
3292	3333
2260	1111
1008	370
682	123
493	41
121	14
31	0

HPRT-ekspresjonsnivå

	cDNA-fortynningsfaktor
LPS + IFNγ	1
	1:3
	1:9
LPS	1
	1:3
	1:9

IL-6-ekspresjonsnivå

P388D1 Gjennomsnitt-CPM	Total RNA-Pg/Dot
617	3333
602	1111
213	370
158	123
55	41
21	14
19,5	0

FIGUR 17C

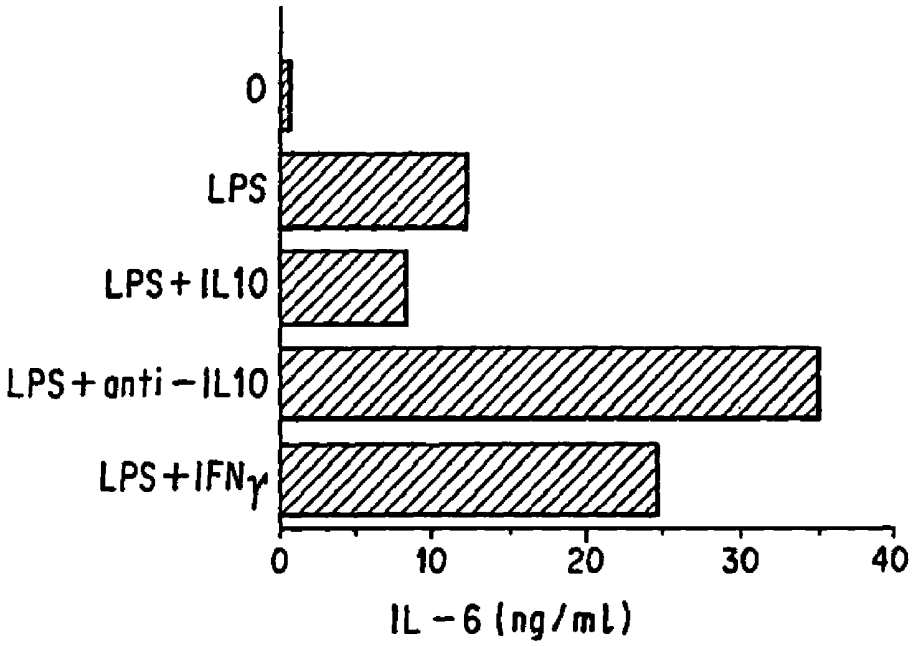


FIG. 18A

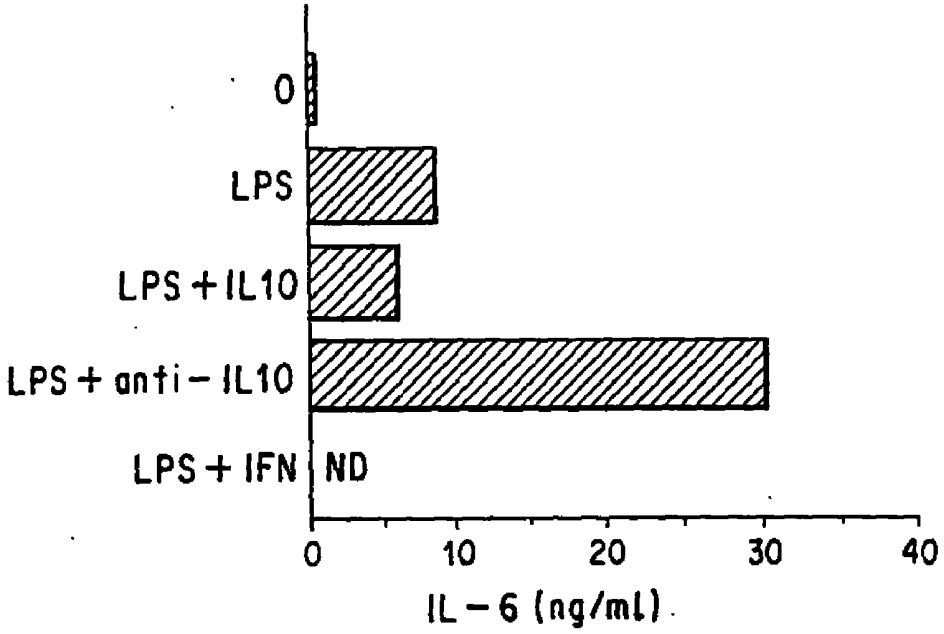


FIG. 18B

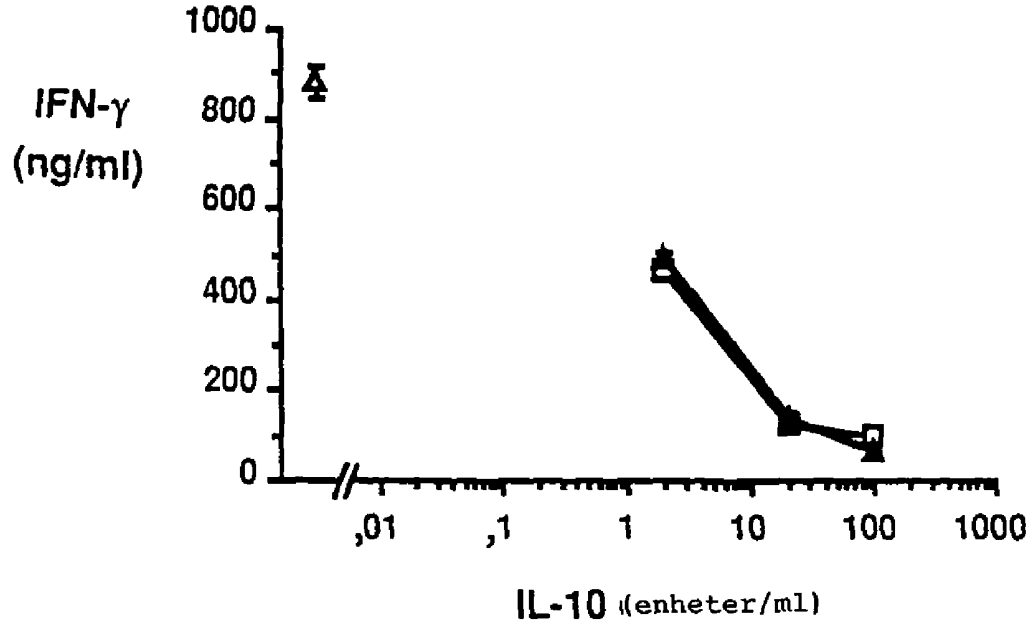


FIG. 19A

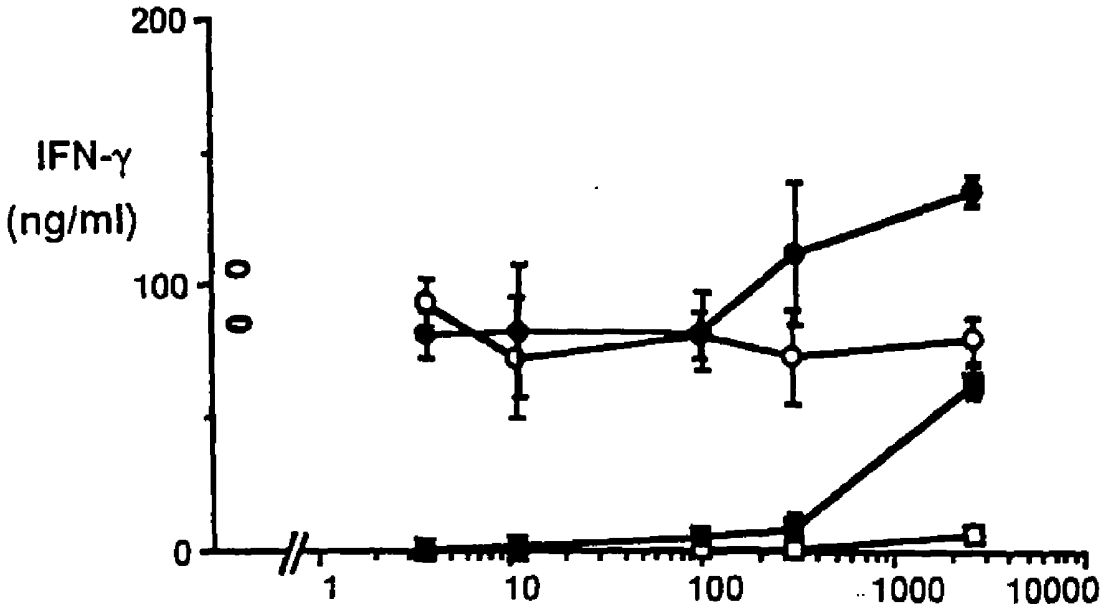
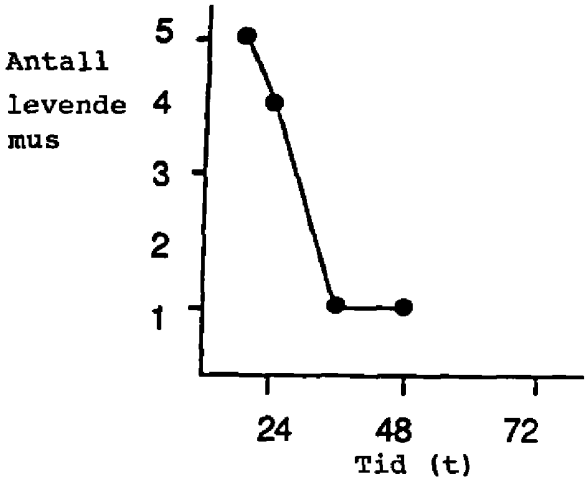
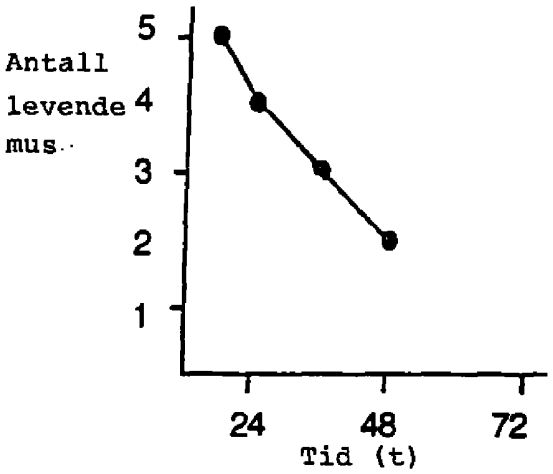


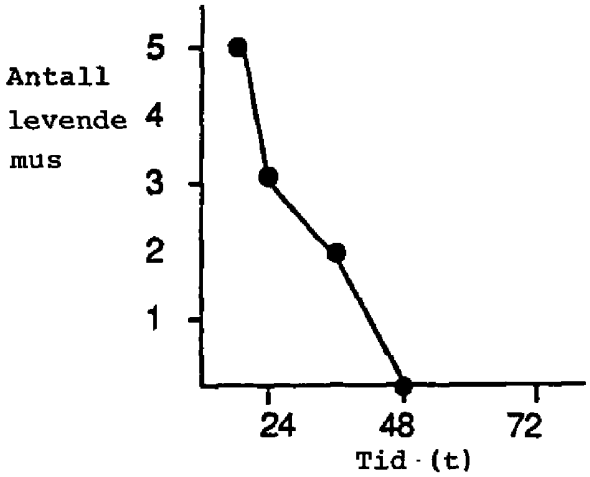
FIG. 19B



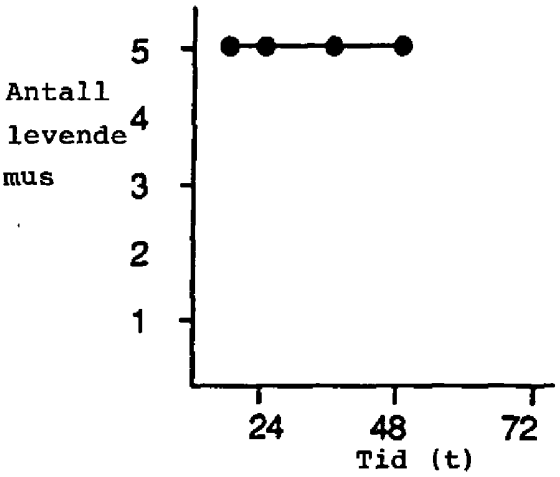
FIGUR 20A



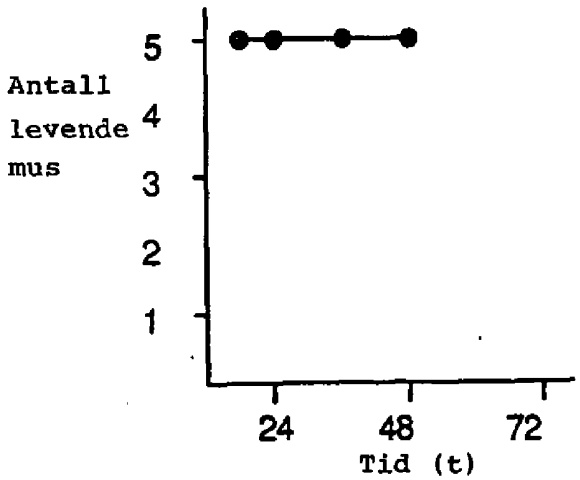
FIGUR 20B



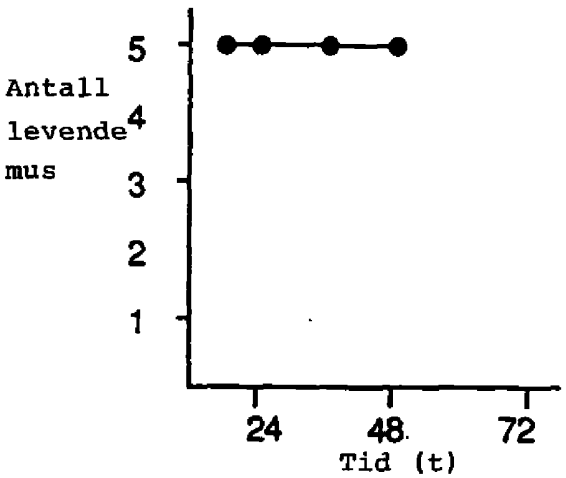
FIGUR 20C



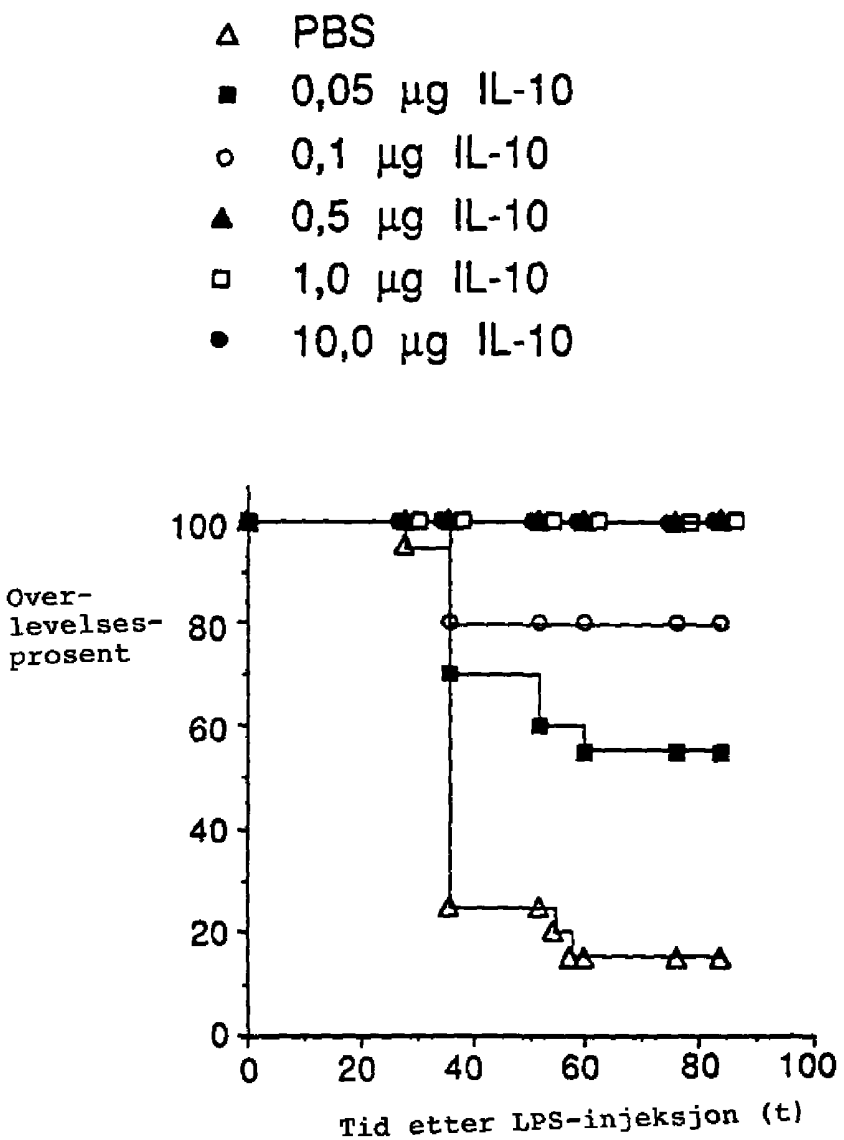
FIGUR 20D



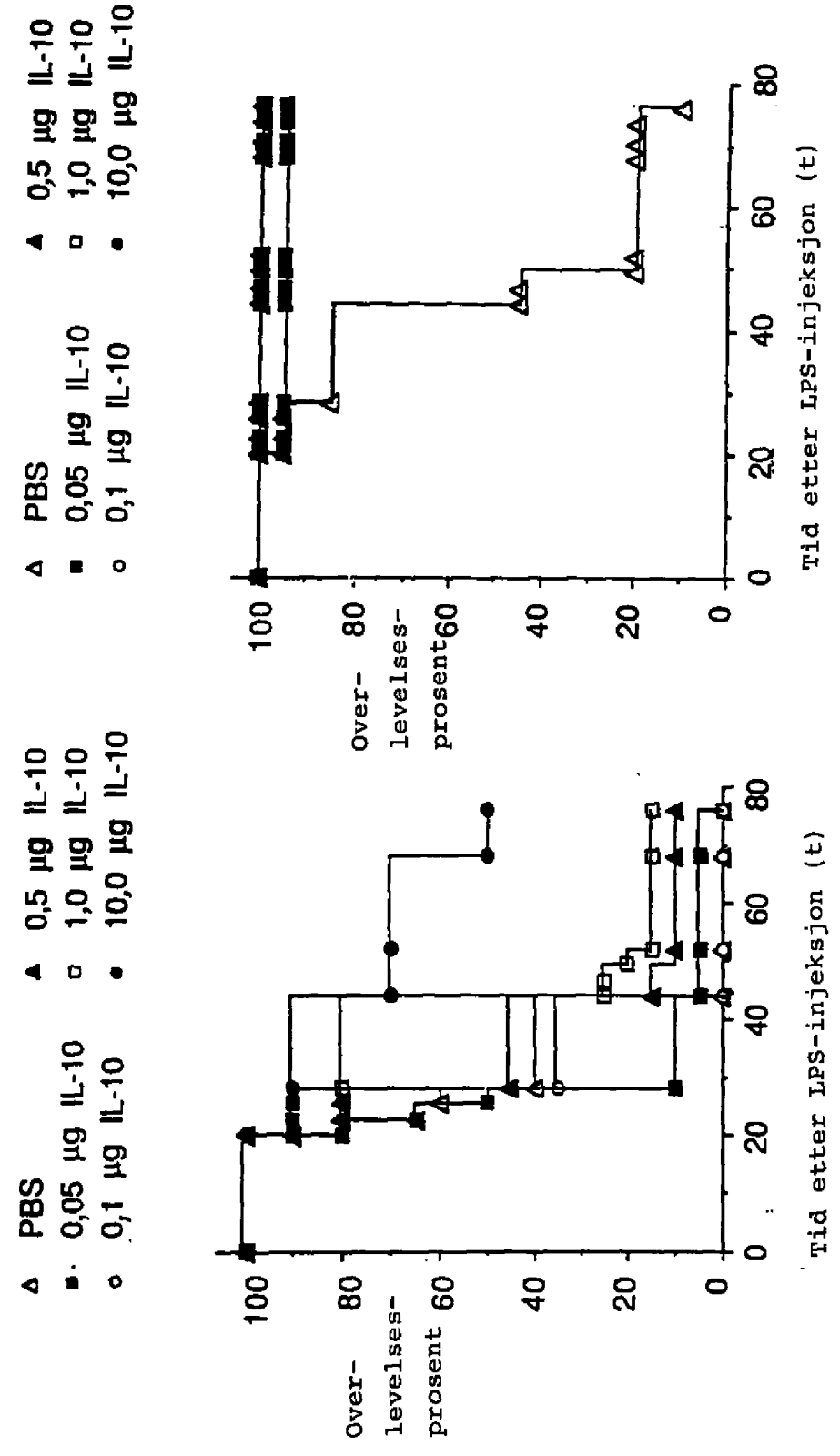
FIGUR 20E



FIGUR 20F

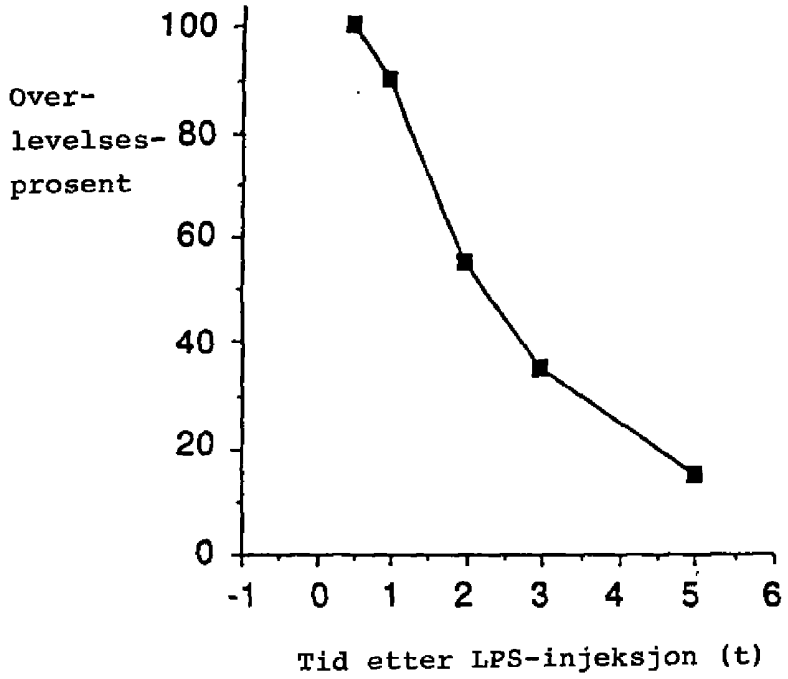

PBS
0,05 µg IL-10
0,1 µg IL-10
0,5 µg IL-10
1,0 µg IL-10
10,0 µg IL-10
Over-
levelses-
prosent
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
Tid etter LPS-injeksjon (t)

FIGUR 21



FIGUR 22A

FIGUR 22B


100
80
60
40
20
0
Over-
levelses-
prosent
-1
0
1
2
3
4
5
6
Tid etter LPS-injeksjon (t)

FIGUR 23

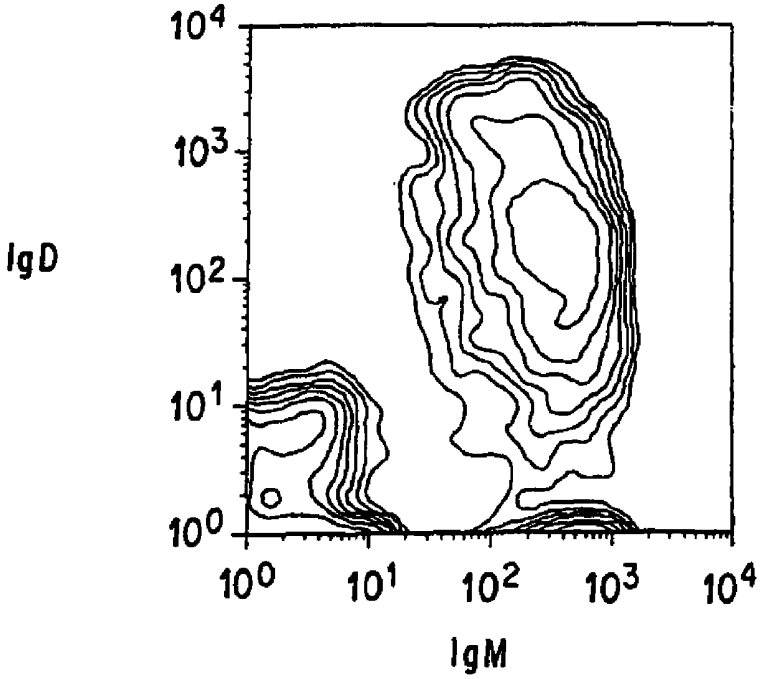


FIG. 24A

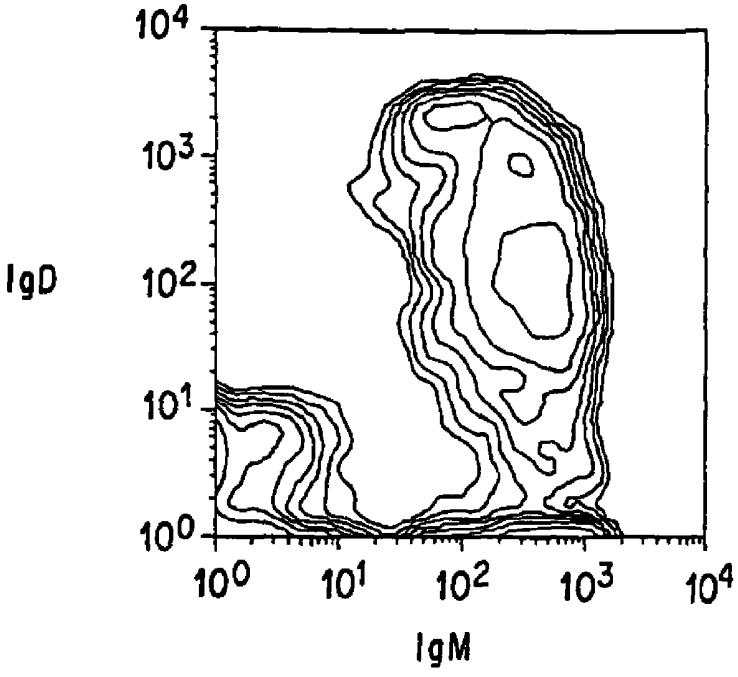


FIG. 24B

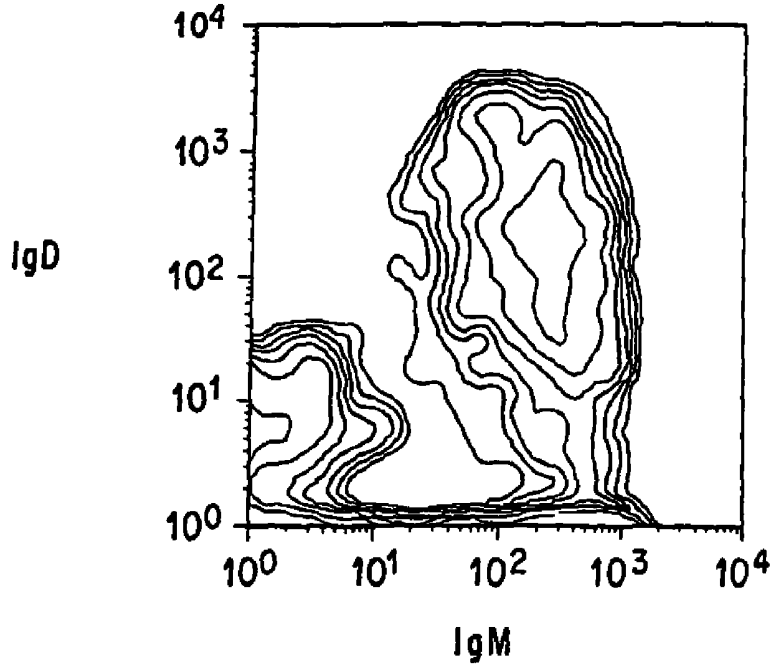


FIG. 24C

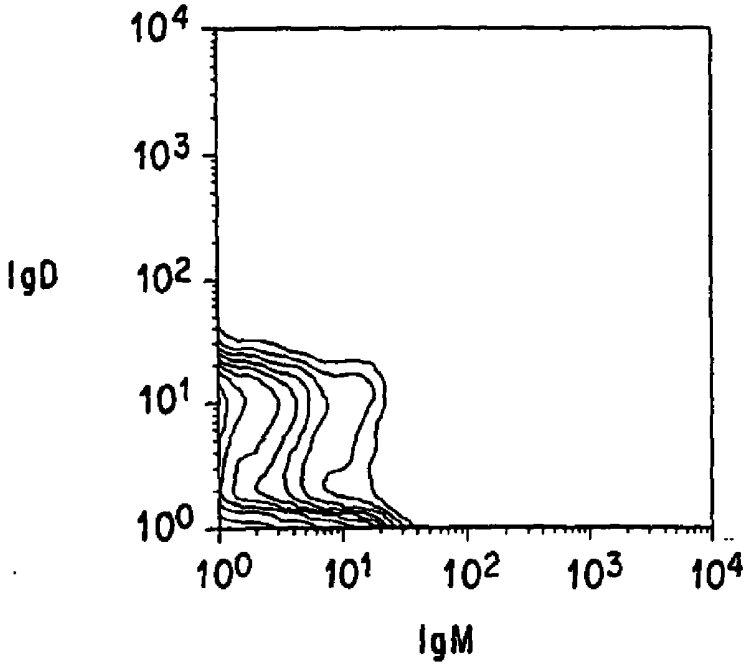


FIG. 24D

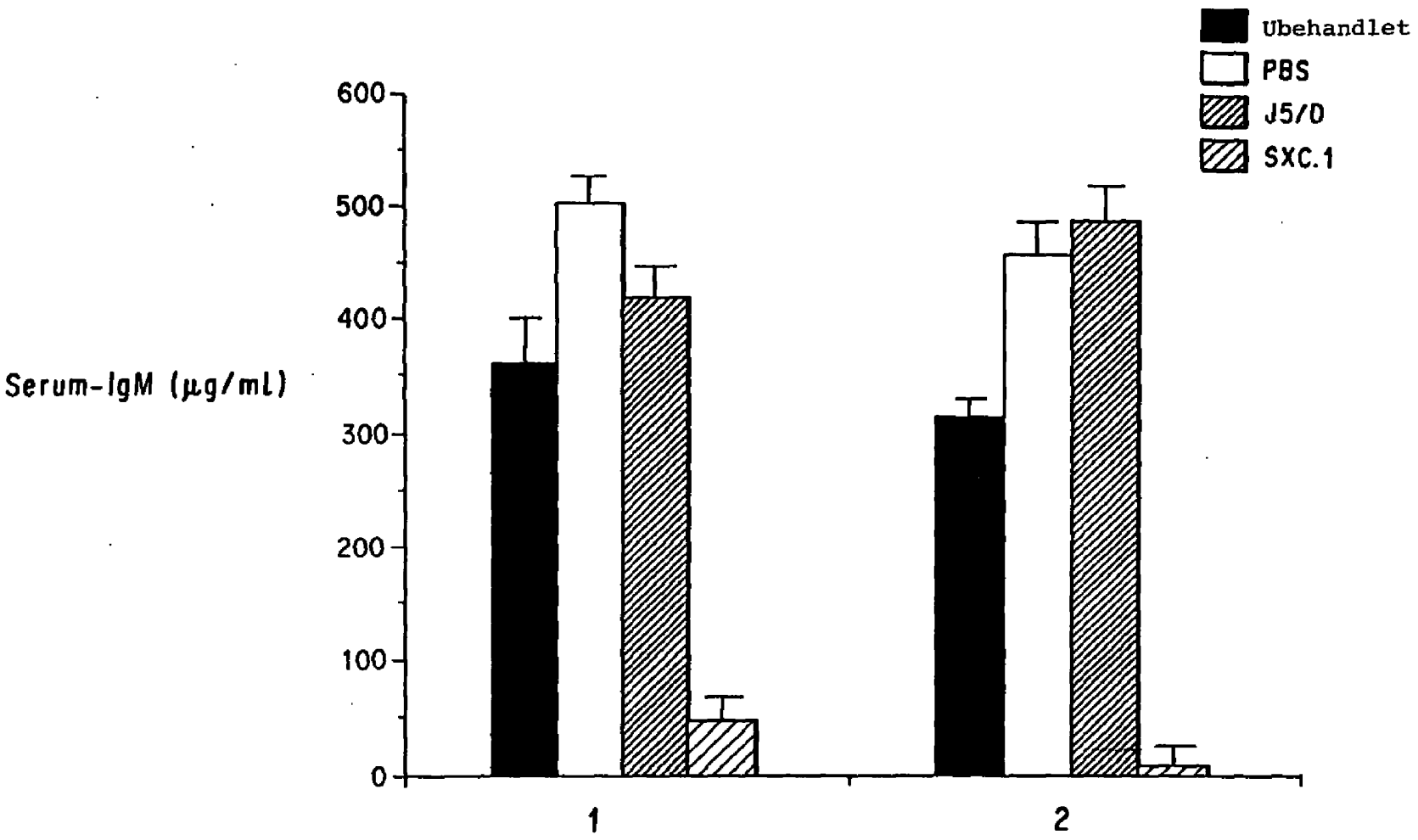

Ubehandlet
PBS
J5/0
SXC.1
Serum-IgM (µg/ml)
600
500
400
300
200
100
0
1
2
Forsøk nr.

FIG. 25

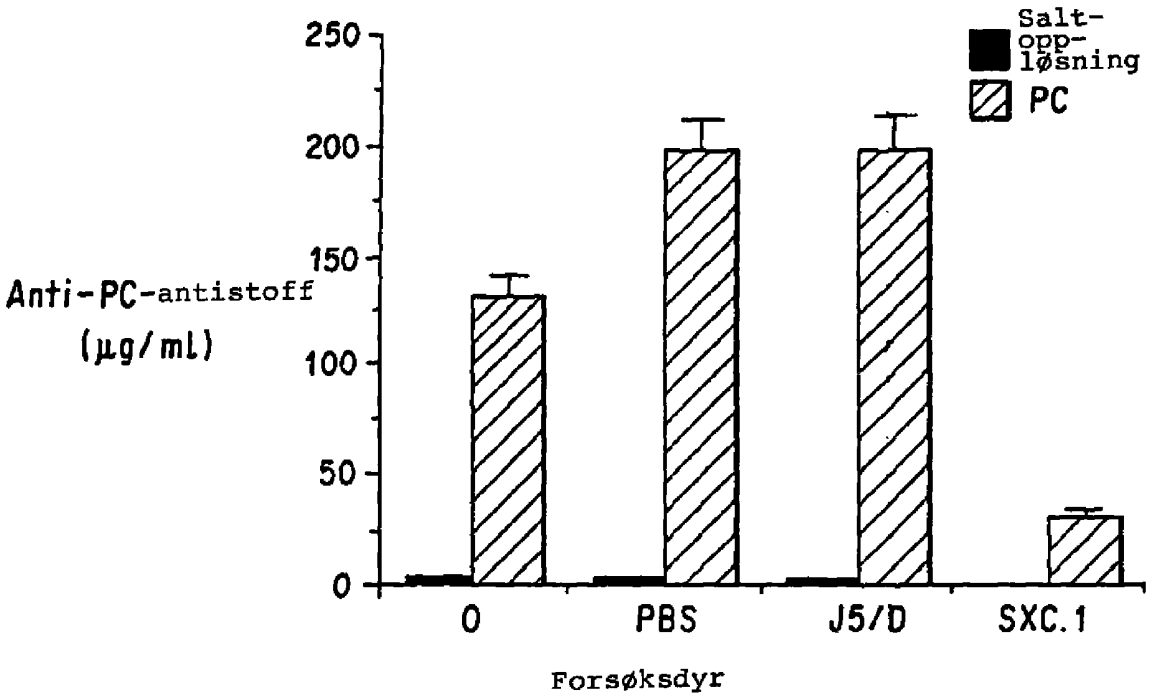


FIG. 26A

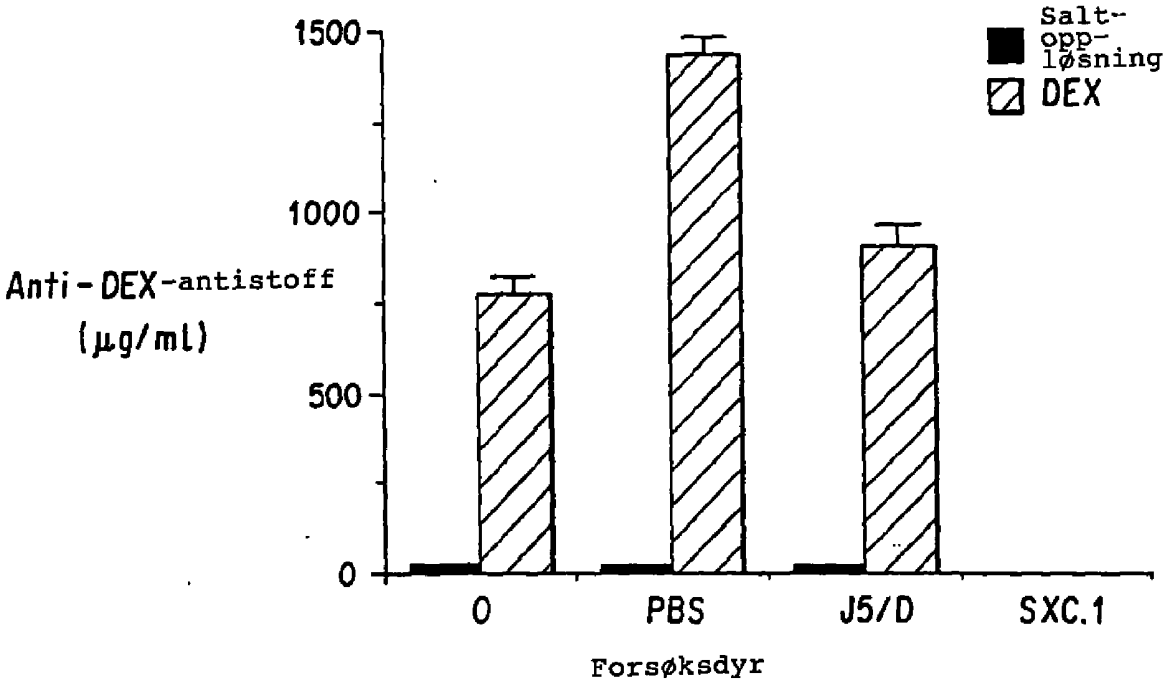


FIG. 26B

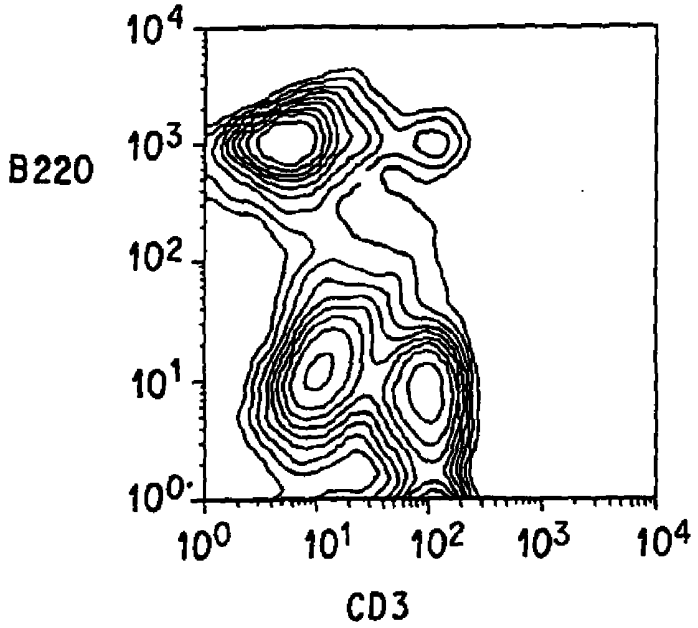


FIG. 27A

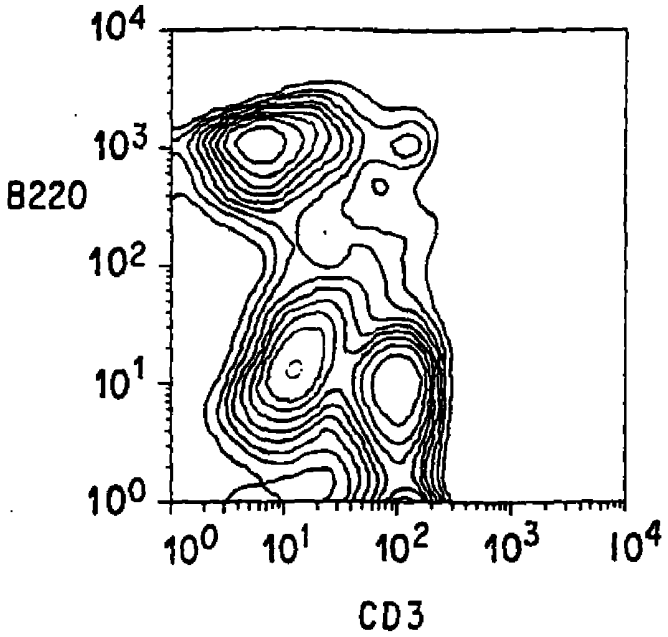


FIG. 27B

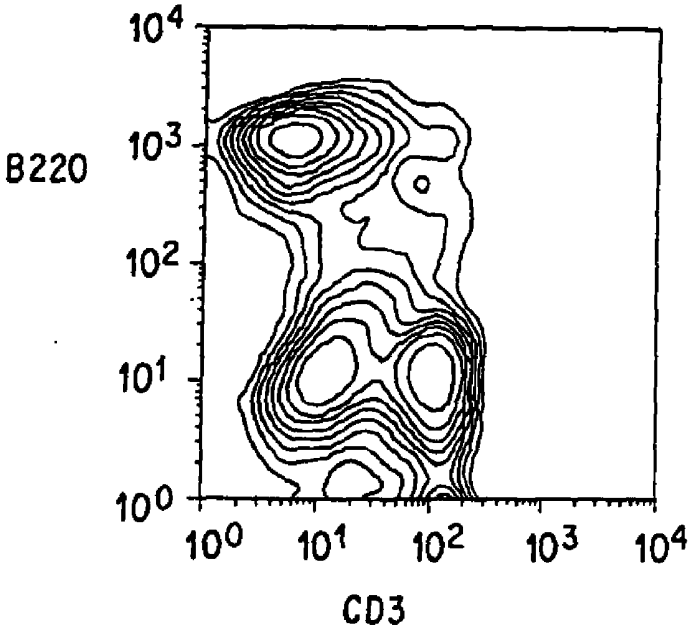


FIG. 27C

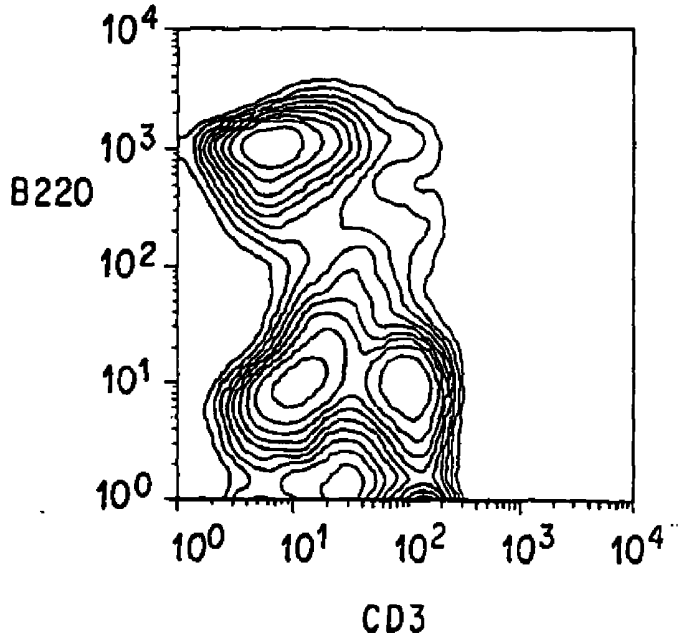


FIG. 27D

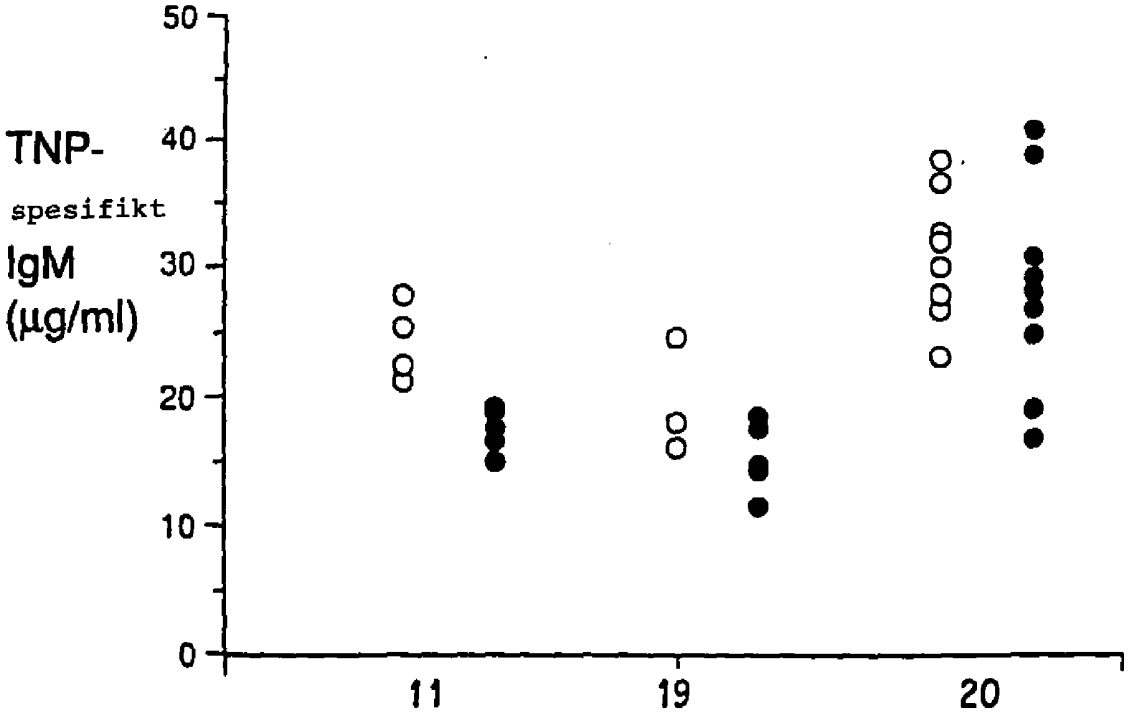


FIG. 28A

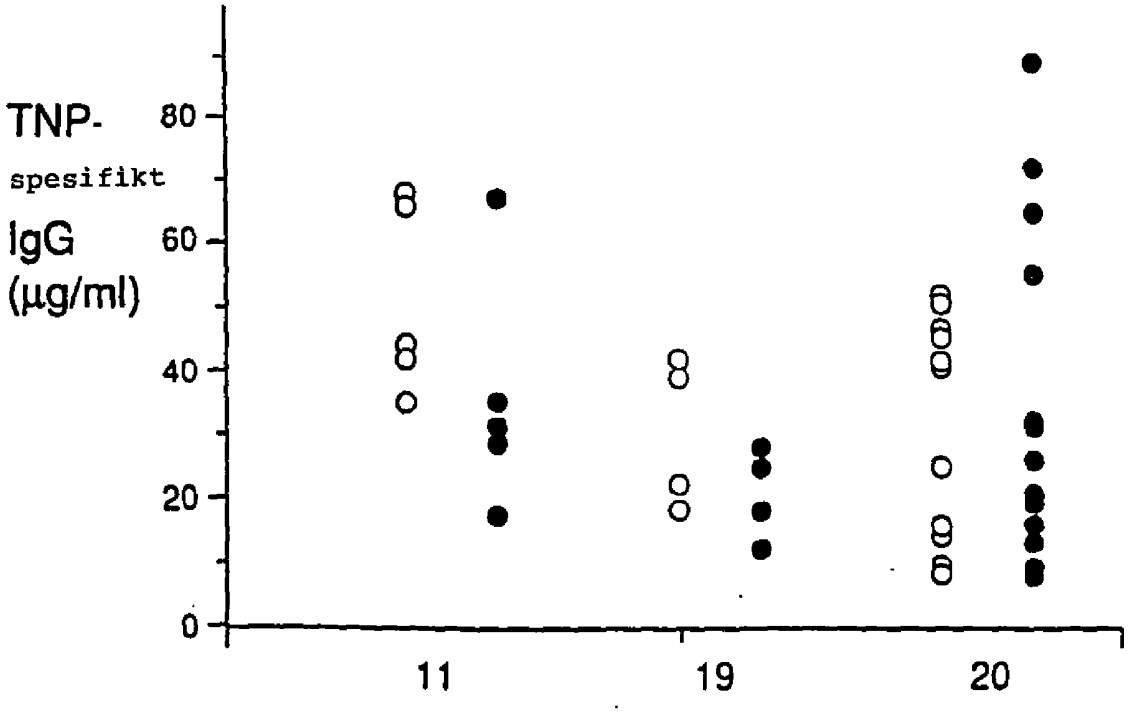


FIG. 28B

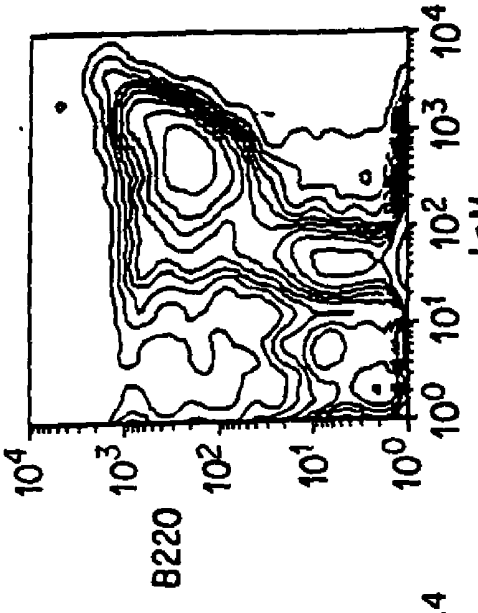


FIG. 29A

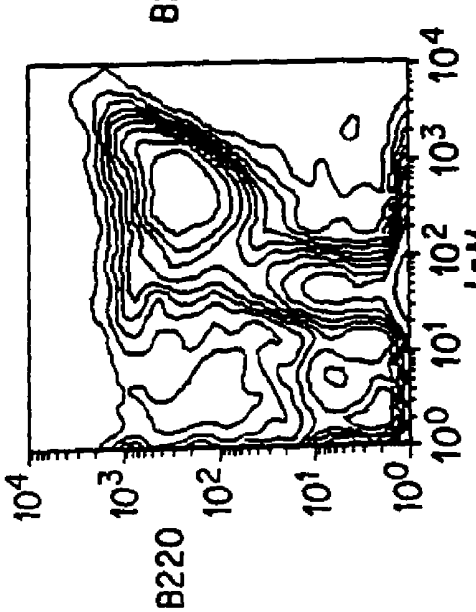


FIG. 29B

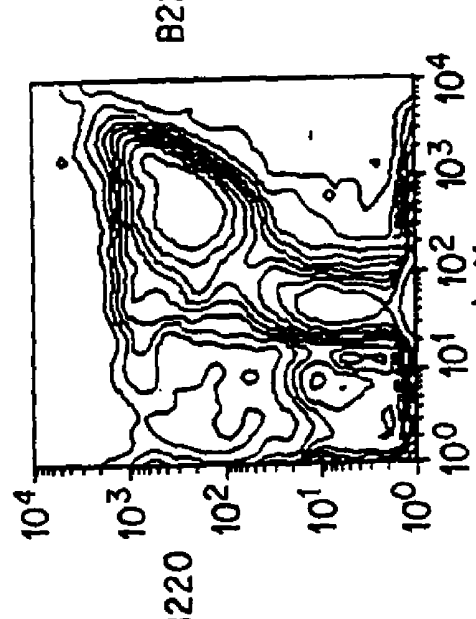


FIG. 29C

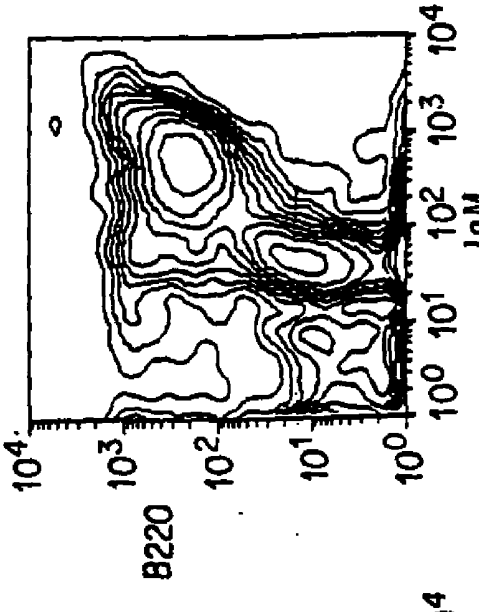


FIG. 29D

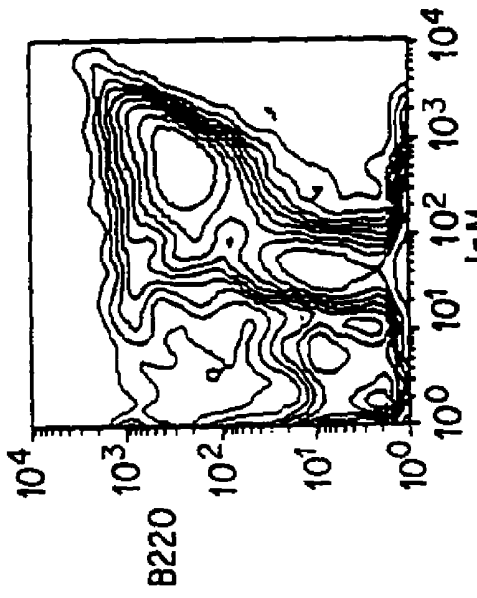


FIG. 29E

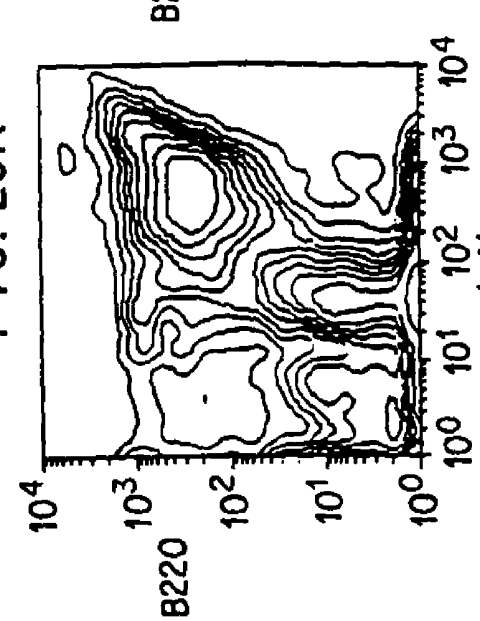
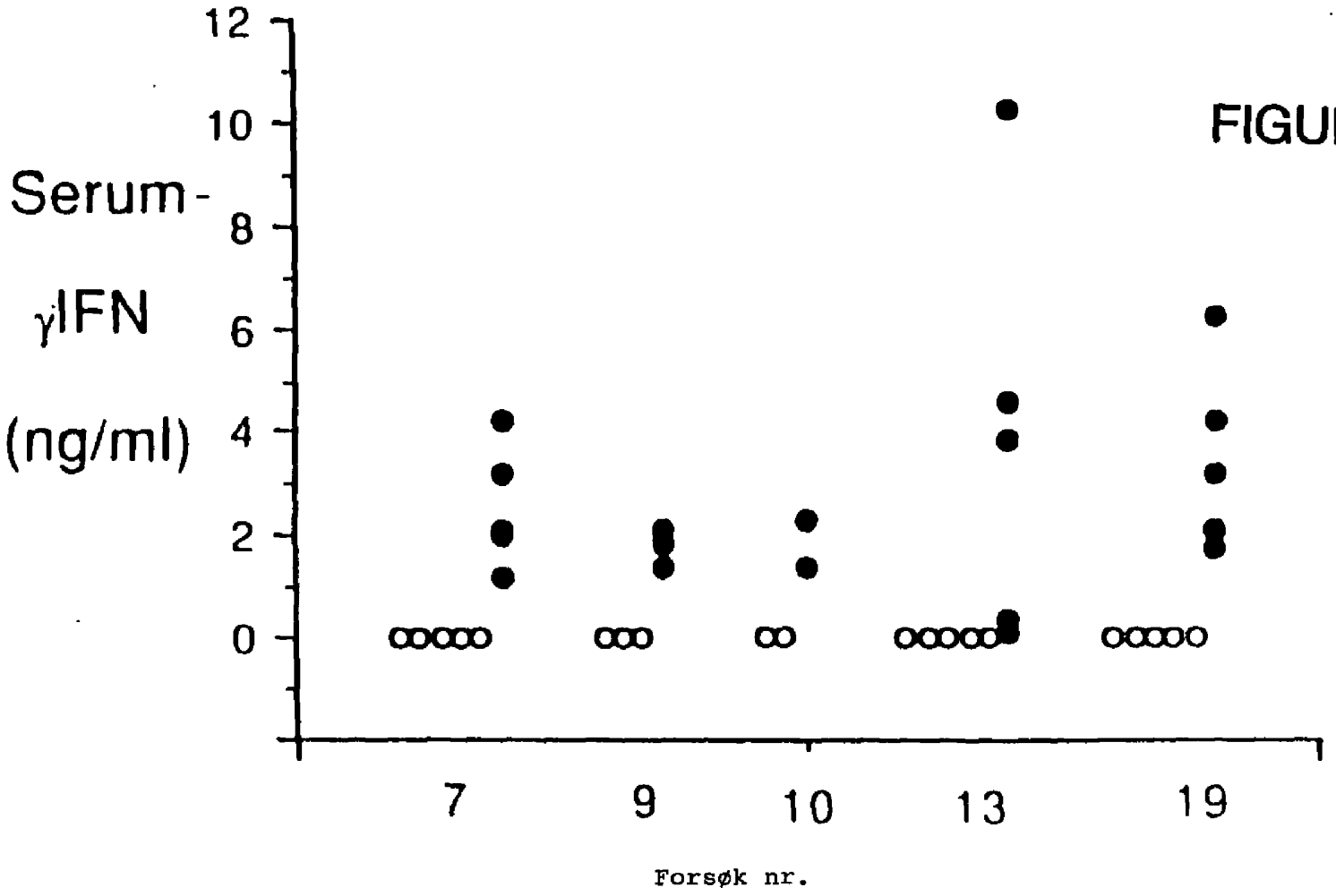


FIG. 29F



FIGUR 30

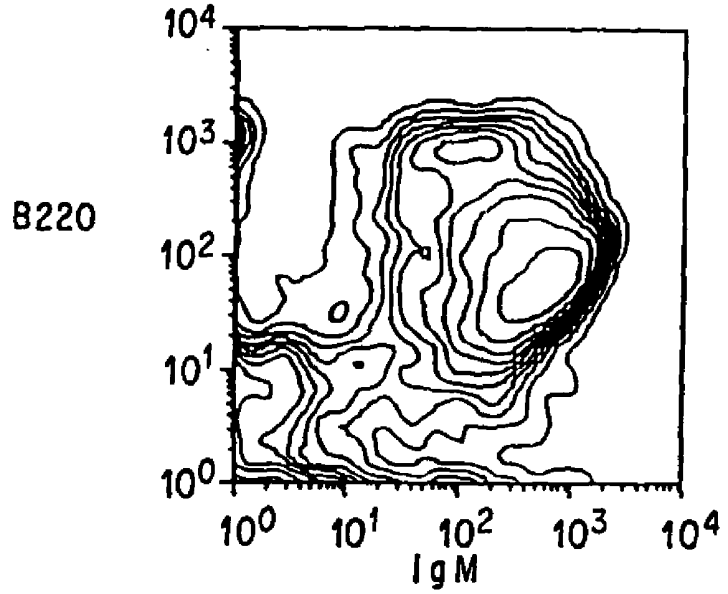


FIG. 31A

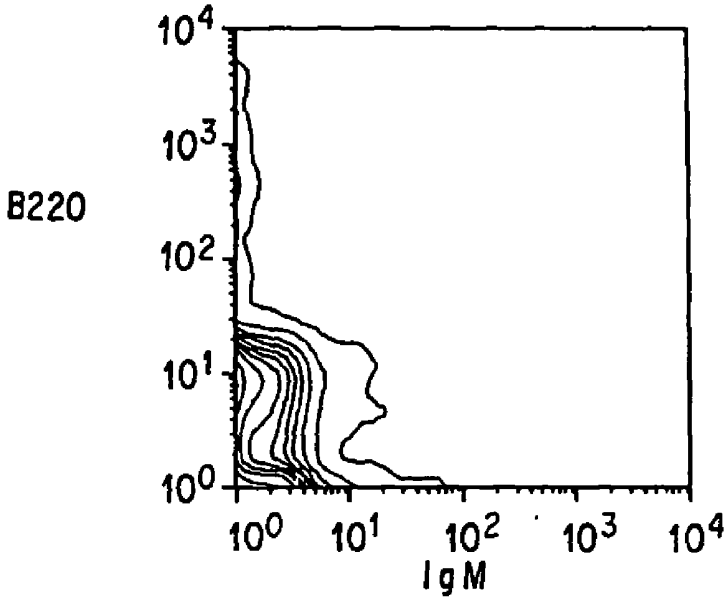


FIG. 31B

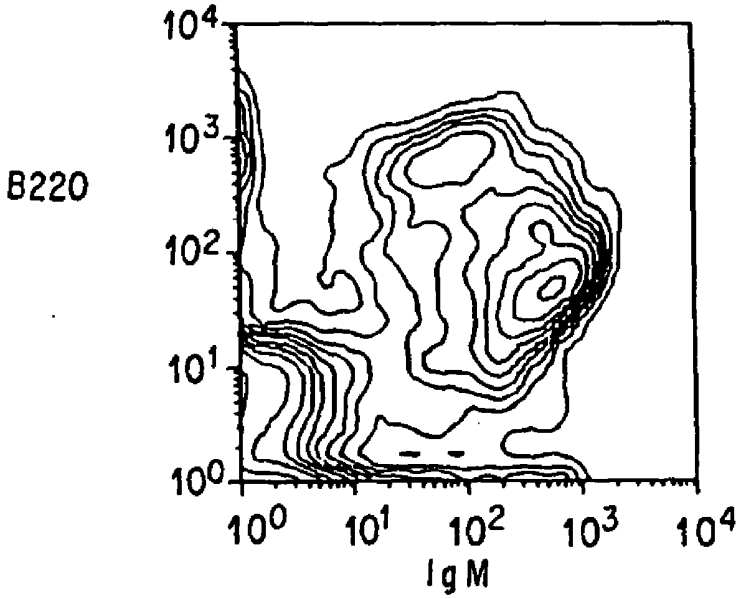
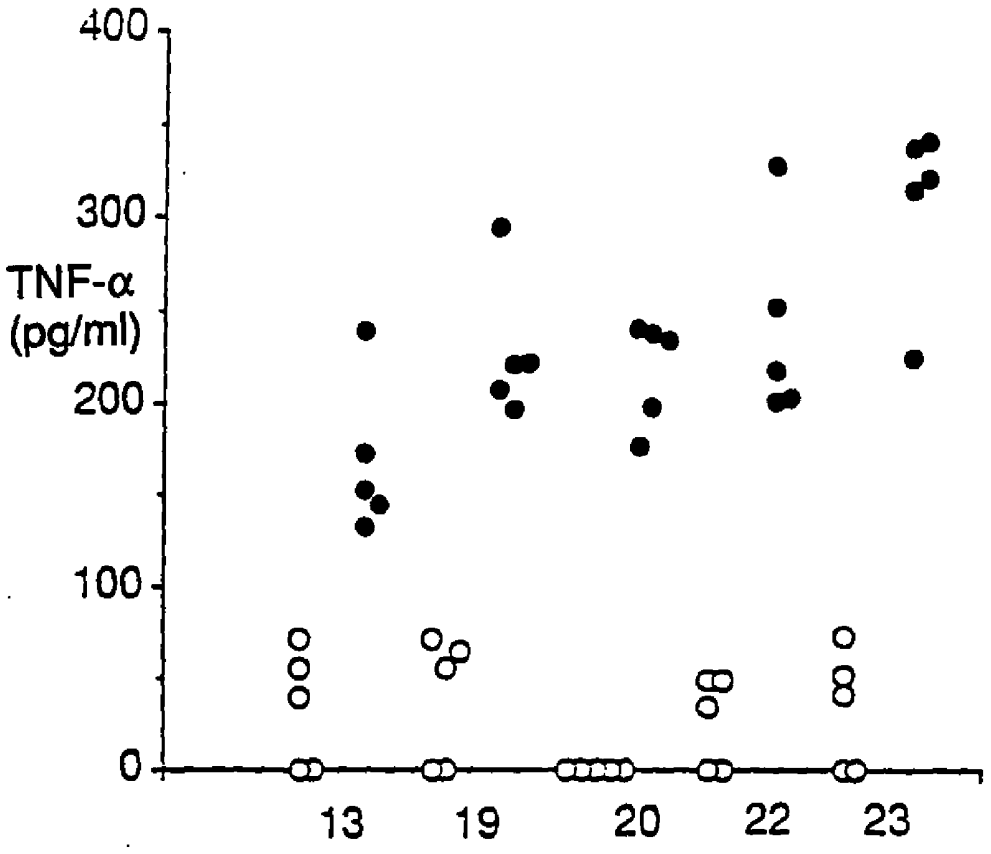
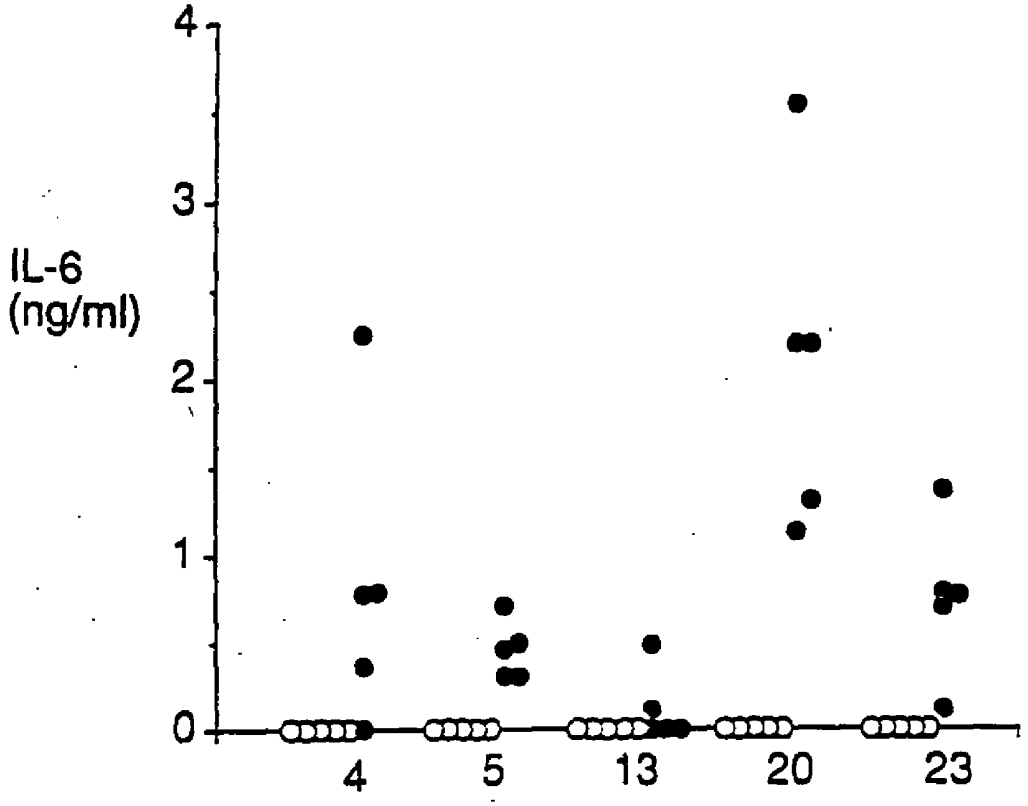


FIG. 31C



FIGUR 32



FIGUR 33

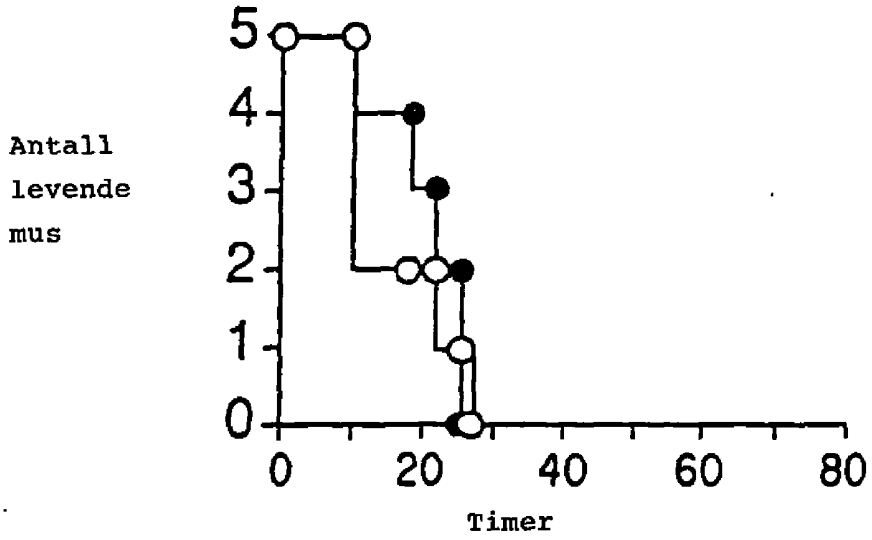


FIG. 34A

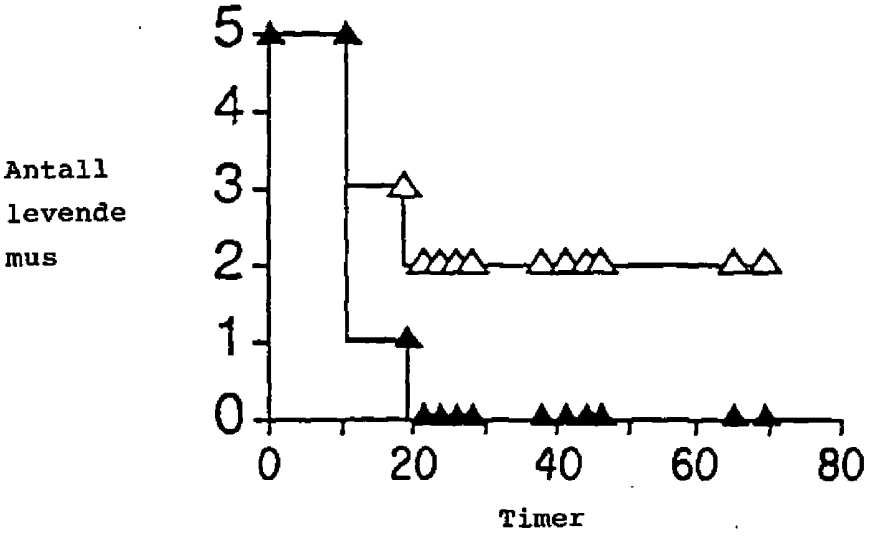


FIG. 34B

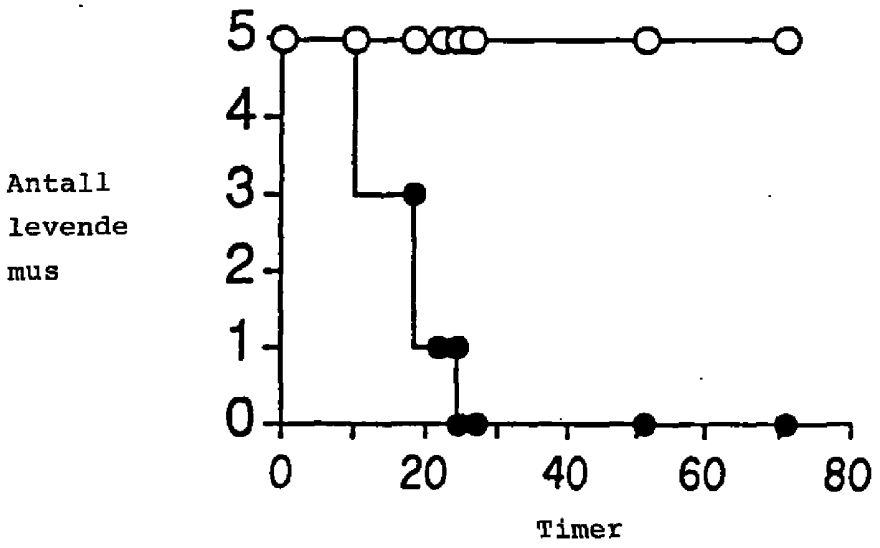


FIG. 34C

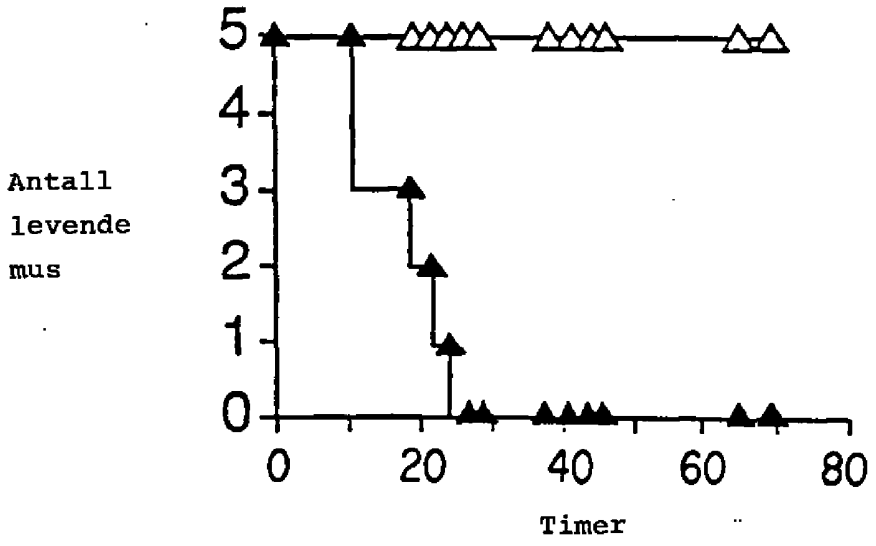


FIG. 34D

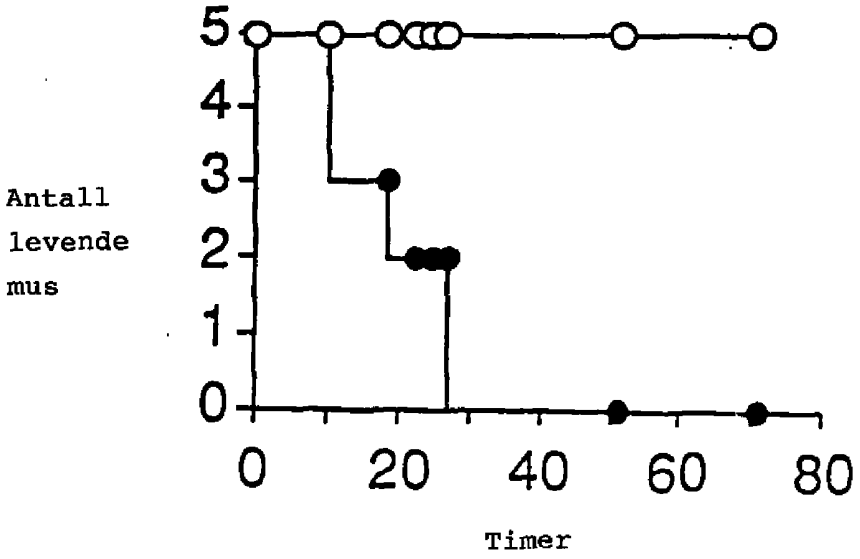


FIG. 34E

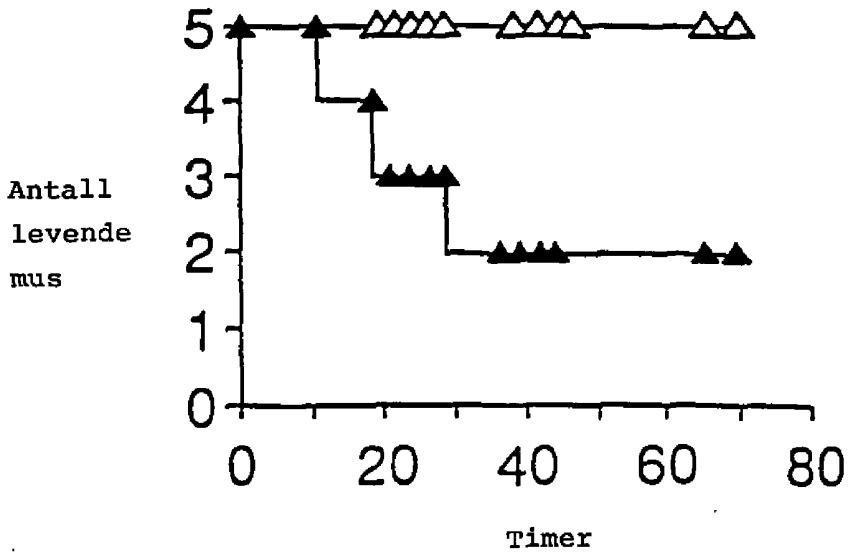


FIG. 34F

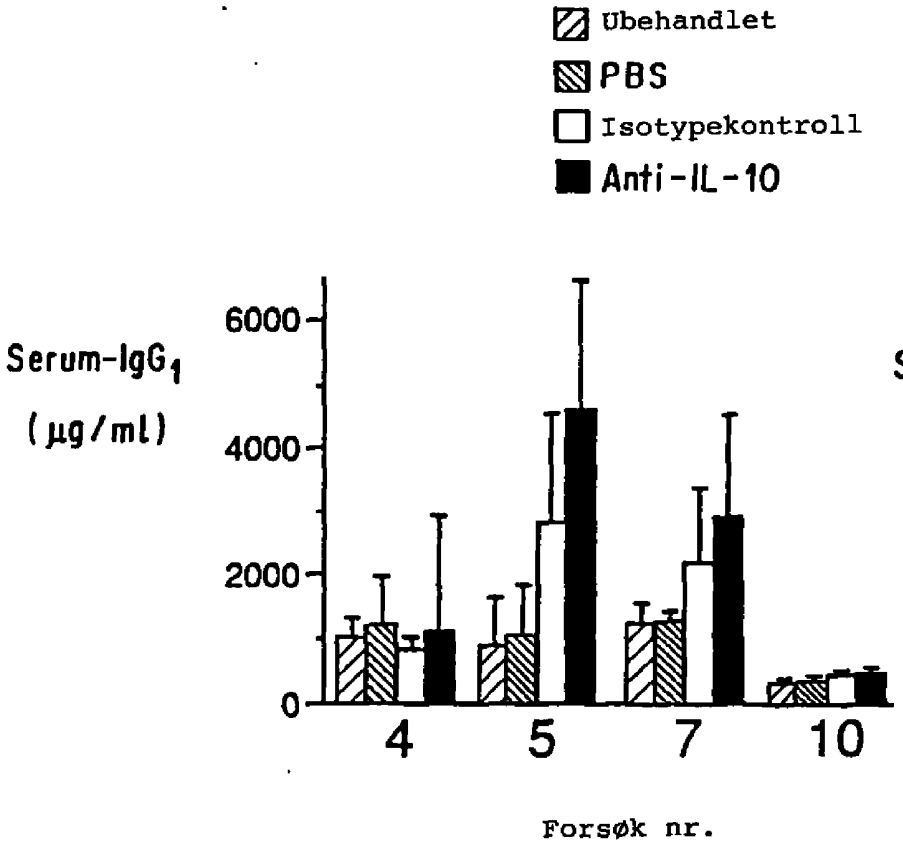


FIG. 35A

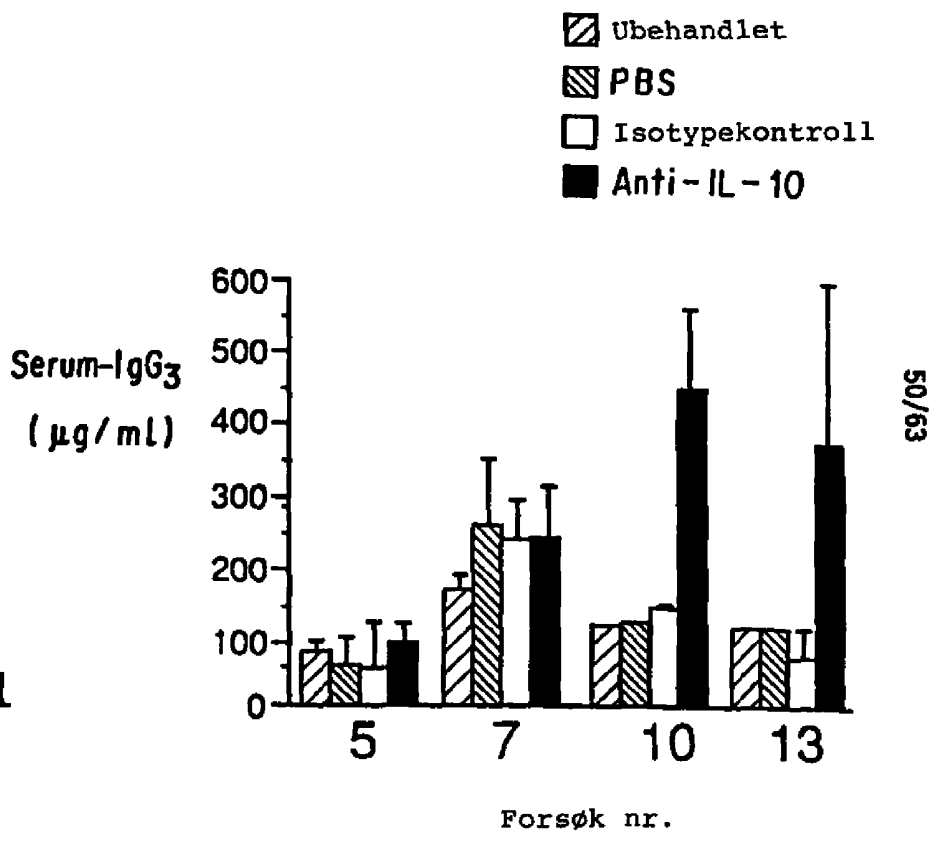


FIG. 35B

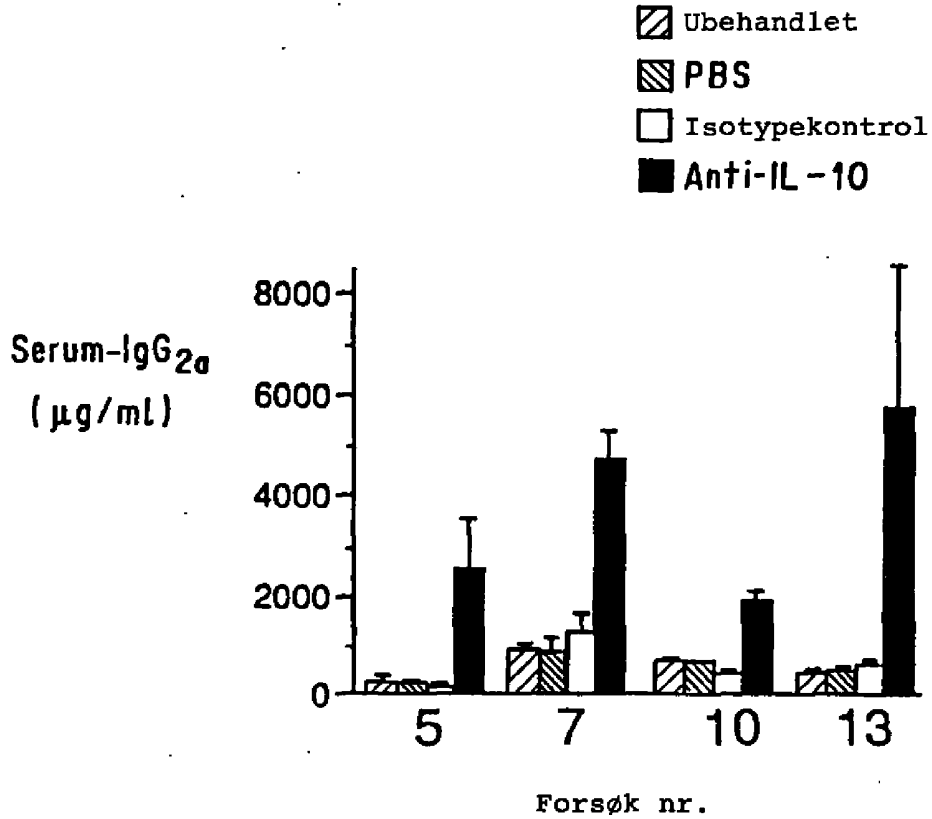


FIG. 35C

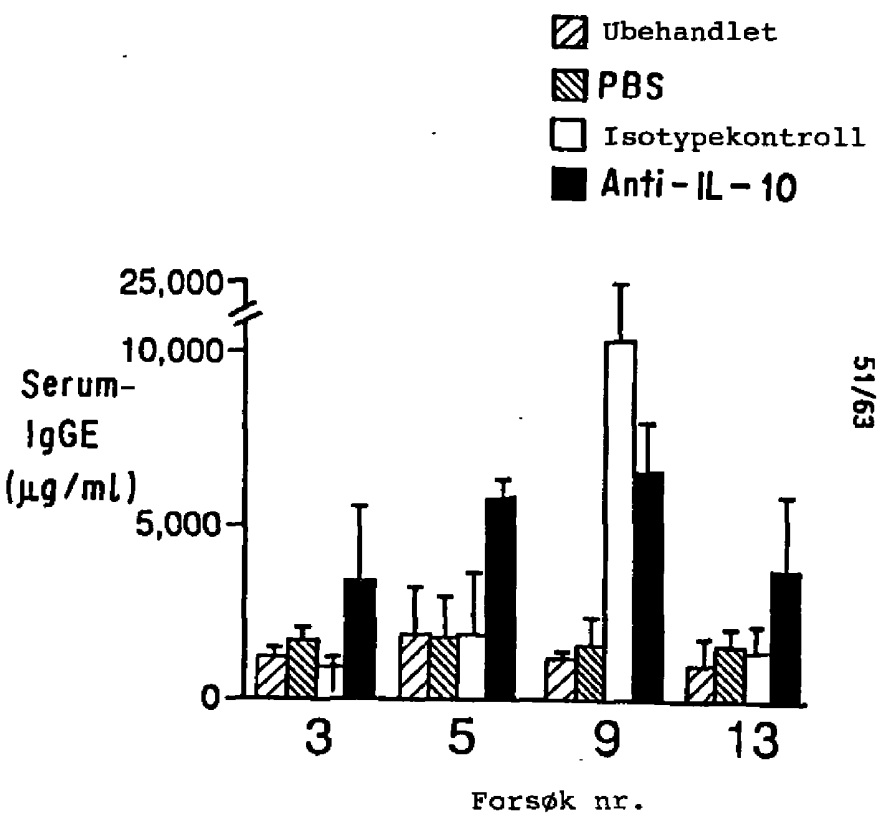


FIG. 35D

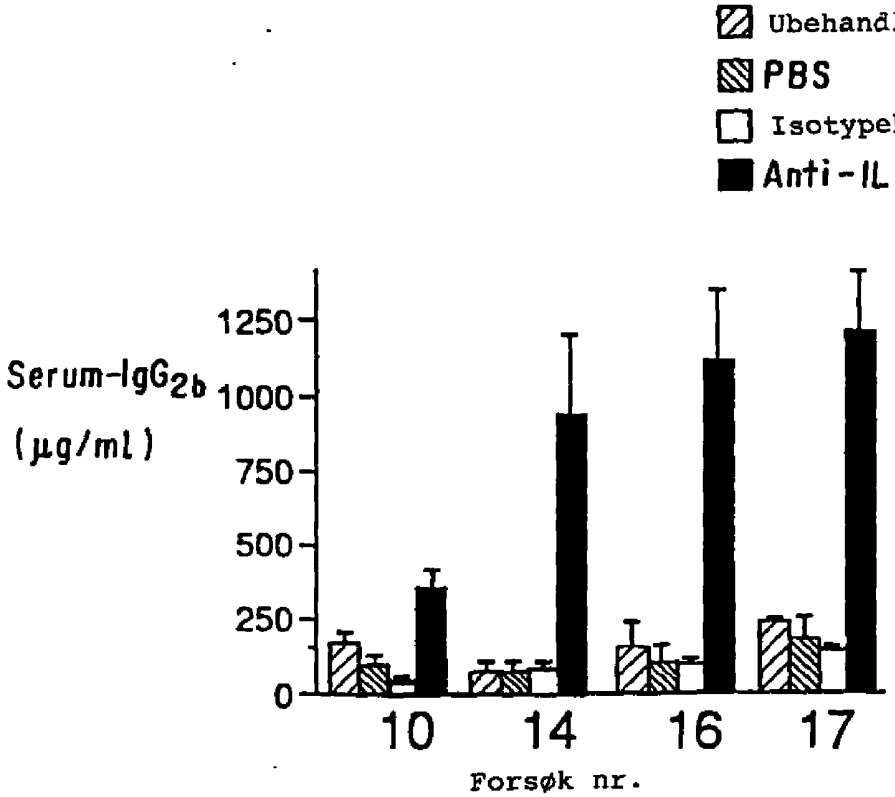


FIG. 35E

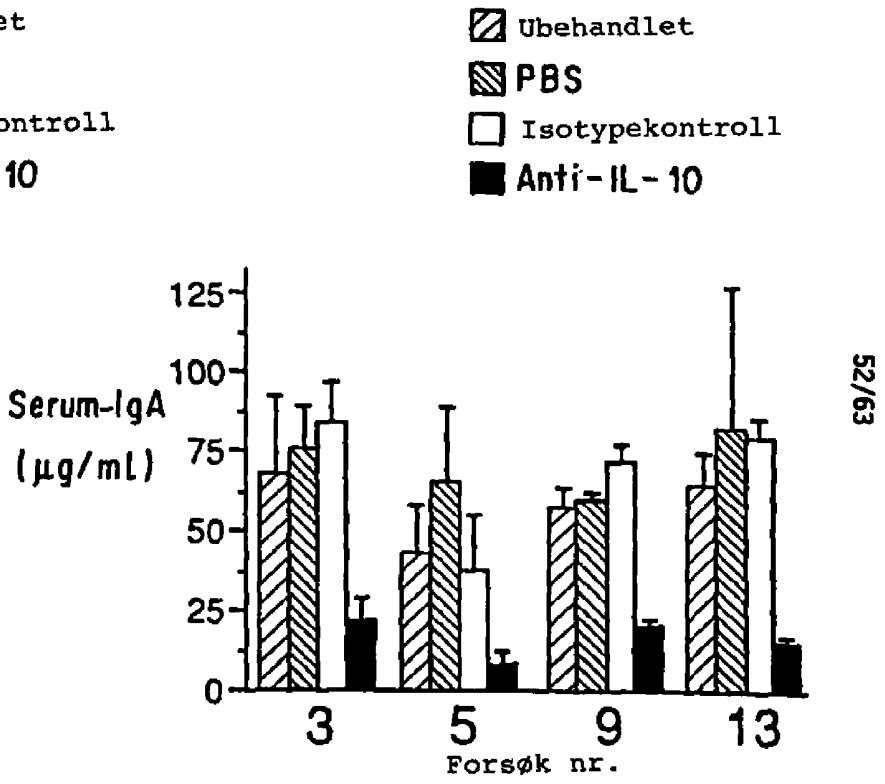


FIG. 35F

B220 isotop-kontroll

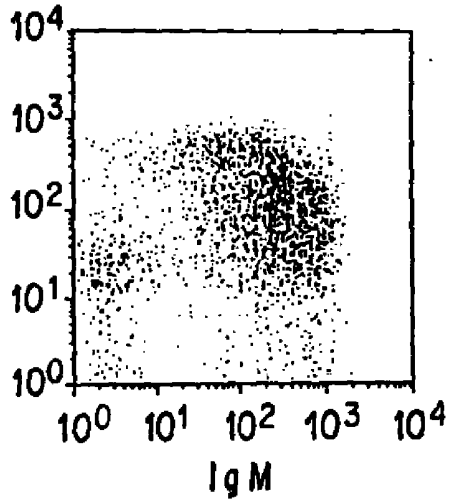


FIG. 36A

B220 isotop-kontroll

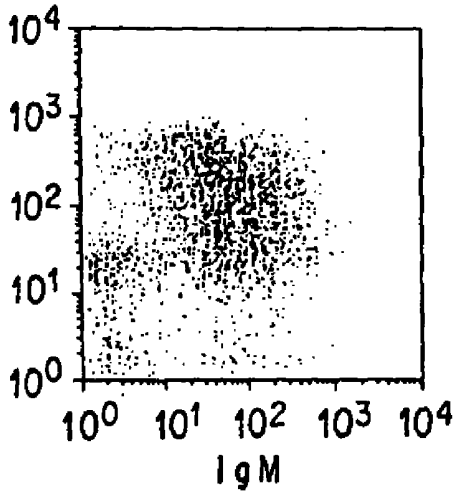


FIG. 36B

B220 isotop-kontroll

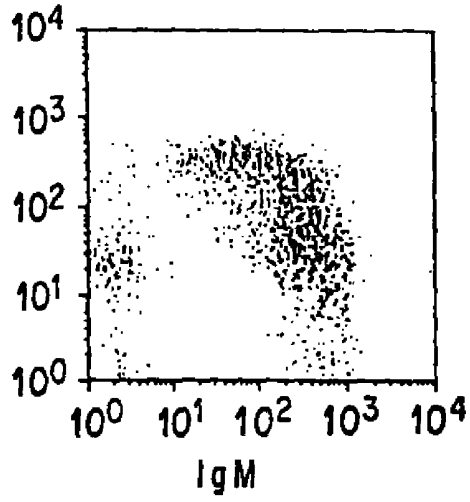


FIG. 36C

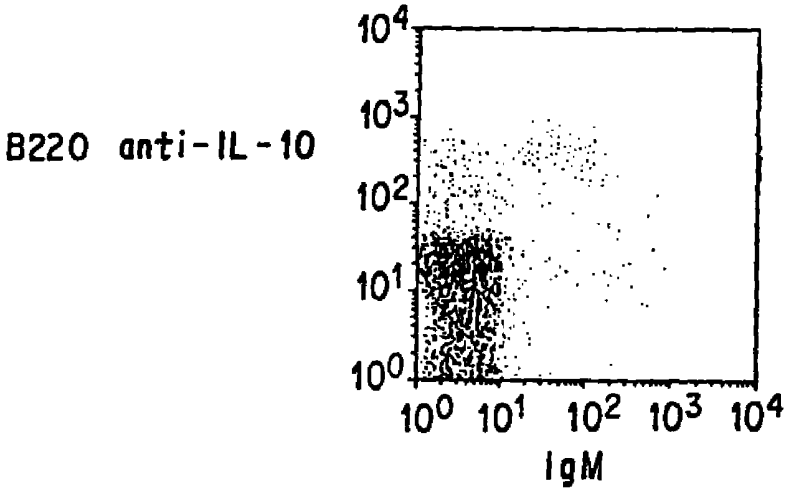


FIG. 36D

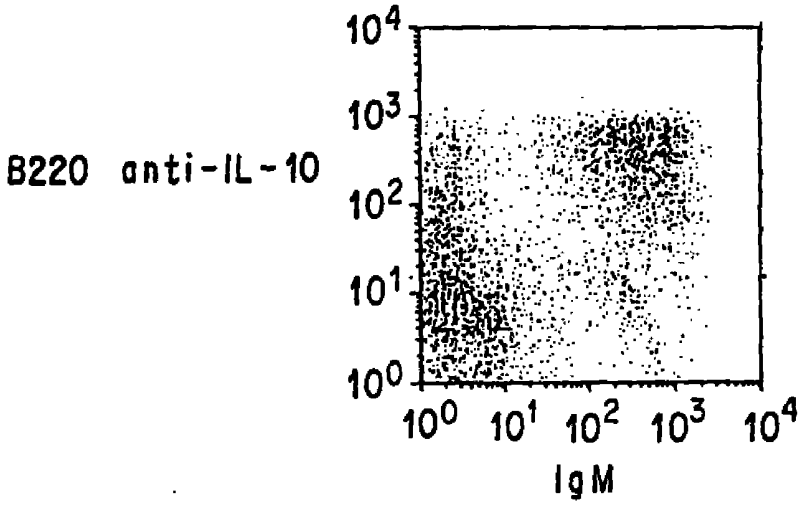


FIG. 36E

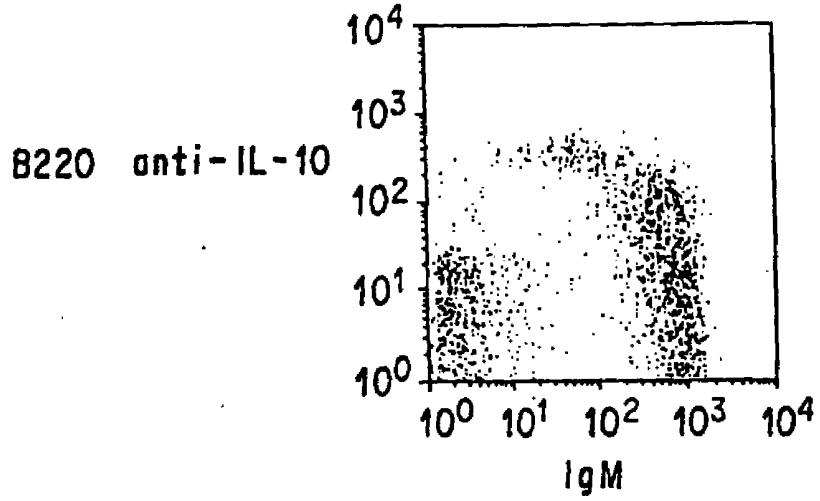


FIG. 36F

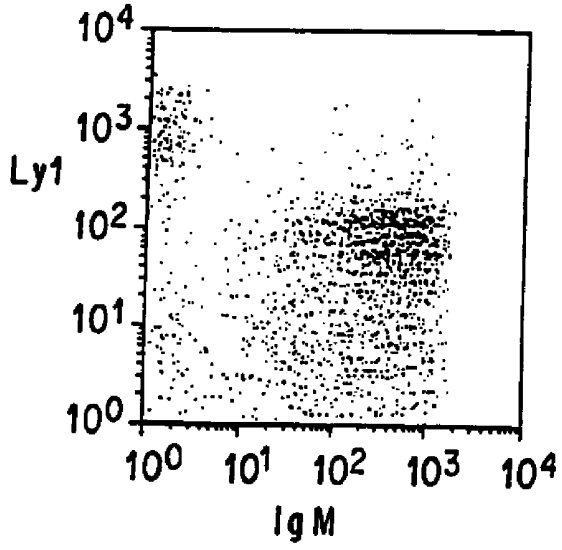


FIG. 37A

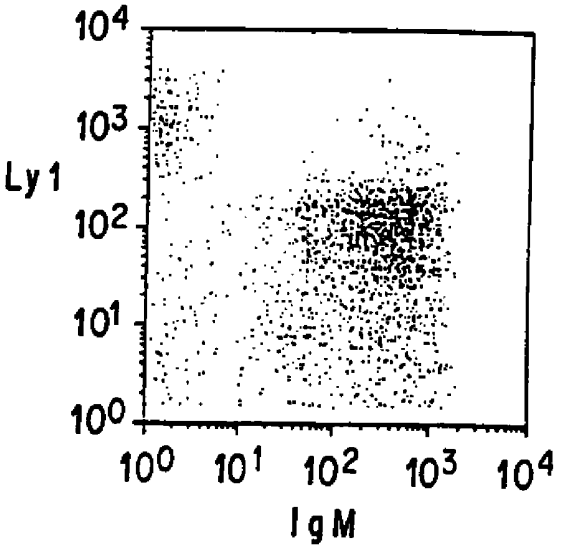


FIG. 37B

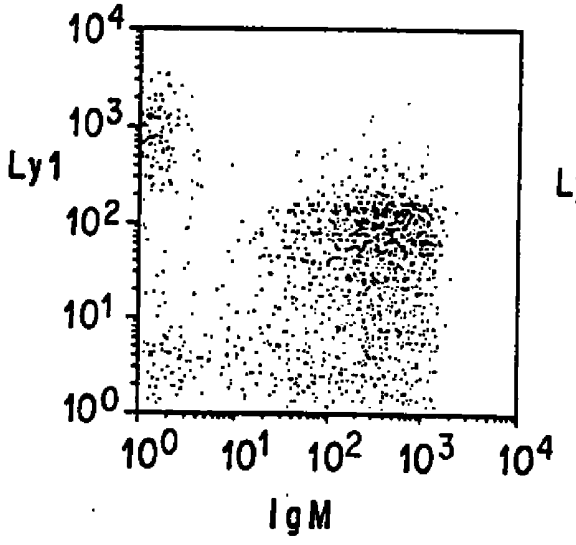


FIG. 37C

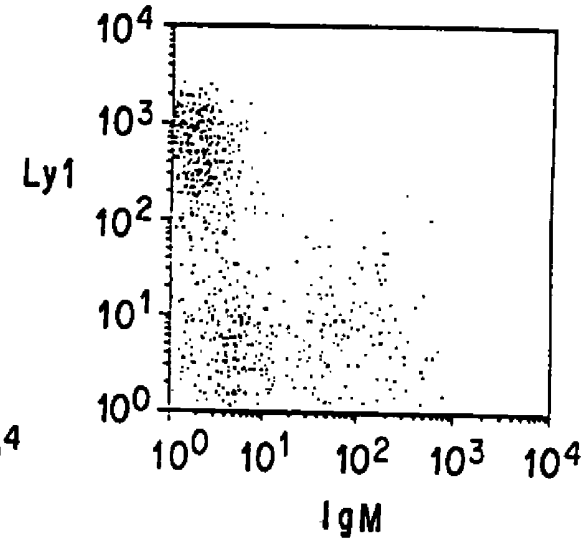


FIG. 37D

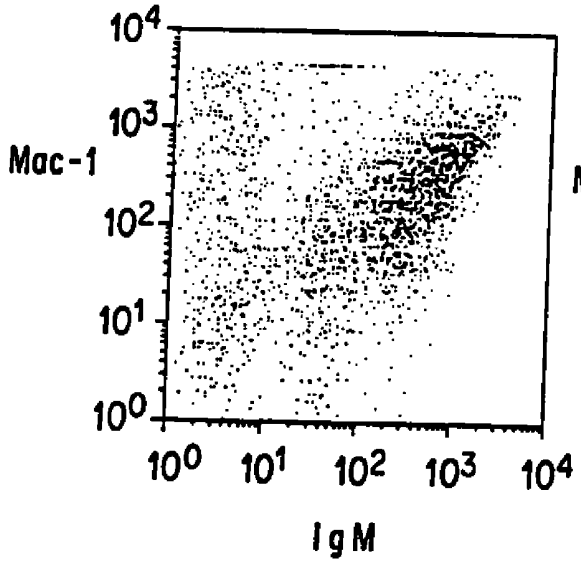


FIG. 38A

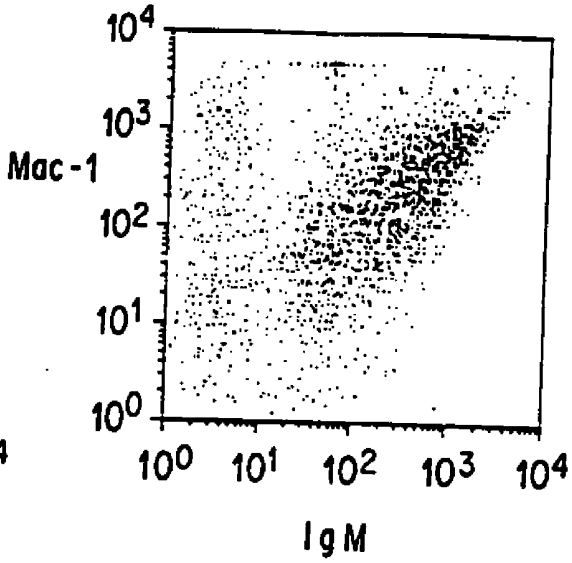


FIG. 38B

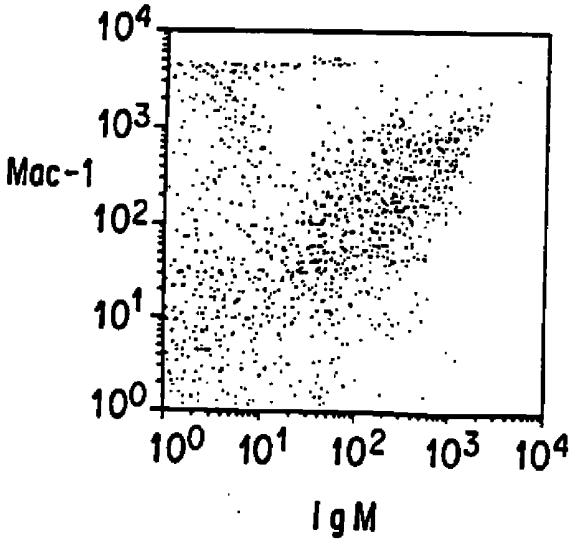


FIG. 38C

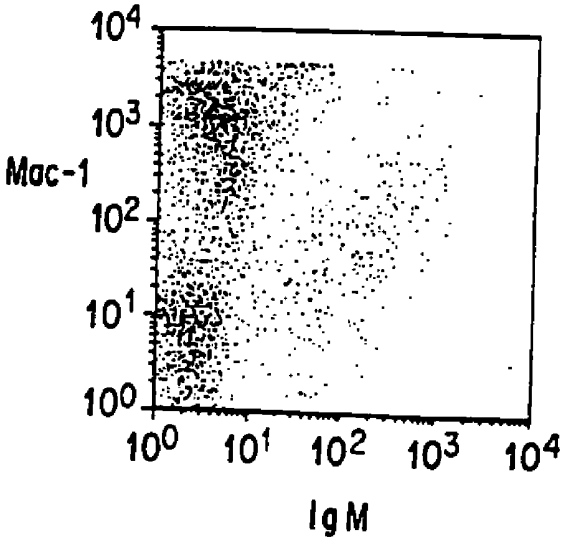
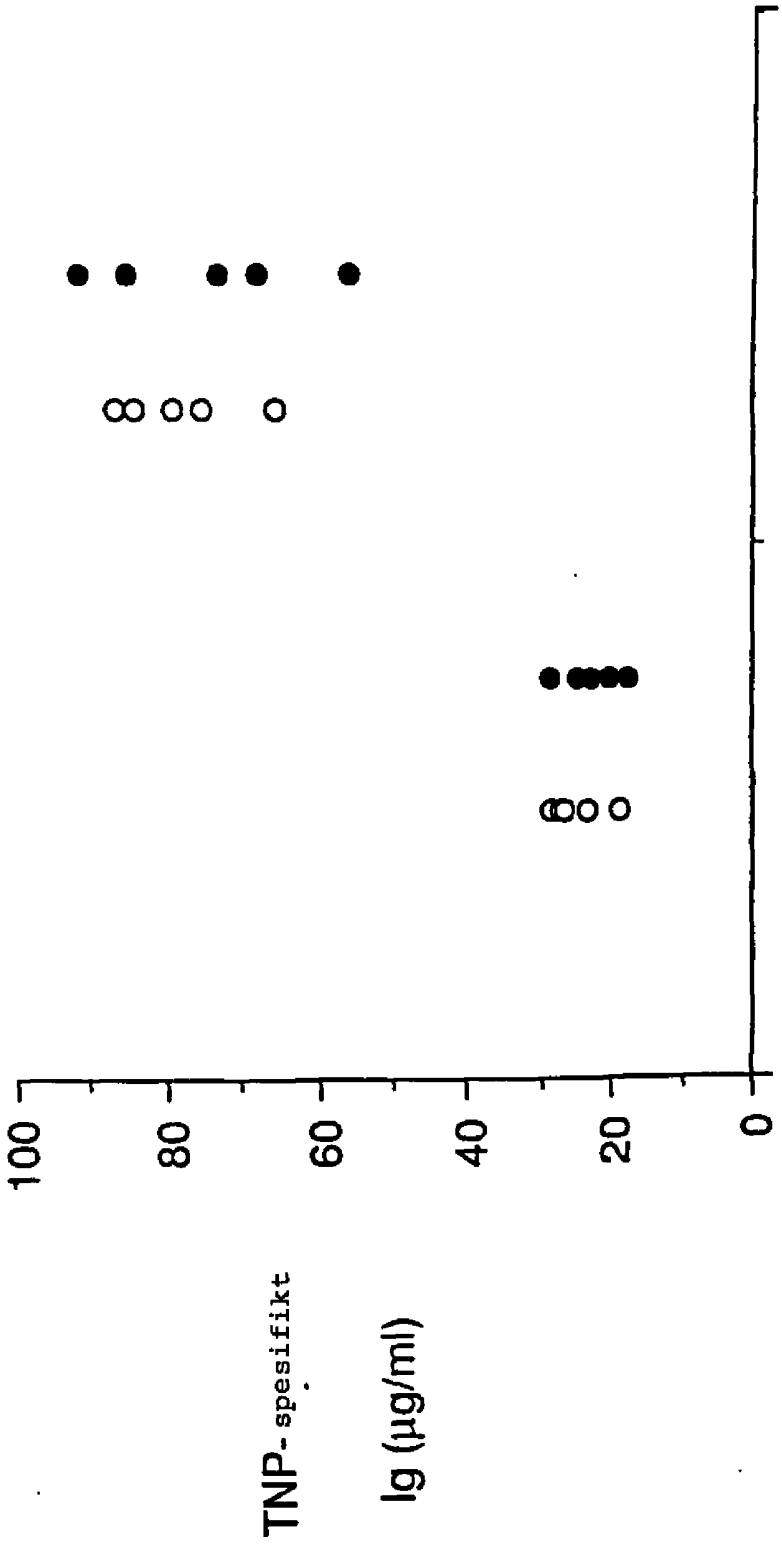
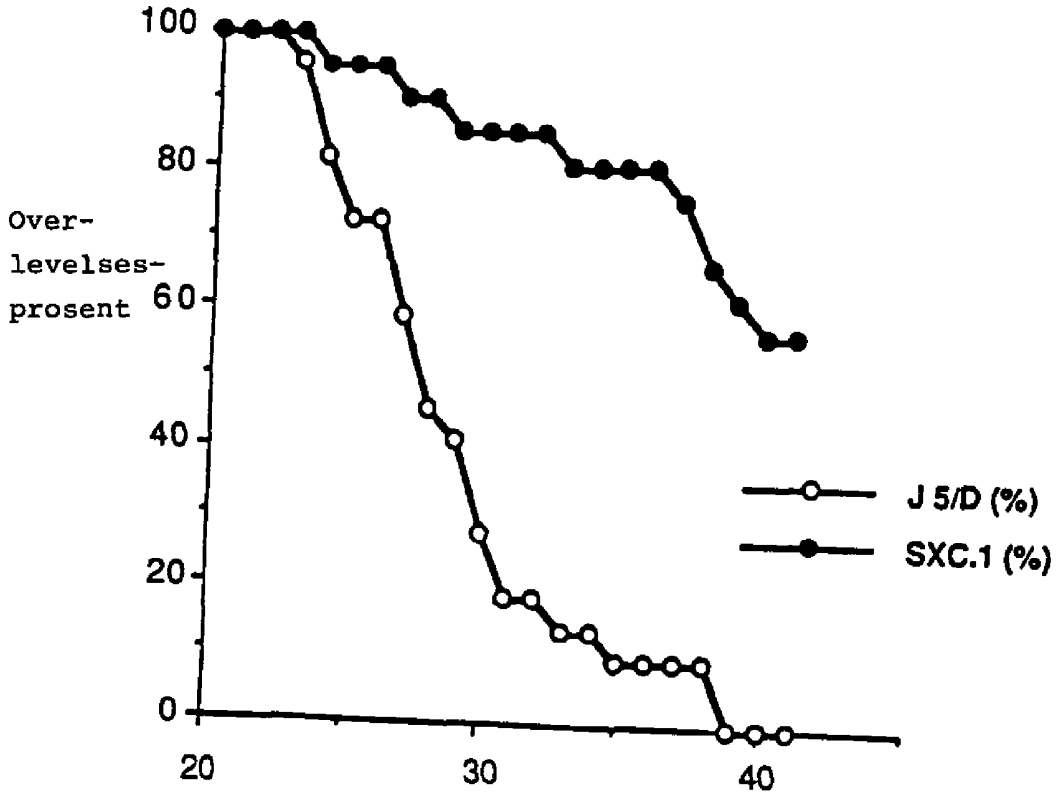


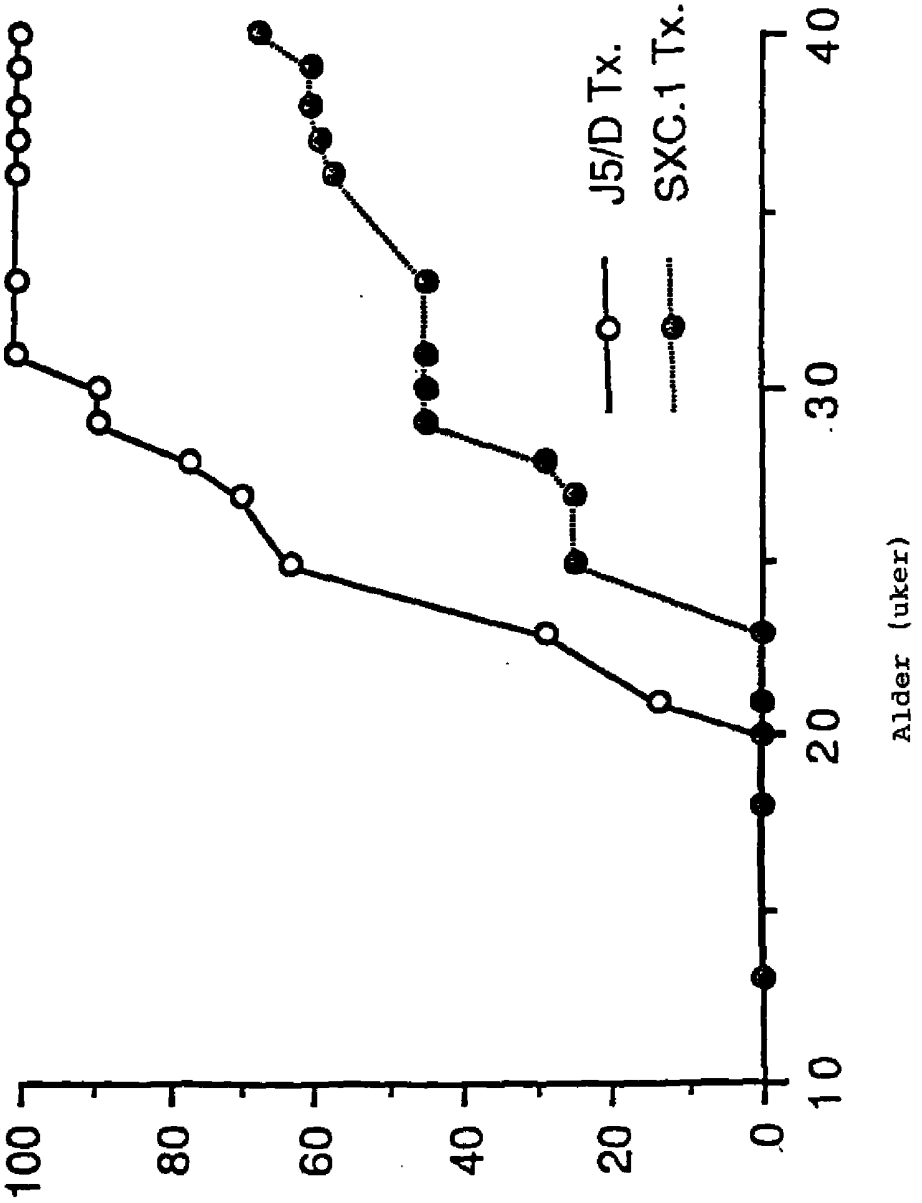
FIG. 38D



FIGUR 39


100
80
60
40
20
0
Over-
levelses-
prosent
20
30
40
J 5/D (%)
SXC.1 (%)
Alder (uker)

FIGUR 40


100
80
60
40
20
0
10
20
30
40
J5/D Tx.
SXC.1 Tx.
Mus med proteinuri (%)
Alder (uker)

FIGUR 41



FIG. 42A

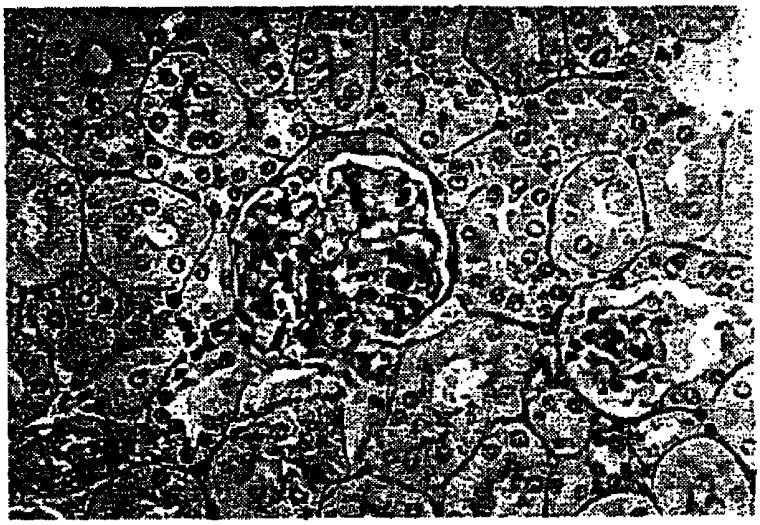
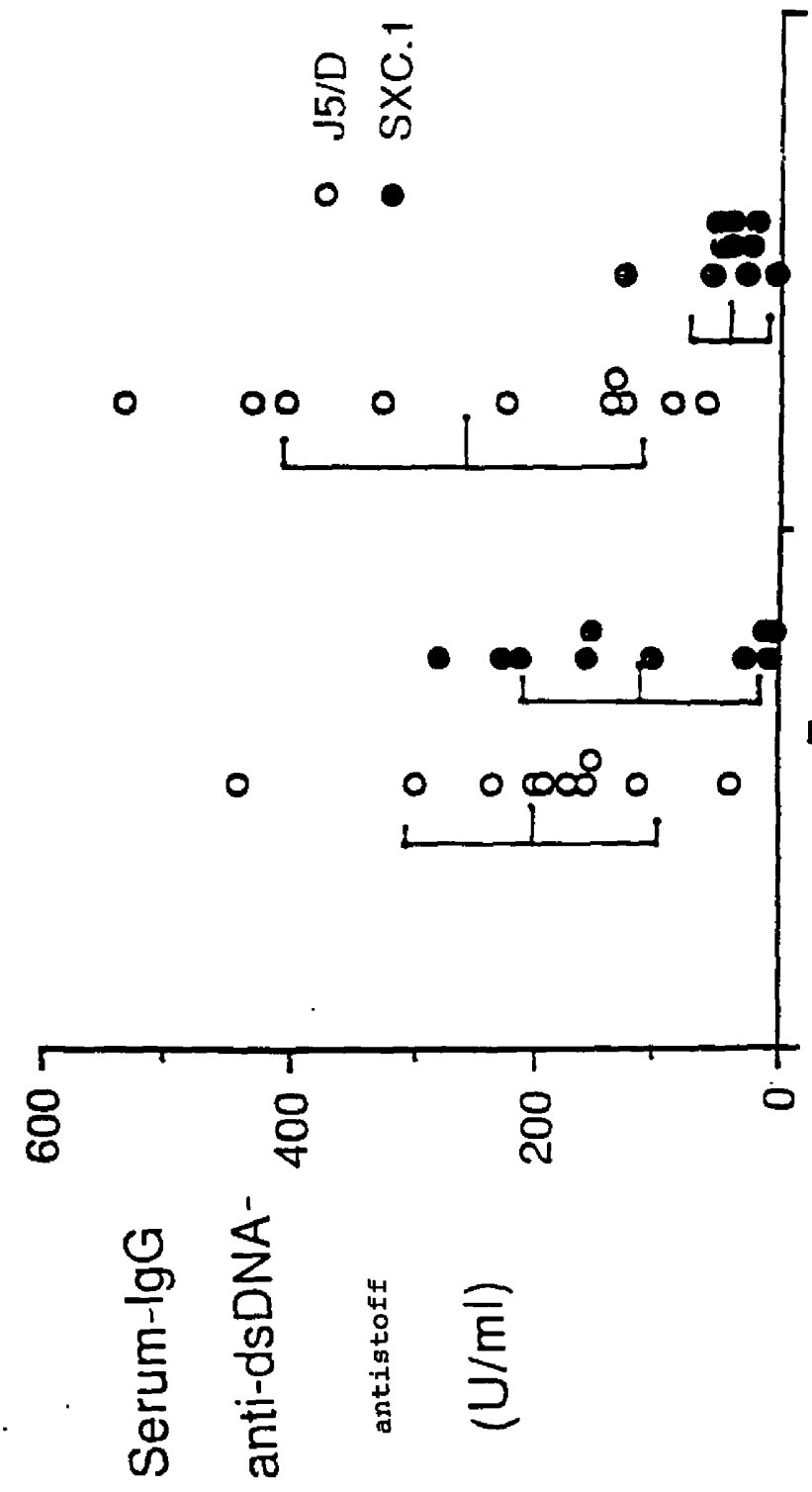
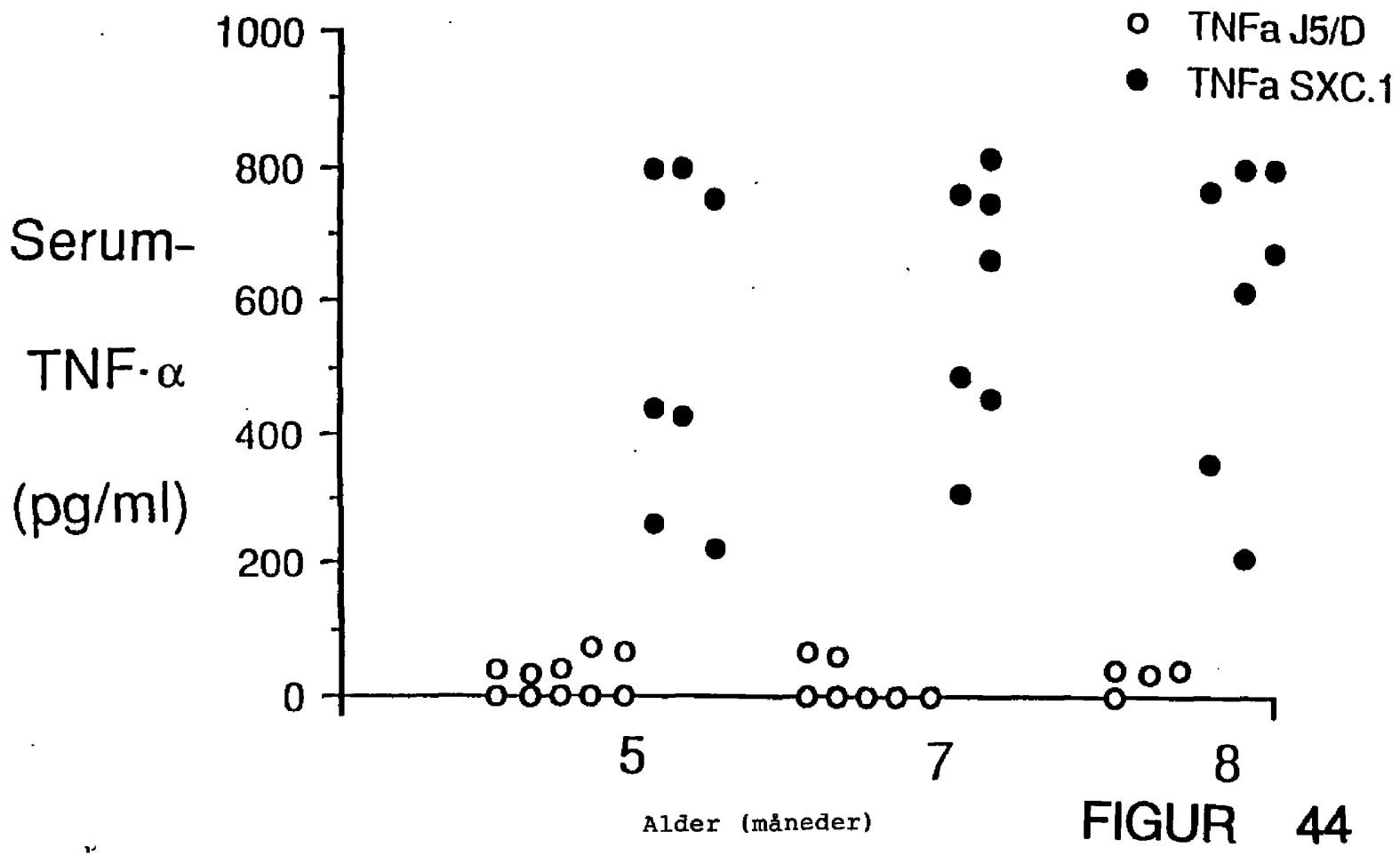


FIG. 42B


Serum-IgG
anti-dsDNA-
antistoff
(U/ml)
600
400
200
0
J5/D
SXC.1
5
6
Alder (måneder)

FIGUR 43


TNFa J5/D
TNFa SXC.1
Serum-
TNF-α
(pg/ml)
1000
800
600
400
200
0
5
7
8
Alder (måneder)

FIGUR 44

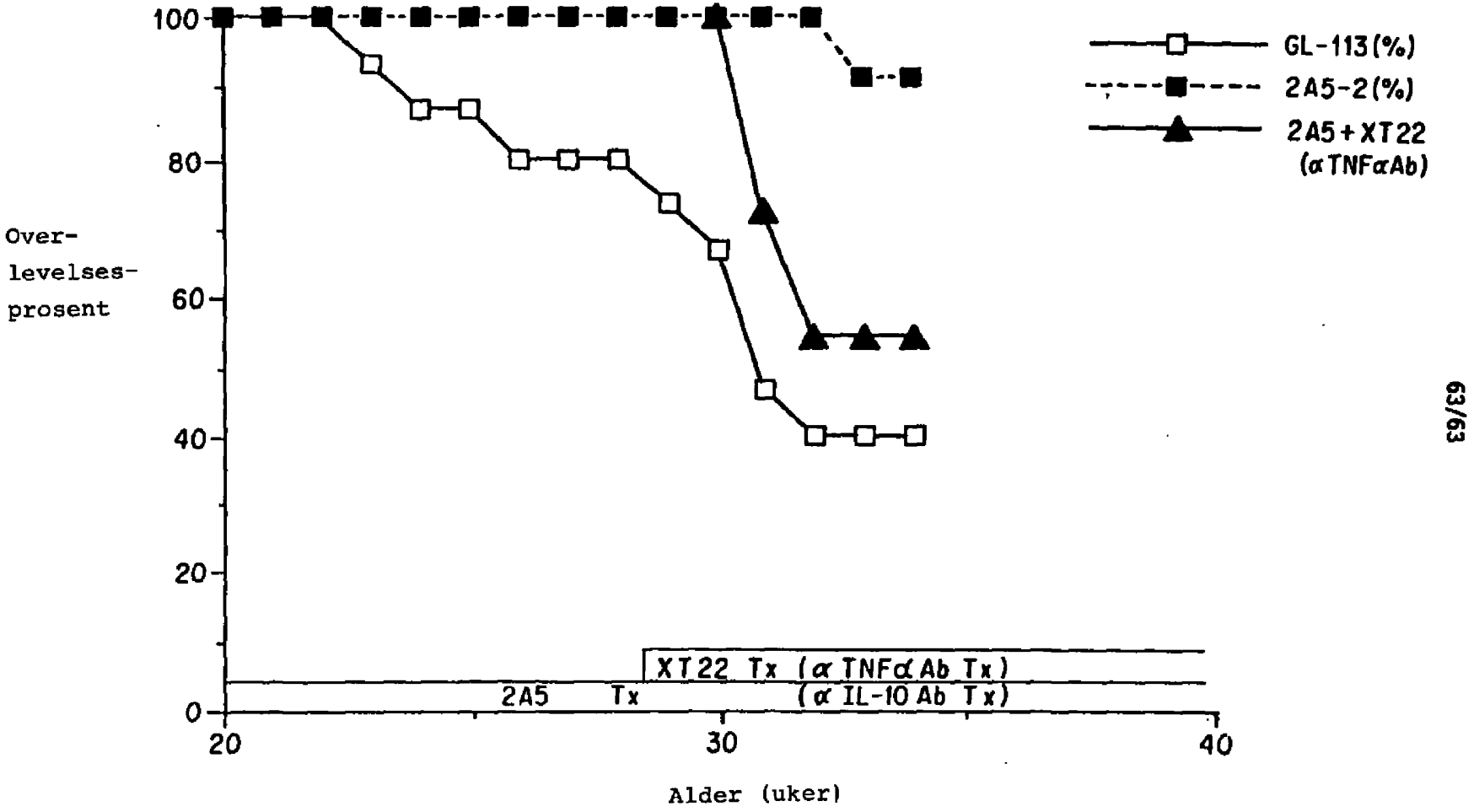

100
80
60
40
20
0
Over-
levelses-
prosent
20
30
40
Alder (uker)
GL-113(%)
2A5-2(%)
2A5+XT22
(αTNFαAb)
XT22 Tx (α TNFα Ab Tx)
2A5 Tx
(α IL-10 Ab Tx)

FIG. 45