



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **329525**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 14/54 (2006.01)

C07K 14/545 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

C12N 15/24 (2006.01)

C12N 15/25 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20014966	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2000.04.13 PCT/IL2000/00220
(22)	Inng.dag	2001.10.12	(85)	Videreføringsdag	2001.10.12
(24)	Løpedag	2000.04.13	(30)	Prioritet	1999.04.13, IL, 129427
(41)	Alm.tilgj	2001.12.11			
(45)	Meddelt	2010.11.01			
(73)	Innehaver	Yeda Research and Development Company Ltd, P O Box 95, IL-76100 REHOVOT, Israel Daniela Novick, Hanassi Harishon Street 40, IL-76302 REHOVOT, Israel Menachem Rubinstein, 1 Hohit Street, IL-76329 REHOVOT, Israel Bianling Liu, Rehovot, IL-, Israel Pierre Graber, Saint-Cergue, CH-, Sveits			
(72)	Oppfinner				
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for fremstilling av et biologisk aktivt cytokin og et cDNA			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 98/39317 A, DINARELLO, C A; Interleukin-1, Cytokine and Growth Factor Reviews, vol. 8, nr. 4, 1997, s 253-265, ISSN: 1359-6101.			
(57)	Sammendrag				

Det beskrives fremstilling av biologisk aktive molekyler fra deres biologisk inaktive forløpere ved mutasjon av deres native spaltningssete til et sete som kan spaltes av en protease, og spaltning av det muterte molekyl for å gi et biologisk aktivt molekyl.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for fremstilling av et biologisk aktivt cytokin og et cDNA.

Oppfinnelsesområde

Foreliggende oppfinnelse vedrører generelt fremstillingen av cytokiner, som produseres *in vivo* fra deres tilsvarende forløpere ved autospaltning, spaltning med
5 andre caspaser eller ved spaltning, f.eks. med proteasen caspase-1, også kjent som interleukin-1 konverterende enzym (ICE). Eksempler på cytokiner produsert på denne måte er interleukin-1 β og interleukin-18.

Bakgrunn for oppfinnelsen

10 Caspaser utgjør en familie av cysteinproteaser som spalter deres målprotein etter en Asp-rest. Av de elleve publiserte kjente caspasene synes caspase-1 og muligens caspase-4, -5 og -11 primært involvert i prosesseringen av proinflammatoriske cytokiner, mens andre spiller avgjørende roller for initieringen og gjennomføringen av apoptose eller programmert celledød. Caspaser har flere trekk til felles,
15 blant annet at de syntetiseres som katalytisk inaktive zymogener som i alminnelighet aktiveres ved spaltning etter spesifikke indre Asp-rester som forekommer i interdomene-linkere, og at de har evnen til å spalte deres substrater etter Asp-rester. Som resultat kan visse modne, aktive caspaser, særlig de som er avledet fra de lange prodomene-caspasene, bearbeide og aktivere deres egne og andre inaktive
20 caspase-zymogener. På grunnlag av primærstrukturen kan proapoptotiske caspaser deles i to klasser, klasse I inkluderer caspase-2, -8, -9 og -10, som inneholder et langt aminoterminalt prodomene, og klasse II, så som caspase-3, -6 og -7 med et kort eller manglende prodomene. *In vitro* spaltningsforsøk tyder på at klasse II caspaser fordrer aktiverte klasse I caspaser for deres proteolytiske prosessering
25 (12).

En annen klassifikasjon av caspaser er ut fra spesifisiteten av spaltningssetet (13). Her har gruppe I caspaser konsensussekvensen WEHD (caspaser -1, -4 og -5), gruppe II caspaser konsensussekvensen DExD (caspaser -2, -3 og -7) og gruppe III caspaser konsensussekvensen (IVL)ExD (caspaser -6, -8 og -9). Caspaser -8-
30 optimalsetet er LETD (14).

Interleukin 18 (IL-18), opprinnelig beskrevet som et interferon- γ . (IFN- γ)-induserende faktor er et nylig karakterisert cytokin som har strukturelle trekk tilfelles

med IL-1-familien av proteiner (1-4). IL-18 ble opprinnelig rensset og senere klonet fra lever fra mus behandlet med varme-inaktivert *Propionbacterium acnes* (*P. acnes*) og deretter med lipopolysakkarid (LPS) (2, 5). Kloning av humant IL-18 har også nylig vært beskrevet (3).

5 I likhet med IL-12, produseres IL-18 av aktiverte makrofager, så som kupfferceller i leveren og andre residente makrofager (3). IL-18 er en tidlig inducer av Th1-responsen, ko-stimulerer produksjonen av IFN- γ , så vel som TNF- γ , granulocyt-makrofag kolonistimulerende faktor og IL-2 (6). Dessuten potenserer det anti-CD3-indusert T-celleproliferasjon og øker naturlig drepercelle cytotoxisitet ved å forsterke
10 ekspresjonen av Fas-ligand (6, 7).

Til forskjell fra de fleste andre cytokiner, som oppviser en 4 heliks-buntstruktur, har IL-18 og IL-1 β en helt β -foldet flakstruktur (7). I likhet med IL-1 β syntetiseres IL-18 som en biologisk inaktiv forløper (proIL-18), som mangler et signalpeptid (3). IL-1 β - og IL-18-forløperne spaltes av caspase-1 (IL-1 β -
15 konverterende enzym eller ICE) som spalter etter en asparaginsyrerest i P1-posisjonen. De resulterende modne cytokinene frigjøres lett fra cellen (8, 9). Studier med caspase-1-manglende mus har vist den viktige rollen av modent IL-18 som en inducer av IFN- γ - og Th1-responser. Injeksjon av *P. acnes* og LPS i slike mus resulterte i lave nivåer sirkulerende IFN- γ sammenlignet med villtype mus (8, 9).

20 Injeksjon av IL-18 gjenopprettet det LPS-induserte IFN- γ -nivå i de caspase-1-manglende mus (9), hvilket ytterligere støtter forestillingen om at caspase-1 er involvert i produksjonen av aktivt IL-18. Andre caspaser og særlig de som spalter intracellulære proteiner assosiert med apoptose, var minst 100 ganger mindre aktive enn caspase-1 (9). Lignende studier med IL-18-manglende mus har vist dets rolle
25 ved NK-celleaktivitet og cytokininduksjon (10).

Rekombinant IL-1 β og mus IL-18 uttrykt i *E. coli*, kan omfoldes til et fullt aktivt cytokin. Forsøk på å uttrykke den modne form av humant IL-18 i *E. coli* eller andre verter, førte ikke til et fullstendig aktivt cytokin. På grunn av dets potensielt terapeutiske anvendelser, f.eks. ved malignitet, eller en hvilken som helst tilstand
30 hvor det trengs induksjon av interferon- γ -produksjon, er det ønskelig å etablere et effektivt ekspresjonssystem for produksjon av modent biologisk aktivt humant IL-18.

WO 9839317 A omhandler faktor X analoger med modifiserte proteasespaltningsseter.

DINARELLO, C A; Interleukin-1, Cytokine and Growth Factor Reviews, vol. 8, nr. 4, 1997, s 253-265, ISSN: 1359-6101 omhandler interleukin-1.

Sammenfatning av oppfinnelsen

5

Foreliggende oppfinnelse muliggjør produksjon av molekyler som, i deres naturlige dannelsesprosess, produseres i en biologisk inaktiv forløperform og som blir aktiv etter spaltning av deres forløper. Dette lar seg ikke lett oppnå *in vitro*.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer således en fremgangsmåte for fremstilling av et biologisk aktivt cytokin fra dets biologiske inaktive forløper, kjennetegnet ved at den omfatter mutering av dets naturlige spaltningssete til et sete som kan spaltes av en protease, og spaltning av den muterte inaktive forløperen for å gi et biologisk aktivt cytokin, hvor cytokinet er valgt fra IL-1 β og IL-18 hvor det naturlige spaltningssete er et caspase-1 spaltningssete. Fortrinnsvis er det biologisk aktive molekyler en caspase eller et cytokin, helst valgt fra IL-1 β og IL-18.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre en fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor proteasen er valgt fra trombin, enterokinase, subtilisin, human rhinovirus 3C protease, Faktor Xa protease og en caspase, fortrinnsvis caspase-8.

Videre omfatter oppfinnelsen en fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, som omfatter transfektering av en vert med en vektor omfattende et cDNA kodende for forløperen av det biologiske aktive cytokinet mutert ved dets spaltningssete, dyrking av den transfekterte verten og isolering av det biologiske aktive cytokinet til behandling med en protease.

Dette kan eventuelt oppnås ved at cDNA fusjoneres i ramme etter en glutation-S-transferase- (GST) kodende sekvens, og det uttrykte fusjonsmolekyl oppfanges på glutation-agarosekuler før behandling med proteasen.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også cDNA som koder for en mutert forløper av et biologisk aktivt cytokin, eventuelt fusjonert til en GST kodende sekvens hvor cytokinet er valgt fra IL-1 β og IL-18 og hvor det naturlige caspase-1 spaltningssetet av den biologiske inaktive forløperen er blitt mutert til et protease spaltningssete.

Ekspresjon av modent IL-18 i *E. coli* resulterer i et protein som mangler biologisk aktivitet. Forsøk på riktig omfolding av IL-18-polypeptidskjelettet av IL-18 uttrykt i *E. coli*, har hittil vært mislykkede. Humant IL-18 og humant IL-1 β uttrykkes *in vivo* som proIL-18- og proIL-1 β -forløpere som spaltes av caspase-1 for å gi biologisk aktivt modent henholdsvis IL-18 og IL-1 β . Caspase-1 er imidlertid ikke kommersielt tilgjengelig. Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en enkel fremgangsmåte for i *E. coli* å fremstille et cytokin og mer foretrukket, humant IL-18. For dette formål ble et cDNA som koder for humant proIL-18, hvor caspase-1-spaltningssetet var mutert inn i spaltningssetet til en kommersielt tilgjengelig protease, f.eks. Faktor Xa, konstruert. For lett manipulering ble den muterte proIL-18 cDNA fusjonert til en glutation-S-transferase- (GST) kodende sekvens. Det resulterende GST-proIL-18-fusjonsprotein som har et Faktor Xa-spaltningssete, ble uttrykt i *E. coli* og oppfanget på glutation-agarosekuler. Modent humant IL-18 som oppviste høy biologisk aktivitet, ble frigitt fra kulene ved spaltning med Faktor Xa.

Tilsvarende muteres den DNA-sekvens som koder for caspase-1-spaltningssetet til humant IL-1 β , inn i et spaltningssete for Faktor Xa. For lett manipulering, fusjoneres den muterte proIL-1 β cDNA i ramme med en glutation-S-transferase- (GST) kodende sekvens. Det resulterende GST-proIL-1 β -fusjonsprotein som har et faktor Xa-spaltningssete, uttrykkes i *E. coli* og oppfanges på glutation-agarosekuler. Modent humant IL-1 β frigis fra kulene ved spaltning med Faktor Xa.

Når caspase-8 benyttes for spaltning gjennomføres en lignende fremgangsmåte, hvor forskjellen består i at caspase-1-spaltningssetet til enten humant IL-18 eller humant IL-1 β , muteres inn i et spaltningssete for caspase-8. Deretter foretas fusjon til en GST-kodende sekvens og øvrige fremgangsmåte-trinn foretas som beskrevet ovenfor.

Kort beskrivelse av figurene

Figur 1 beskriver kloningen av cDNA som koder for human proIL-18-mutant (proIL-18_{IEGR}). Denne cDNA ble klonet i tre PCR-trinn ved å benytte en overlappende primermetode. Banene er: M, DNA-størrelsesmarkører, angitt på venstre side; 1, en 498 bp DNA produsert gjennom den første PCR; 2, en 551 bp DNA produsert

gjennom den andre PCR; 3, en 600 bp DNA produsert gjennom den tredje PCR, som koder for humant proIL-18_{IEGR}.

Figur 2 viser strukturen av ekspresjonsplasmidet pGEX-proIL-18_{IEGR}.

(a) Flankerende nukleinsyresekvenser av det 600 bp BamHI/EcoRI cDNA som koder for humant proIL-18_{IEGR}. Restriksjonsseter for BamHI og EcoRI og målsetet for Faktor Xa er angitt med klammere. En åpen pil indikerer Faktor Xa-spaltningsssetet. (b) Skjematisk fremstilling av pGEX-2TK. Restriksjonssetene er også vist. Den fylte pilen indikerer BamHI/EcoRI-ligeringssetet for innskuddet.

Figur 3 viser SDS-PAGE av råproteinekstraktene av *E. coli* som uttrykker GST-proIL-18_{IEGR}-fusjonsproteinet. Banene er: 1. Celler transformert med det parentale plasmid pGEX-2TK. 2. Celler transformert med det parentale plasmid pGEX-2TK og indusert med 0,1 mM isopropyltio-galaktosid (IPTG). Det forventede 26 kD båndet av glutation-tioreduktase (GST) er angitt med en pil på venstre side. Bane 3-7 viser celler transformert med plasmid pGEX-proIL-18_{IEGR} og enten ikke indusert (bane 3) eller indusert med IPTG i de angitte tidsrom. Båndet på 34 kD indikert med en pil på høyre side, tilsvarer i størrelse GST-proIL-18_{IEGR}-fusjonsproteinet.

Figur 4 viser SDS-PAGE (10% akrylamid) av GST-proIL-18_{IEGR}-fusjonsproteinet etter rensing på glutation-agarose. Supernatant av ultralydbehandlet bakterieoppslemming (se Fig. 3, bane 7) ble affinitetsrenset på glutation-agarose. Banene er: 1. Molekylmassemarkører (angitt med kD på venstre side); 2. Affinitetsrenset GST-proIL-18_{IEGR}. Gelen ble farvet med coomassieblått.

Figur 5 viser SDS-PAGE (12% akrylamid) av det rensede humane IL-18. GST-proIL-18_{IEGR}-fusjonsproteinet oppfanget på glutation-agarosekuler og inkubert med Faktor Xa i et protease:substrat-forhold på 1:50 (vektdele) og supernatant ble analysert etter 6 timer. Bane 1, molekylvektmarkører angitt i kD på venstre side; bane 2, humant IL-18 i supernatanten av glutation-agarosekulene. Gelen ble farvet med coomassieblått.

Figur 6 viser en bioassay av det humane IL-18. Humant IL-18 i de angitte doser ble tilsatt til kulturene av murine ikke-plast adhererende miltceller (5×10^6 celler/brønn) i nærvær av Concanavalin A (0,125 µg/mL) og polymyxin B (1 µg/mL). Supernatanten ble analysert med henblikk på murin interferon-gamma

ved ELISA. Nivået av interferon-gamma induisert med IL-18 (100 ng/mL) uten Con A var 160 pg/mL.

Figur 7 viser skjematisk fremgangsmåten som ligger til grunn for rensingen av hIL-18 ved å benytte caspase-8.

Figur 8 viser sekvensen av GST-prohIL-18_{LETD}. Innrammingen indikerer caspase-8-spaltningssetet. Den understrekede sekvens er det modne hIL-18.

Figur 9 viser en coomassieblått-farvet SDS-PAGE (10% akrylamidgel) av GST-proIL-18_{LETD}-fusjonsproteinet etter rensing på glutathion-agarose. Supernatant av oppbrutte celler av rekombinant E. coli JM109 som uttrykker GST-proIL-18_{LETD}, ble affinitetsrenset på glutathion-agarose og oppsluttet med caspase-8 på fast fase. Supernatanten etter oppslutning ble konsentrert og sortert etter molekylstørrelse på Superdex-75. Banene er: 1, molekylmassemarkører (angitt i kD på venstre side); 2, supernatant av oppbrutte celler; 3, affinitetsrenset GST-proIL-18_{LETD}; 4, glutathion-agarose-harpiks etter oppslutning i 4 timer med caspase-8 fastfase; 5, konsentrert caspase-8 etter 4 timer oppslutning; 6, Superdex-75 forråd av rent hIL-18.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

cDNA koder for humant proIL-18, hvor caspase-1-spaltningssetet var mutert inn i et Faktor Xa-sete. Andre mutasjoner som frembringer spaltningsseter egnet for andre proteaser kan benyttes.

Eksempler på mulige spaltningsseter og egnede proteaser er:

Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser (SEKV. ID. NR:1), en sekvens spaltet mellom aminosyrene Arg og Gly av protasen trombin.

Ile-Glu-Gly-Arg (SEKV. ID. NR:2), en sekvens spaltet etter Arg-resten av proteasen Faktor Xa.

Asp-Asp-Asp-Lys (SEKV. ID. NR:3), en sekvens spaltet etter Lys-resten av proteasen enterokinase.

His-Tyr (SEKV. ID. NR:4), en sekvens spaltet etter Tyr-resten av proteasen subtilisin eller av dens variant Genenase™ (New England Biolabs).

Tyr-His (SEKV. ID. NR:5), en sekvens spaltet etter Tyr-resten av proteasen subtilisin eller av dens variant Genenase™ (New England Biolabs).

Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro (SEKV. ID. NR:6), en sekvens spaltet etter Gln-resten av den humane rhinovirus 3C-protease.

Tilsvarende fremstilles et cDNA som koder for humant proIL-1 β , hvor caspase-1-spaltningssetet muteres inn i Faktor Xa-setet. Andre mutasjoner som frembringer spaltningsseter egnet for andre proteaser, kan benyttes.

Eksempler på mulige spaltningsseter og egnede proteaser er:

Ile-Glu-Gly-Arg (SEKV. ID. NR:2), en sekvens spaltet etter Arg-resten av proteasen Faktor Xa.

Asp-Asp-Asp-Lys (SEKV. ID. NR:3), en sekvens spaltet etter Lys-resten av proteasen enterokinase.

Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro (SEKV. ID. NR:6), en sekvens spaltet etter Gln-resten med den humane rhinovirus 3C-protease.

Valget av mutasjon avhenger av følgende parametre: spaltningssetet frembragt ved mutasjonen må være meget spesifikt for å unngå uønsket spaltning i andre seter i det samme polypeptidskjelett av proIL-18 eller proIL-1 β ; proteasen må oppvise høy grad av spesifisitet for det konstruerte spaltningssetet; proteasen må være lett tilgjengelig, f.eks. fra kommersielle kilder; og mutasjonen bør fortrinnsvis ikke innføre en vesentlig endring i den sekundære eller tertiære struktur av proIL-18 eller proIL-1 β . Anvendelsen av Faktor Xa eller enterokinase eller subtilisin er å foretrekke fremfor de øvrige proteaser på grunn av at det resulterende IL-18 eller IL-1 β ikke har noen mutert aminosyre. Anvendelsen av Faktor Xa er mest fordelaktig fordi den fordrer de mest konservative mutasjoner og derved reduserer risikoen for endret sekundær eller tertiær struktur av proIL-18 eller proIL-1 β og risikoen for at det ikke vil finne sted spaltning. Anvendelsen av Faktor Xa eller enterokinase er å foretrekke fremfor de øvrige proteaser på grunn av at det resulterende IL-18 eller IL-1 β ikke har noen muterte aminosyrer.

For å konstruere et cDNA som koder for en human proIL-18-mutant (proIL-18_{IEGR}) hvor caspase-1-spaltningssetet er mutert inn i et Faktor Xa-spaltningssete, ble følgende mutasjoner innført i den humane proIL-18 cDNA: L33I; S35G og D36R. Disse mutasjonene ga Faktor Xa gjenkjenningssekvensen IEGR.

En vektor som uttrykker humant proIL-18_{IEGR} ble konstruert på følgende måte. Perifere mononukleære blodceller (PBMC) fra en frisk donor, ble stimulert med bakterielt lipopolysakkarid (LPS). Total RNA ble ekstrahert fra cellene. RNA ble revers-transkribert og den resulterende cDNA tjente som templat for en polymerasekjedereaksjon (PCR). Mutasjonen ble innført i sekvensen ved å benytte over-

lappende primere i tre PCR-trinn (Fig. 1). Det resulterende 600 bp PCR-produkt som koder for mutert humant proIL-18 ble klonet inn i en TA-kloningsvektor (pGEM-T Easy, Promega) og dens DNA-sekvens bekreftet ved DNA-sekvensanalyse. Det resulterende pGEM-T-proIL-18_{IEGR}-plasmid ble kuttet med EcoRI og BamHI og fragmentet på 600 bp som koder for humant proIL-18_{IEGR} ble subklonet inn i den prokaryote ekspresjonsvektor pGEX-2TK inneholdende GST-gensekvensen (Pharmacia). Den resulterende ekspresjonsvektor inneholdt sekvensen av det humane proIL-18_{IEGR}-gen fusjonert i ramme til 3'-enden av GST-genet (Fig. 2).

Ekspresjon og rensing av GST-proIL-18_{IEGR} ble deretter foretatt. En fersk enkeltkoloni av *E. coli* JM109 transformert med plasmid pGEX-proIL-18_{IEGR}, ble dyrket under risting ved 37°C inntil en tetthet på 0,6 OD₆₀₀ ble oppnådd. Protein-ekspresjon ble deretter induisert med isopropyltiogalaktosid (IPTG) og dyrkning fortsatt ved 37°C i 3 timer. SDS-PAGE av totale bakterieproteiner viste induksjonen av et 43 kD protein som i størrelse tilsvarte GST-proIL-18_{IEGR} (Fig. 3). Alle opparbeidningstrinn for isolering av GST-proIL-18_{IEGR} ble foretatt ved 4°C. Bakterier ble høstet ved sentrifugering, resuspendert i fosfatbufret saltvann (PBS) inneholdende proteaseinhibitorer. Bakteriene ble lysert ved ultralydbehandling, Triton X-100 ble tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 1%, og det klarnede lysat ble blandet med glutation-agarosekuler (Pharmacia). Kulene ble vasket, og en aliquot av kulene ble analysert ved SDS-PAGE. Et enkelt 43 kD bånd, tilsvarende GST-proIL-18_{IEGR}-fusjonsproteinet ble funnet (Fig. 4). Kulene ble deretter oppsluttet med Faktor Xa og supernatanten oppsamlet. SDS-PAGE av supernatanten ga et hovedbånd på ca. 18 kD, i overensstemmelse med den forventede masse av modent humant IL-18. Et ytterligere svakere bånd på 19,5 kD ble også registrert (Fig. 5). Proteinsekvensanalyse av 18 kD og 19,5 kD båndene ga i begge tilfeller den forventede N-terminale sekvens av modent humant IL-18. Et 43 kD bånd, tilsvarende GST-proIL-18_{IEGR}-fusjonsproteinet, var fremdeles tilstede i glutation-agarosekulene etter oppslutning, hvilket indikerer en ufullstendig spaltning (ikke vist).

Det rekombinante humane IL-18 ble testet med henblikk på biologisk aktivitet i murine splenocytter, basert på dets evne til å indusere ekspresjonen av interferon-gamma. Inkubering av ikke-adherente miltceller fra mus med humant IL-18 alene, oppviste liten IFN-gamma-produksjon, hvilket tyder på behovet for en ko-stimulant. Con A alene som 0,125 µg/mL klarte ikke å indusere signifikante nivåer av IFN-γ. Når

de ikke-adherente splenocytene ble inkubert med Con A og IL-18 ifølge foreliggende oppfinnelse, ble det oppnådd en dose-avhengig induksjon av IFN- γ (Fig. 6).

For å konstruere et cDNA som koder for en human proIL-1 β -mutant (proIL-1 β_{IEGR}), hvor caspase-1-spaltningssetet er mutert inn i et Faktor Xa-spaltningssete, ble følgende mutasjoner innført i det humane proIL-1 β cDNA: Y113I, V114E, H115G og D116R. Disse mutasjonene førte til Faktor Xa gjenkjenningsssekvensen IEGR.

De følgende trinn tas for å konstruere en vektor som uttrykker humant proIL-1 β_{IEGR} . Perifere mononukleære blodceller (PBMC) fra friske donorer stimuleres med bakterielt lipopolysakkarid (LPS). Total RNA ekstraheres fra cellene. RNA revers-transkribes og den resulterende cDNA tjener som templat for en polymerasekjedereaksjon (PCR) med primere tilsvarende den kodende sekvens av humant proIL-1 β . Det resulterende PCR-produkt klones inn i en TA-kloningsvektor, f.eks. pGEM-T Easy fra Promega og underkastes deretter stedsrettet mutagenese med et passende oligonukleotid. Sekvensen av den resulterende vektor som koder for mutert humant proIL-1 β , verifiseres ved sekvensanalyse. Det resulterende pGEM-T-proIL-1 β_{IEGR} -plasmid kuttet med riktige restriksjonsenzym, og ~820 bp fragmentet som koder for humant proIL-1 β_{IEGR} subklones inn i den prokaryote ekspresjonsvektoren pGEX-2TK (Pharmacia). Den resulterende ekspresjonsvektor inneholder sekvensen av det humane proIL-1 β_{IEGR} -gen fusjonert i ramme til 3'-enden av GST-genet.

Ekspresjon og rensing av GST-proIL-1 β_{IEGR} foretas tilsvarende. En fersk enkeltkoloni av E. coli JM109 transformert med plasmid pGEX-proIL-1 β_{IEGR} , dyrkes under risting ved 37°C inntil en tetthet på 0,6 OD₆₀₀ oppnås. Proteinekspresjon induseres deretter med isopropyltiogalaktosid (IPTG) og dyrkning fortsettes ved 37°C i 3 timer. SDS-PAGE av totale bakterieproteiner viser induksjonen av et ~52 kD protein som i størrelse tilsvarende GST-proIL-1 β_{IEGR} . Alle opparbeidningstrinn for isolering av GST-proIL-1 β_{IEGR} foretas ved 4°C. Bakterier høstes ved sentrifugering, resuspenderes i fosfatbufret saltvann (PBS) inneholdende proteaseinhibitorer. Bakteriene lyses ved ultralydbehandling, Triton X-100 tilsettes til en slutt-konsentrasjon på 1% og det klarnede lysat blandes med glutation-agarosekuler (Pharmacia). Kulene vaskes, og en alikvot av kulene analyseres ved SDS-PAGE med henblikk på forekomsten av ~52 kD GST-IL-1 β -fusjonsproteinet. Kulene kuttet

deretter med Faktor Xa og supernatanten som inneholder modent humant IL-1 β oppsamles.

Caspase gjenkjenningsseter er satt sammen av fire aminosyrer, hvor den siste er asparaginsyre. Generelt oppviser caspase en høyere og annen spesifisitet for spaltningssetene enn vanlig benyttede proteaser, hvilket byr på betydelige fordeler for kutting av fusjonspeptider sammenlignet med tidligere beskrevne proteaser. Renseprosessen er eksemplifisert i Fig. 7.

Foretrukne spaltningsseter for hver caspase er beskrevet i litteraturen (Ann. Rev. Bioch. 1999, 68:383-424). Alle disse har resten Asp tilfelles i P1-posisjonen.

Plasmidet beskrevet ovenfor, pGEX-proIL-18_{IEGR}, ble modifisert for å oppnå en forskjellig human proIL-18-mutant (proIL-18_{LETD}, se Figur 8) hvor Faktor Xa-spaltningssetet er mutert inn i et caspase-8-spaltningssete. Dette muliggjør anvendelsen av caspase-8 for spaltning.

En annen fordel ved å benytte caspase, er dens høye effektivitet med hensyn til oppslutningsutbytte og oppslutningstid. Det ble oppdaget at ved sammenligningen av IL-18-protein oppnådd fra pGEX-proIL-18_{IEGR} og pGEX-proIL-18_{LETD} at enzymmengden og den tid som trengs for å oppnå 1 mg hIL-18, er redusert. Fremgangsmåten fører til produksjon av et protein av den forventede størrelse (Fig. 9) og bioaktivitet.

Caspase-8 er ikke den eneste egnede caspase, og, avhengig av forekomst eller ikke av et spesifikt caspase-spaltningssete i et protein av interesse for å rense eller ut fra andre kriterier, kan de mutasjoner som tilsvarer spaltningssetet av en hvilken som helst annen caspase benyttes.

Caspasen kan fjernes fra proteinet av interesse ved å benytte vanlige rensemetoder, som f.eks. gelfiltrering eller ionebytterkromatografi.

Fremgangsmåten som her er beskrevet gir således rensede, biologisk aktive humanproteiner, så som IL-18 og IL-1 β fra E. coli. Det viser seg at korrekt folding av disse cytokinene først fordrer ekspresjon som en forløper og deretter spaltning til dens modne form.

Humant IL-18 adskiller seg i så henseende fra murint IL-18 som kan uttrykkes i vertsceller som et modent, biologisk aktivt cytokin.

Oppfinnelsen vil nedenfor bli illustrert gjennom de følgende eksempler:

Eksempel 1: Konstruksjon av et plasmid som koder for humant proIL-18 med et Faktor Xa-sete

PBMC ble oppnådd fra perifert blod fra friske forsøkspersoner ved Ficoll-Paque PLUS (Pharmacia) densitetsgradientseparering. PBMC ble vasket to ganger med iskald PBS inneholdende 2% FBS og resuspendert til $2,5 \times 10^6$ celler/mL i RPMI-1640 medium, supplert med føtalt bovint serum (FBS), 2 mM L-glutamin, 100 U/mL penicillin og 100 U/mL streptomycin (RPMI-10). Kulturen ble stimulert med LPS (1 µg/mL, 3 timer, 37°C). Total RNA ble ekstrahert fra cellene med TriPure™ Isolation Reagent (Boehringer Mannheim). 1 µg total RNA ble benyttet for RT-PCR med Titan ett-rørs RT-PCR sett (Boehringer, Mannheim) i henhold til produsentens instruksjoner.

ProIL-18_{IEGR} cDNA ble konstruert ved en tre trinns PCR under bruk av den overlappende primermetode. De forskjellige primerne ble konstruert på grunnlag av den humane proIL-18 cDNA (GenBank tilgangsnummer D49950 (3)).

For den første PCR var forover-primeren:

5'-AACATCGAAGGTCGTTACTTTGGCAAGCTTGAATC-3' (SEKV. ID. NR:7) og reversprimeren var 5'-CGCGAATTCCTAGTCTTCGTTTTGAACAGT-3' (SEKV. ID. NR:8). Et EcoRI-sete ble inkludert i revers-primeren. Templatet var en revers-

transkribert total cellulær RNA, isolert fra de LPS-stimulerte PBMC. Varme-

sykliseringsbetingelsene var: 10 sykluser ved 94°C, 30 sekunder; 55°C, 30 sekunder og 68°C, 2 minutter etterfulgt av 25 sykluser ved 94°C i 30 sekunder; 55°C, 30 sekunder og 68°C, 125 sekunder/syklus. Det resulterende 498 bp PCR-produkt ble amplifisert i det andre PCR-trinn ved å benytte den overlappende forover-primer:

5'-TGGCAATGAAATTTATTGACAATACGCTTTACTTTATAGCTGAAGATGATG-AAAACATCGAAGGTCGTTACTTTG-3' (SEKV. ID. NR:9) og den reverse primer fra

det forrige trinn. Varmesykliseringsbetingelsene var: 30 sykluser ved 94°C, 30 sekunder; 56°C, 30 sekunder og 72°C, 1 minutt. Det resulterende 551 bp produkt ble amplifisert i det tredje trinn ved benytte den overlappende forover-primeren:

5'-CGTGGATCCATGGCTGCTGAACCAAGTAGAAGACAATTGCATCAACTTTGTG-GCAATGAAATTTATTGAC-3' (SEKV. ID. NR:10) og den reverse primer fra de

tidligere trinn. Et BamHI-sete ble inkludert i foroverprimeren. Varmesykliseringsbetingelsene var de samme som for det forrige trinn. Det resulterende 0,6 kb PCR-produkt (Fig. 1) ble rensset med et High Pure™ PCR Product Purification Kit

(Boehringer, Mannheim) og ligert inn i pGEM-T Easy vektoren for å gi plasmid pGEM-proIL-18_{IEGR}. Ligeringsprodukter ble transformert inn i JM109 kompetente celler (Promega Corporation). Standard kloningsprotokoller ble hele tiden benyttet (11).

Plasmid pGEM-proIL-18_{IEGR} fra en enkeltkoloni, ble verifisert med henblikk på tilstedeværelse av et riktig innskudd ved restriksjonsenzymoppslutning og DNA-sekvensering. Plasmidet ble oppsluttet med BamHI og EcoRI. Den resulterende BamHI/EcoRI DNA som koder for humant proIL-18_{IEGR} ble separert ved elektroforese i 1,0% agarose, og 0,6 kb båndet ble isolert fra gelen med et QIAquick Gel Extraction Kit (DIAGEN, Tyskland). Denne DNA ble ligert inn i pGEX-2TK ekspresjonsvektoren (Pharmacia) som var linearisert med BamHI og EcoRI. Det resulterende rekombinante plasmid pGEX-proIL-18_{IEGR} (Fig. 2) ble transformert inn i E. coli JM109-stamme, og den resulterende vektor ble bekreftet ved restriksjonsenzymoppslutning og nukleinsyresekvensering.

Eksempel 2: Ekspresjon og rensing av GST-proIL-18_{IEGR}-fusjonsprotein

En 50 mL over natten kultur fra en fersk enkeltkoloni av E. coli JM109, transformert med plasmid pGEX-proIL-18_{IEGR}, ble fortynnet i 450 mL LB-medium inneholdende 100 U/mL ampicillin og dyrket under risting ved 37°C inntil en OD₆₀₀ på 0,6 ble oppnådd. Proteinekspresjon ble deretter indusert ved tilsetning av IPTG til en sluttkonsentrasjon på 0,1 mM og videre dyrkning ved 37°C i 3 timer. Bakterier ble høstet ved sentrifugering (5000 x g, 5 minutter, 4°C) og hurtig resuspendert i et 1:100 startvolum iskaldt fosfatbufret saltvann (PBS; 150 mM NaCl, 16 mM Na₂HPO₄, 4 mM NaH₂PO₄, pH 7,3) som inneholdt proteaseinhibitorer (leupeptin 1 µg/mL, pepstatin A 1 µg/mL, aprotinin 2 µg/mL, PMSF 0,2 mM og EDTA 5 mM). Celler ble lysert på is ved svak ultralydbehandling (4 x 15 sek. støt). Triton X-100 ble tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 1% og blandingen holdt på is i 5 minutter. Det klarnede lysat (14.000 x g, 15 min., 4°C) ble blandet med en 50% suspensjon av glutation-agarosekuler (2 mL, Pharmacia), og blandingen ble inkubert ved forsiktig risting ved 4°C i 3 timer. Kulene ble pelletert ved sentrifugering (500 x g, 5 min.), vasket to ganger med 10 volumer lyseringsbuffer (1% Triton X-100 i PBS), to ganger med 10 volumer 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, to ganger med 10 volumer 20 mM Tris-HCl, pH 8,0,

150 mM NaCl, og to ganger med 10 volumer 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 2,0 mM CaCl₂ (spaltningsbuffer). Alle trinn ble foretatt ved 4°C.

Eksempel 3: Spaltning av fusjonsproteinet og rensing av modent humant IL-18

5 Glutation-agarosekulene med bundet GST-proIL-18_{IEGR}-fusjonsprotein ble inkubert (6 timer, 23°C) med Faktor Xa (New England Biolabs) i 1 mL spaltningsbuffer, ved å benytte et protease:substrat-forhold på 1:50 (vektdele) med konstant blanding på et dreierende hjul. Dette trinn erstatter det modne humane IL-18. Kulene ble pelletert ved sentrifugering ved 500 x g i 5 minutter ved 4°C og vasket fem
10 ganger med 2 mL iskald PBS. Supernatanten og alle vaskevolumer ble kombinert, klarnet ved sentrifugering (14.000 x g, 15 min., 4°C) og konsentrert ved ultrafiltrering (Centricon-10, Amicon). Alikvoter av proteinet, så vel som kuler før og etter oppslutning, ble separert ved 0,1% SDS-12% polyakrylamidgel-elektroforese etterfulgt av farving med coomassieblått. Et hovedbånd på ca. 18 kD, ble i overensstemmelse
15 med den forventede masse av modent humant IL-18, oppnådd i supernatanten. Et mindre bånd på 19,5 kD ble likeledes observert (Fig. 5). N-terminal proteinsekvensanalyse av de to båndene ga sekvensen YFGK...., i overensstemmelse med modent humant IL-18. Det rensede protein ble sterilisert gjennom et 0,2 µ filter og oppbevart ved -70°C.

Eksempel 4: Bioassay av humant IL-18

Human IL-18-aktivitet ble bestemt som beskrevet (2). I korthet ble milten fra normale C3H/HeJ-mus eksidert, oppmalt og eksponert for Gey-buffer (0,144M NH₄Cl i 0,017M Tris-HCl, pH 7,2) for å sprengte erytrocytter. De hvite cellene ble vasket to
25 ganger med RPMI-5 og deretter resuspendert i RPMI-10. For fremstillingen av celler som ikke adhererte til plast, ble celsuspensjoner inkubert (60 min., 37°C) i 100 mM plastplater (Becton Dickinson, Ltd., UK). Ikke-adherente celler ble samlet forsiktig opp, sentrifugert og resuspendert i RPMI-10. Levende celler ble tellet ved hjelp av farvestoff-eksklusjonstesten med trypanblått, og cellekonsentrasjonen ble justert til
30 5 x 10⁶ celler/mL. De fleste av de uspesifikke esterase-positive cellene ble fjernet ved disse prosessene. Suspensjoner av celler (0,15 mL) som ikke adhererte til plast, ble anbragt i en 96-brønns flatbunnet mikrotiterplate (NUNCLON™, Danmark). Forskjellige konsentrasjoner av IL-18, polymyxin (1 µg/mL) og Con A (0,125 µg/mL)

ble tilsatt til brønnene i 50 μ L RPMI-10. Platene ble inkubert i 24 eller 48 timer ved 37°C i 5% CO₂. Etter inkubering ble supernatanter oppsamlet, og murine IFN- γ -titere ble bestemt ved ELISA. Inkubering av ikke-adhererende musemiltceller med kun humant IL-18 oppviste liten IFN- γ -produksjon, hvilket tyder på behov for en ko-

5 stimulant. Con A alene som 0,125 μ g/mL induserte ikke signifikante nivåer av IFN- γ . Når de ikke-adherente splenocytene ble inkubert ved Con A og det humane IL-18 ifølge foreliggende oppfinnelse, ble det oppnådd en dose-avhengig induksjon av IFN- γ (Fig. 6).

10 **Eksempel 5: Konstruksjon av et plasmid som koder for humant proIL-1 β med et Faktor Xa-sete**

PBMC ble oppnådd fra perifert blod fra friske forsøkspersoner ved Ficoll-Paque PLUS (Pharmacia) densitetsgradientseparasjon. PBMC vaskes to ganger med iskald PBS inneholdende 2% FBS og resuspenderes til $2,5 \times 10^6$ celler/mL i

15 RPMI-1640 medium, supplert med føtalt bovint serum (FBS), 2 mM L-glutamin, 100 U/mL penicillin og 100 U/mL streptomycin (RPMI-10). Kulturen stimuleres med LPS (1 μ g/mL, 3 timer, 37°C). Total RNA ekstraheres fra cellene med TriPure™ Isolation Reagent (Boehringer, Mannheim). 1 μ g total RNA benyttes for RT-PCR med Titan ett-rørs RT-PCR settet (Boehringer, Mannheim) i henhold til produsentens

20 fremgangsmåte.

ProIL-1 β cDNA kloneres ved PCR med sense- og revers-primere konstruert på basis av den humane proIL-1 β cDNA (GenBank tilgangsnummer M15330). Sense-primeren tilsvarer nukleotidene 87-107 av sekvensen M15330, som foran disse har et BamHI-spaltningssete. Reversprimeren tilsvarer nukleotidene 896-876 av

25 sekvensen M15330, som foran disse har et EcoRI-sete. Templaten er en revers-transkribert total cellulær RNA, isolert fra de LPS-stimulerte PMBC. Varmsykliseringsbetingelsene er: 10 sykluser ved 94°C, 30 sekunder; 55°C, 30 sekunder og 68°C, 2 minutter etterfulgt av 25 sykluser ved 94°C, 30 sekunder; 55°C, 30 sekunder og 68°C, 125 sekunder/syklus. Det resulterende 830 bp PCR-produkt

30 renses ved hjelp av et High Pure™ PCR Product Purification Kit (Boehringer, Mannheim) og liggeres inn i pGEM-T Easy vektoren for å gi plasmid pGEM-proIL-1 β . Plasmidet underkastes stedsrettet mutagenese med oligonukleotidet ACATGGGATAACGAGGCTATTGAAGGCCGGGCACCTGTACGA (SEKV. ID.

NR:11), tilsvarende nukleotidene 405–452 av human IL-1 β mRNA og som har mutasjonene Y113I, V114E, H115G og D116R.

Det resulterende plasmid pGEM-proIL-1 β _{IEGR} fra en enkeltkoloni verifiseres med henblikk på forekomsten av et riktig innskudd ved restriksjonsenzymoppslutning og DNA-sekvensering. Plasmidet oppsluttes med BamHI og EcoRI. Det resulterende BamHI/EcoRI DNA som koder for humant proIL-1 β _{IEGR} spaltes ved elektroforese i 1,0% agarose, og båndet på 0,82 kb isoleres fra gelen med et QIAquick Gel Extraction Kit (DIAGEN, Tyskland). Denne DNA liggeres inn i pGEX-2TK-ekspressjonsvektoren (Pharmacia) som lineariseres med BamHI og EcoRI. Det resulterende rekombinante plasmid pGEX-proIL-1 β _{IEGR} transformeres inn i E. coli JM109-stamme, og den resulterende vektor bekreftes ved restriksjonsenzymoppslutning og nukleinsyresekvensering.

Eksempel 6: Ekspresjon og rensing av GST-proIL-1 β _{IEGR}-fusjonsprotein

En 50 mL over natten kultur fra en fersk enkeltkoloni av E. coli JM109 transformert med plasmid pGEX-proIL-1 β _{IEGR} fortynnes i 450 mL LB-medium inneholdende 100 U/mL ampicillin, og dyrkes under risting ved 37°C inntil det oppnås en tetthet på 0,6 OD₆₀₀. Proteinekspresjon induseres deretter ved tilsetning av IPTG til en sluttkonsentrasjon på 0,1 mM og videre dyrkning ved 37°C i 3 timer. Bakterier høstes ved sentrifugering (5000 x g, 5 min., 4°C) og resuspenderes raskt i et 1:100 utgangsvolum iskaldt fosfatbufret saltvann (PBS; 150 mM NaCl, 16 mM Na₂HPO₄, 4 mM NaH₂PO₄, pH 7,3) som inneholder proteaseinhibitorene (leupeptin 1 µg/mL, pepstatin A 1 µg/mL, aprotinin 2 µg/mL, PMSF 0,2 mM og EDTA 5 mM). Celler lyseres på is ved svak ultralydbehandling (4 x 15 sek. støt). Triton X-100 tilsettes til en sluttkonsentrasjon på 1%, og blandingen holdes på is i 5 minutter. Det klarnede lysat (14.000 x g, 15 minutter, 4°C) blandes med en 50% suspensjon av glutationsagarosekuler (2 mL, Pharmacia) og blandingen inkuberes ved forsiktig risting ved 4°C i 3 timer. Kulene pelleteres ved sentrifugering (500 x g, 5 minutter), vaskes to ganger med 10 volumer lyseringsbuffer (1% Triton X-100 i PBS), to ganger med 10 volumer 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, to ganger med 10 volumer 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl og to ganger med 10 volumer 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 2,0 mM CaCl₂ (spaltningsbuffer). Alle trinn foretas ved 4°C.

Eksempel 7: Spaltning av fusjonsproteinet og rensing av modent humant IL-1 β

Glutation-agarosekulene med bundet GST-proIL-1 β _{IEGR}-fusjonsprotein inkuberes (6 timer, 23°C) med Faktor Xa (New England Biolabs) i 1 mL spaltningss-
buffer, ved å benytte et protease:substrat-forhold på 1:50 (vektdele) under konstant
5 blanding på et roterende hjul. Dette trinn frigjør det modne humane IL-1 β . Kulene
pelleteres ved sentrifugering ved 500 x g i 5 minutter ved 4°C og vaskes deretter fem
ganger med 2 mL iskald PBS. Supernatanten og alle vaskeporsjonene kombineres,
klarnes ved sentrifugering (14.000 x g, 15 min., 4°C) og konsentreres ved ultra-
filtrering (Centricon-10, Amicon). Alikvoter av proteinet, så vel som kuler før og etter
10 oppslutning, separeres ved 0,1% SDS-12% polyakrylamidgel-elektroforese etterfulgt
av farving med coomassieblått. Et hovedbånd på ca. 17 kD i overensstemmelse med
den forventede masse av modent humant IL-1 β , oppnås fra supernatanten. Det
rensede protein steriliseres gjennom et 0,2 μ filter og oppbevares ved -70°C.

Eksempel 8: Konstruksjon av et plasmid som koder for humant proIL-18 med et caspase-8-spaltningssete

Det rekombinante plasmid pGEX-proIL-18_{IEGR} fra Eksempel 1, ble modifisert ved å skyte inn et PCR-amplifisert DNA-fragment med caspase-8-spaltningssetet (LETD). I korte trekk ble pGEX-proIL-18_{IEGR} oppsluttet med restriksjonsenzymene
20 BamHI ved posisjon 951 og HindIII ved posisjon 1074 under utelatelse av den DNA-
del som inneholder pro-domenet, Faktor Xa-spaltningssetet (IEGR) og tre amino-
syrer fra N-enden av hIL-18.

Det samme plasmid ble benyttet som templat for PCR-amplifikasjonen ved å innføre det muterte setet LETD på nedstrøms-primeren:

25 atgcAAG CTT GCC AAA GTA **GTC GGT TTC CAG** GTT TTC ATC ATC TTC AGC
TAT AA (SEKV. ID. NR:12). PCR-fragmentet ble renset ved å benytte «high pure
product purification» settet (Boehringer, Mannheim) og deretter kuttet tilsvarende
med BamHI og HindIII under utvikling av et 123 bp innskudd. Den åpne vektoren og
innskuddet ble separert på agarosegel og ekstrahert ved å benytte det kommersielle
30 settet «Jet Sorb» (Genomed). Ligerings ble foretatt over natten ved å benytte en T4-
ligase (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) og ligeringsproduktene transformert
inn i E. coli DH5 α kompetente celler. Flere kolonier ble isolert, dyrket i subkultur og
miniprep-preparert med «Qiagen» settet. PCR-amplifikasjon (Perkin Elmer Gene

Amp-AmpliTaq DNA polymerase) ble foretatt på alle minipreps for å sekvensere den essensielle del av det rekombinante plasmid. Endelig transformasjon ble foretatt i kompetente bakterier *E. coli* JM109 ved å følge TSS-metoden (Cuung, C.T. *et al.*, (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 86, 2172-2175).

5

Eksempel 9: Ekspresjon og rensing av GST-proIL-18_{LETD}-fusjonsprotein

Ved å benytte plasmidet konstruert i henhold til Eksempel 8 ovenfor, ble GST-pro-_{LETD}-hIL-18 proteinekspresjon oppnådd i risteflasker og 5 liters fermentorer i det vesentlige som beskrevet i Eksempel 2 ovenfor.

10

Eksempel 10: Spaltning av fusjonsproteinet ved å benytte caspase-8 og rensing av modent humant IL-18

Glutation-agarosekulene med bundet GST-proIL-18_{LETD}-fusjonsprotein ble inkubert (4 timer, 23°C) med caspase-8 (Calbiochem) i spaltningsbuffer (definert i Eksempel 6) ved å benytte protease:substrat-forhold på 1:1200 (vektdele) under konstant blanding på et roterende hjul eller valser. Kulene ble pelletert ved sentrifugering ved 500 x g i 5 minutter ved 4°C og vasket fem ganger med 2 mL iskald PBS. Supernatanten og alle vaskevolumene ble kombinert, klarnet ved sentrifugering (14.000 x g, 15min., 4°C) og konsentrert ved sentrifugering (Centricon-10, Amicon). Den konsentrerte oppslutningen ble deretter underkastet molekylstørrelsesseparering på Superdex-75 (Pharmacia) for å separere hIL-18 (18 kDa) fra spaltningsprodukter med høyere molekylvekt og fra gjenværende proteolytisk enzym (caspase-8 heterodimer, 29 kDa og hetero-tetramerer, 58 kDa).

15

20

Caspase-8 enzymatisk aktivitet i de forskjellige Superdex-75 fraksjonene ble bestemt ved å benytte Caspase-8 Assay Kit og det Ac-IETD-AMC fluorogene substrat (BIOMOL) og ble observert i fraksjoner tilsvarende en molekylmasse på 55 kD (tilsvarende caspase-8 hetero-tetrameren), som således er meget godt separert fra fraksjoner inneholdende hIL-18 (17 kD).

25

De meget rene 18 kDa hIL-18 gelfiltreringsfraksjonene ble slått sammen, konsentrert på en Centricon-10 (Amincon) og tilslutt sterilisert gjennom et 0,22 µm filter og oppbevart ved -80°C.

30

Alikvoter av proteinet, så vel som kulene før og etter oppslutning, ble separert ved 0,1% SDS-12% polyakrylamidgel-elektroforese etterfulgt av farving med

coomassieblått (Fig. 9). Et bånd på 18 kD som stemte overens med den forventede masse av modent humant IL-18, ble observert i supernatantfraksjonen. Analyse av kulefraksjonen viste at spaltningen ikke er fullstendig, siden forløperprotein forblir bundet til kulene. Dessuten forblir noe IL-18 spaltet protein i kulefraksjonen.

5

Eksempel 11: Bioassay av humant IL-18 utviklet ved caspase-8-spaltning

Human IL-18-aktivitet ble bestemt som beskrevet (10). I korte trekk ble KG-1-celler holdt i DMEM inneholdende 10% FBS. For IL-18 bestemmelsen ble KG-1-celler suspendert til $1,2 \times 10^6$ celler/mL (250 μ L/brønn, 48 brønnsplate) og stimulert med mTNF α (Innogenetics) sammen med forskjellige konsentrasjoner av hIL-18 (rekkefortynninger med start fra 80 ng/mL). Platen ble inkubert i 24 timer ved 37°C i 5% CO₂. Etter inkubering ble supernatanter samlet og innholdet av murint IFN- γ ble bestemt ved ELISA (rec. hIFN- γ og anti-hIFN- γ fra R&D Systems).

Humant IL-18 induserte en dose-avhengig produksjon av IFN- γ med aktivitet identisk med den for hIL-18 oppnådd fra Faktor Xa-spaltningssete-konstruksjonen.

20

25

30

P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåte for fremstilling av et biologisk aktivt cytokin fra dets biologiske inaktive forløper, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den omfatter mutering av dets naturlige spaltningssete til et sete som kan spaltes av en protease, og spaltning av den muterte inaktive forløperen for å gi et biologisk aktivt cytokin, hvor cytokinet er valgt fra IL-1 β og IL-18 hvor det naturlige spaltningssete er et caspase-1 spaltningssete.
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t proteasen er valgt fra trombin, enterokinase, subtilisin, human rhinovirus 3C protease, Faktor Xa protease og en caspase, fortrinnsvis caspase-8.
3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den omfatter transfektering av en vert med en vektor omfattende et cDNA kodende for forløperen av det biologiske aktive cytokinet mutert ved dets spaltningssete, dyrking av den transfekterte verten og isolering av det biologiske aktive cytokinet til behandling med en protease.
4. Fremgangsmåte ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d a t cDNA fusjoneres i ramme til en GST kodende sekvens og det uttrykte fusjonsmolekylet oppfanges på glutation agarosekuler før behandling med proteasen.
5. cDNA, k a r a k t e r i s e r t v e d a t det koder for en mutert forløper av et biologisk aktivt cytokin, eventuelt fusjonert til en GST kodende sekvens hvor cytokinet er valgt fra IL-1 β og IL-18 og hvor det naturlige caspase-1 spaltningssetet av den biologiske inaktive forløperen er blitt mutert til et protease spaltningssete.

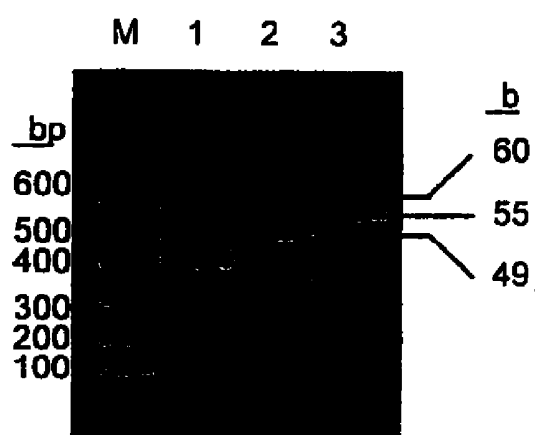


Fig. 1

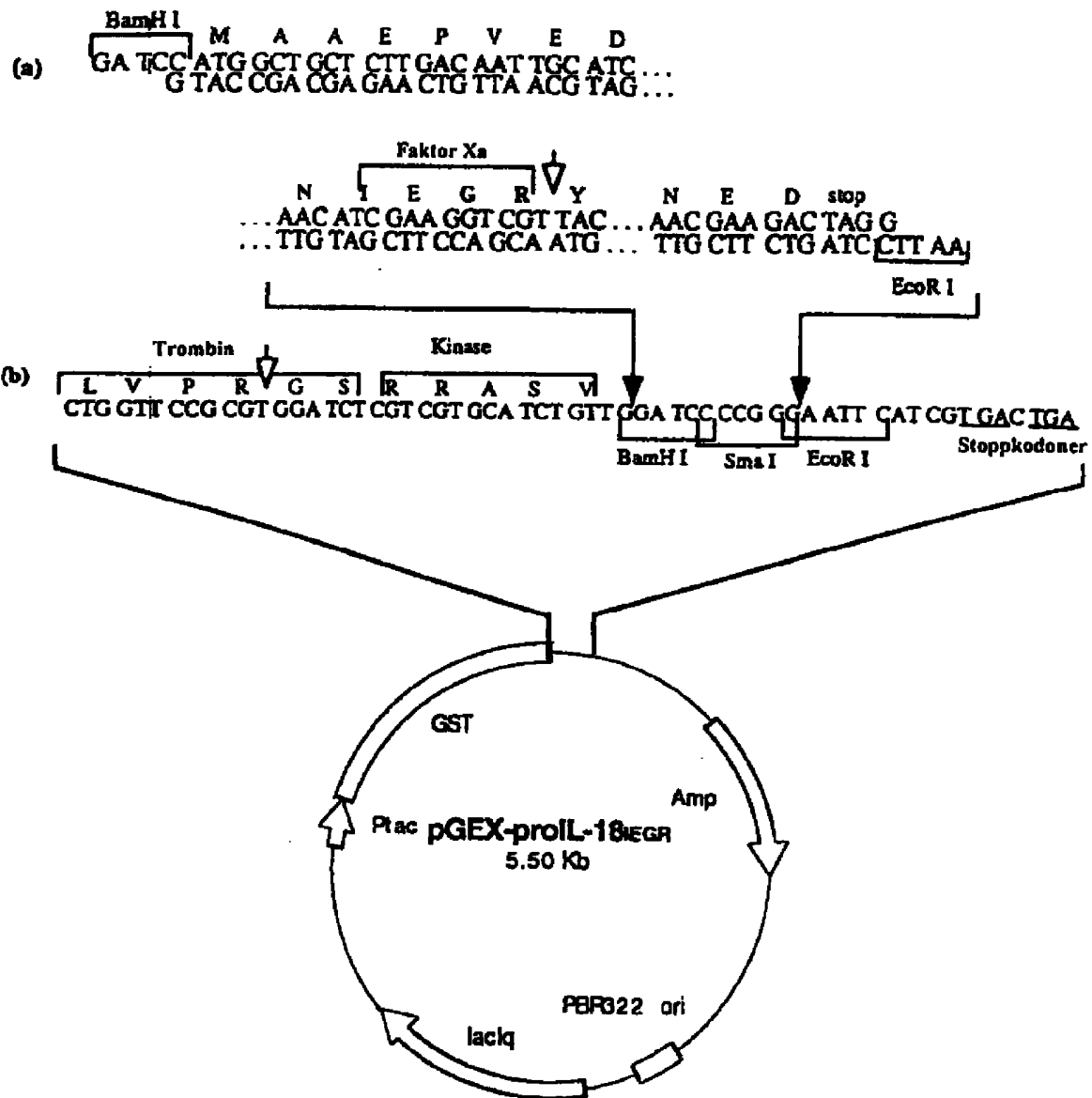


Fig. 2

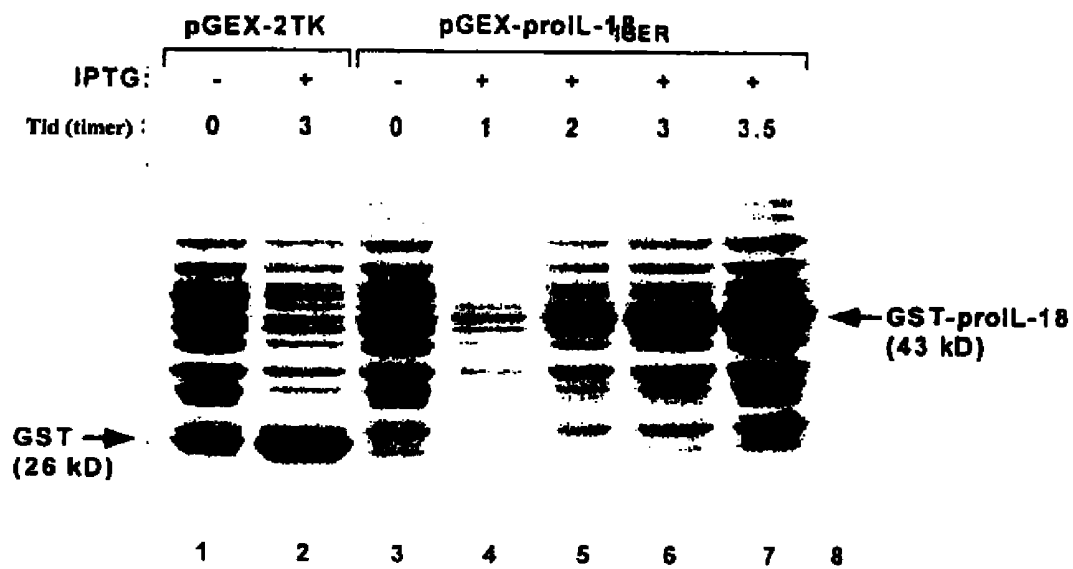


Fig. 3

4/10

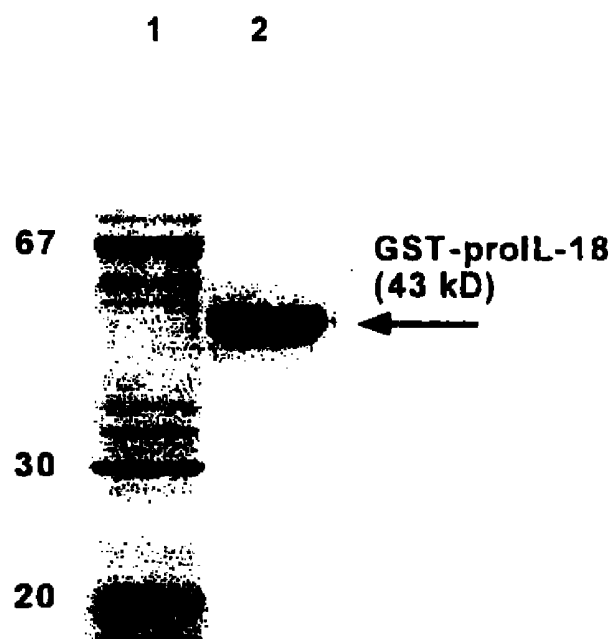


Fig. 4

5/10

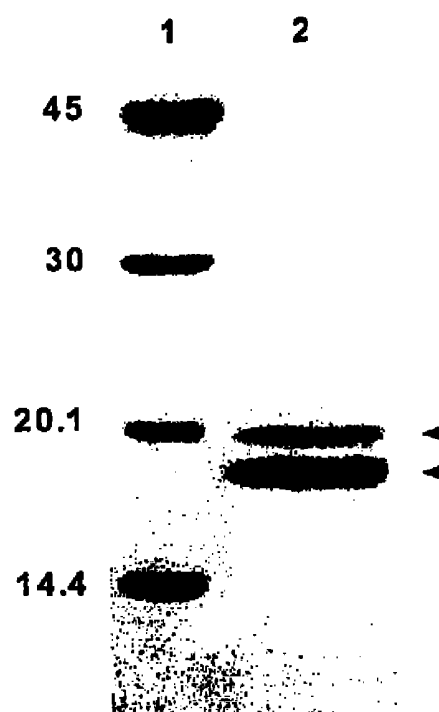


Fig. 5

6/10

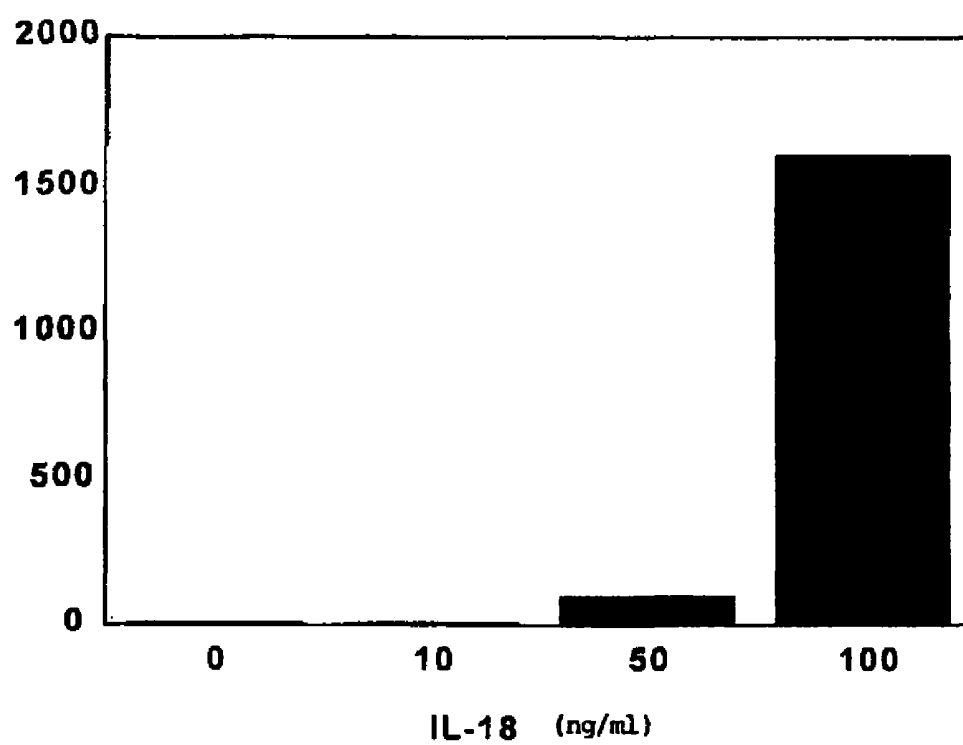


Fig. 6

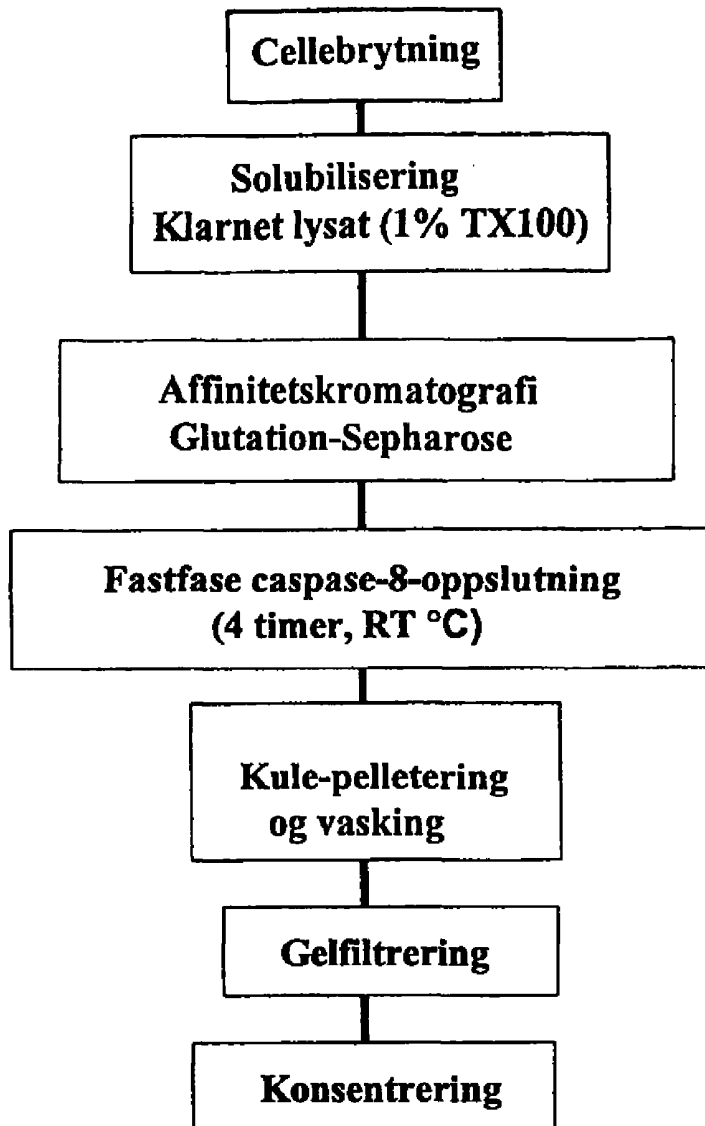


Fig. 7

GST-Pro-LETD-hIL-18

```

ATGGGTGCTGAACCAGTAGAAGACAATTGCATCAACTTTGTGGCAATGAAATTTATTGAC
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TACQGACGACTTGGTCATCTTCTGTTAACGTAGTTGAAACACCGTTACTTTAATAACTG

a  M A A E P V E D N C I N F V A M K F I D -
   AATACGCTTTACTTTATAGCTGAAGATGATGAAAACCTGGAAACCGACTACTTTGGCAAG
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
TTATGCGAAATGAAATATCGACTTCTACTACTTTTGGACCTTTGGCTGATGAAACCGTTC

a  N T L Y F I A E D D E N L E T D Y F G K -
   CTTGAATCTAAATTATCAGTCATAAGAAATTTGAATGACCAAGTTCTCTTCATTGACCAA
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
GAACTTAGATTTAATAGTCAGTATTCTTTAACTTACTGGTTCAAGAGAAGTAACTGGTT

a  L E S K L S V I R N L N D Q V L F I D Q -
   GGAAATCGGCCTCTATTTGAAGATATGACTGATTCTGACTGTAGAGATAATGCACCCCGG
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
CCTTTAGCCGGAGATAAACTTCTATACTGACTAAGACTGACATCTCTATTACGTGGGGCC

a  G N R P L F E D M T D S D C R D N A P R -
   ACCATATTTATTATAAGTATGTATAAAGATAGCCAGCCTAGAGGTATGGCTGTAACATC
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
TGGTATAAATAATATTACATATTTCTATCGGTGCGATCTCCATACCGACATTGATAG

a  T I F I I S M Y K D S Q P R G M A V T I -

```

Fig. 8 (a)

```

TCTGTGAAGTGTGAGAAAATTTCAACTCTCTCCTGTGAGAACAAAATTATTTCTTTAAG
301 -----+-----+-----+-----+-----+ 360
AGAGACTTCACACTCTTTTAAAGTTGAGAGAGGACACTCTTGTTTTAATAAGGAAATTC

a  S V K C E K I S T L S C E N K I I S F K -

GAAATGAATCCTCCTGATAACATCAAGGATACAAAAGTGACATCATATTCTTTTCAGAGA
361 -----+-----+-----+-----+-----+ 420
CTTTACTTAGGAGGACTATTGTAGTTCCTATGTTTTTCACTGTAGTATAAGAAAGTCTCT

a  E M N P P D N I K D T K S D I I F F Q R -

AGTGTCCCAGGACATGATAATAAGATGCAATTTGAATCTTCATCATACGAAGGATACTTT
421 -----+-----+-----+-----+-----+ 480
TCAGAGGGTCCTGTACTATTATTCTACGTTAAACTTAGAAGTAGTATGCTTCCTATGAAA

a  S V P G H D N K M Q F E S S S Y E C Y F -

CTAGCTTGTGAAAAAGAGAGAGACCTTTTTAAACTCATTITGAAAAAGAGGATGAATTG
481 -----+-----+-----+-----+-----+ 540
GATCGAACACTTTTTCTCTCTCTGGAAAAATTTGAGTAAACTTTTTCTCCTACTTAAC

a  L A C E K E R D L F K L I L K K E D E L -

GGGGTAGATCTATAATGTTCACTGTTCAAACGAAGACTAG
541 -----+-----+-----+-----+ 582
CCCCATCTAGATATTACAAGTGACAAGTTTTGCTTCTGATC

a  G D R S I M F T V Q N E D * -

```

Fig. 8 (b)

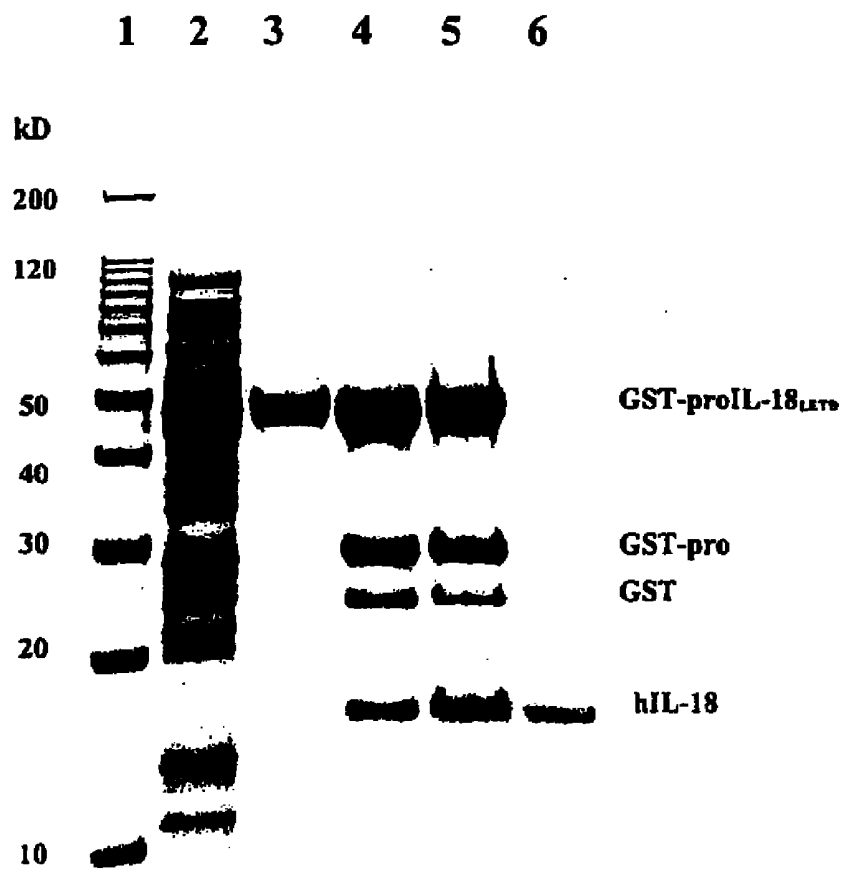


Fig. 9