



(12) PATENT

(19) NO

(11) 330682

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

*C12P 21/06 (2006.01)*

*C07K 14/54 (2006.01)*

*C12N 9/64 (2006.01)*

*C12N 15/63 (2006.01)*

*C12P 21/00 (2006.01)*

## Patentstyret

---

(21)	Søknadsnr	20026002	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2001.06.11 PCT/US2001/18804
(22)	Inng.dag	2002.12.13	(85)	Videreføringsdag	2002.12.13
(24)	Løpedag	2001.06.11	(30)	Prioritet	2000.06.15, US, 211832 2000.08.10, US, 224128 2001.01.20, US, 264923
(41)	Alm.tilgj	2003.02.12			
(45)	Meddelt	2011.06.06			
(73)	Innehaver	SmithKline Beecham Corp, P O Box 7929, US-PA19101 PHILADELPHIA, USA			
(72)	Oppfinner	Allan Richard Shatzman, 709 Swedeland Road, King of Prussia, PA 19406-0939, USA Yen Sen Ho, 362 Old State Road, Berwyn, PA 19312, USA Kyung O Johanson, 709 Swedeland Road, King of Prussia, PA 19406-0939, USA Robert B Kirkpatrick, 709 Swedeland Road, King of Prussia, PA 19406-0939, USA Patrick McDevitt, 709 Swedeland Road, King of Prussia, PA 19406-0939, USA			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge			

---

(54)	Benevnelse	<b>Fremgangsmåte for fremstilling av et fysiologisk, aktivt IL-18 polypeptid</b>
(56)	Anførte publikasjoner	FASSY F. et al., 1998. GARCIA-CLAVO et al., 1999., GHAYUR et al., 1997., MUNDAY N.A. et al, 1995., US5985863 A, US6054487 A, USHIO S. et al., 1996., US5914254 A
(57)	Sammendrag	

Fremgangsmåte for fremstilling av et fysiologisk, aktivt polypeptid, som omfatter å bringe et forløperpolypeptid i kontakt med et aktiverende enzym, eller å samtidig uttrykke polypeptidet med en aktiverende protease.

## OPPFINNELSENS BAKGRUNN

Den foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for å fremstille et fysiologisk, aktivt polypeptid, mer spesielt, for å fremstille aktivt, humant IL-18.

5

IL-18, også kjent som interferon- $\gamma$ -induserende faktor, er et nylig oppdaget nytt cytokin. Aktivt IL-18 inneholder 157 aminosyrerester. Det har potente, biologiske aktiviteter, inkludert induksjon av interferon- $\gamma$ -produksjon fra T-celler og splenocytter, økning av den drepende aktivitet til NK-celler og stimulering av differensiering av naive, CD4<sup>+</sup>-T-celler til Th1-celler. I tillegg øker humant IL-18 produksjon av GM-CSF og reduserer  
10 produksjon av IL-10. IL-18 er vist å ha større interferon- $\gamma$ -induserende kapasitet enn IL-12 og signaliserer gjennom en forskjellig reseptor, og utnytter en annen signaltransduksjonsvei.

15 Den kodende nukleotidsekvensen IL-18 og visse fysiokjemiske egenskaper av det rensete protein er kjent (Ushio, S., *et al.*, 1996, *J. Immunolgy*, **156**, 4274-4279; Dinarello, C. A., *et al.*, 1998, *J. Leukocyte Biology*, 1998, **63**, 658-664).

Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kayaku Kenkyujo's ("Hayashibara"), U.S.  
20 5 192 324, som tilsvare EP 0692536, publisert 17. januar 1996, beskriver et museprotein som induserer IFN-gamma produksjon fra immunkompetente celler, der proteinet karakteriseres ytterligere ved å ha visse fysiokjemiske egenskaper og en definert, partiell aminosyresekvens. Det beskrives også et protein med en 157 aminosyrers sekvens, to fragmenter av dette, DNA (471 bp) som koder proteinet,  
25 hybridomer, proteinrensemeter og metoder for påvisning av proteinet.

Hayashibara's U.S. 6 214 584, som tilsvare EP 0712931, publisert 22. mai 1996, beskriver et 157 aminosyrers humant protein og homologer derav, DNA som koder proteinet, transformanter, fremgangsmåter for fremstilling av proteinet, monoklonale  
30 antistoffer mot proteinet, hybridomaer, proteinrensemeter, metoder for påvisning av proteinet, og fremgangsmåter for behandling og/eller forebygging av maligne tumorer, virussykdommer, bakterielle infeksjonssykdommer og immunsykdommer.

Incyte Pharmaceuticals, Inc.'s, WO 97/24441, publisert 10. juli 1997, beskriver et 193  
35 aminosyrers protein tilsvarende IL-18-forløperen og det kodende DNA.

Caspase uttrykt ved i heterologe vertssystem er kjent og beskrevet av Fassy F. et al., 1998 i *European Journal of Biochemistry*, vol 253, nr.1, s.76-83 og av Garcia-Clavo et al., 1999 i *Cell Death and Differentiation*, vol.6, s. 362-369 samt i US6054487 A.

I US 5985863 A beskrives ulike vektorer som uttrykker caspase-4 og pro IL18.

- 5 US5914254 A omfatter ekspresjon av fusjonspolypeptider uten ledersekvens og beskriver spaltning av fusjonspolypeptider *in vivo* via ko-ekspresjon av et protolytisk enzym tilstede i vertscellens cytoplasma

I humane celler kan polypeptider, dannet ved ekspresjon av gener, prosesseres av  
10 intracellulære enzymer og bli delvis spaltet og til å motta sukkerkjeder. Polypeptider som skal inkorporeres på en tilfredsstillende måte i farmasøytiske midler, kan være de som på tilsvarende måte prosesseres som i humane celler. Det er kjent at de fleste cytokiner vanligvis produseres som forløpere uten noen biologisk aktivitet, og deretter prosesseres ved intracellulære enzymer for å konverteres til aktive polypeptider.

15

IL-18-polypeptidet finnes vanligvis i humane celler i form av en forløper på 193 aminosyrer, og uten biologisk aktivitet. IL-18-forløperen er også betegnet Pro-IL-18. En fremgangsmåte for å fremstille aktiv IL-18 fra dens forløper er beskrevet av Hayashibara's U.S. 5 879 942, som tilsvarer EP 0819757, publisert 21. januar 1998.

- 20 Patentet beskriver et enzym eller et protein som konverterer en forløper av IL-18 til aktivt IL-18.

En annen fremgangsmåte for fremstilling av aktivt IL-18 fra dens forløper, beskrives av Hayashibara's U.S. 5 891 663, som tilsvarer EP 0821005, publisert 28. januar 1998.

- 25 Patentet beskriver det å bringe IL-18-forløperen i kontakt med interleukin-1 $\beta$ -konverterende enzym ("ICE").

ICE's rolle som en mediator for apoptose og inflammasjon er grundig studert i litteraturen. Det er også kjent at ICE kan prosessere forløpere for både interleukin-1 og  
30 interleukin-18 til aktive former (Thornberry, NA, et al., 1992, *Nature* 356, 768-774; Ghayur, T, et al., 1997, *Nature* 386, 619-623).

#### OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

Foreliggende oppfinnelse omhandler en fremgangsmåte for fremstilling av aktivt,  
35 humant IL-18 polypeptid fra et humant forløper-IL-18-polypeptid, kjennetegnet ved at den omfatter:

- (i) bicistronisk ko-ekspresjon av caspase-4 eller caspase 5 med den humane

forløper-IL-18 polypeptid ved å bruke en bicistronisk ekspresjonsvektor som  
omfatter en sekvens som koder for den humane forløper-IL-18 etterfulgt av en  
sekvens som koder for caspase 4 eller caspase 5 separert av en intergenisk region  
som inkluderer en defekt shine delgarno sekvens og  
5 (ii) rensing av det aktive polypeptidet.

#### KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE

10 Figur 1 viser aminosyresekvensen til human forløper IL-18 (SEQ ID NO: 1).

Figur 2 viser nukleinsyresekvensen som koder for fullengde humant IL-18 (SEQ ID  
NO: 2).

Figur 3 viser aminosyresekvensen til aktiv humant IL-18 (SEQ ID NO: 3).

15

Figur 4 viser aminosyresekvensen til den 6-his-merkete N-terminalt avkortete caspase-4  
(SEQ ID NO: 4).

20 Figur 5 viser nukleinsyresekvensen som koder for aminosyresekvensen til den 6-his  
merkete N-terminalt avkortete caspase-4 (SEQ ID NO: 5).

Figur 6 viser aminosyresekvensen til den 6-his-merkete N-terminalt avkortete caspase-5  
(SEQ ID NO: 6).

25 Figur 7 viser nukleinsyresekvensen som koder for aminosyresekvensen til den 6-his  
merkete N-terminalt avkortete caspase-5 (SEQ ID NO: 7).

30 Figur 8 viser et skjematisk diagram av en bisistronisk ekspresjonskassetten inneholdt i  
pET28-ProIL-18/Caspase 4 for samtidig ekspresjon av Pro-IL-18 og avkortet caspase-4  
i *E. coli*.

Figur 9 viser en sekvens Pro-IL-18/Caspase-4-ekspresjonskassetten i pET28 (SEQ ID NO:  
8).

35 Figur 10 viser sekvensen til Pro-IL-18/Caspase-4-ekspresjonskassetten. Nummereringen  
tilsvarende posisjonen i pET28a-vektoren.

Figur 11 viser Pro-IL18/Caspase-4-induksjon.

Figur 12 er et skjematisk diagram av bisitronisk ekspresjonskassetten inneholdt i pET28-Pro-IL18/avkortet caspase-5 for samtidig ekspresjon av Pro-IL-18 og caspase-5 i *E.*

5 *coli*.

Figur 13 viser en sekvens av Pro-IL-18/Caspase-5-ekspresjonskassetten i pET28 (SEQ ID NO: 9).

10 Figur 14 viser sekvensdiagrammet til Pro-IL-18-avkortet caspase-5-ekspresjonskassetten, der regulatoriske sekvenstrekk og translasjon av Pro-IL-18 og avkortet caspase-5 er markert. Nummereringen tilsvarer posisjonen i pET28a-vektoren.

Figur 15 viser Pro-IL-18/Caspase-5-induksjon.

15

Figur 16 viser aminosyresekvensen til Ub-IL-18 (SEQ ID NO: 10).

Figur 17 viser nukleinsyresekvensen som koder for aminosyresekvensen til Ub-IL-18 (SEQ ID NO: 11).

20

Figur 18 viser nukleinsyresekvensen til UB-IL-18/Ubp-1-ekspresjonskassetten i pET28-vektoren (SEQ ID NO: 12).

Figur 19 viser sekvensen til Ub-IL-18/Ubp-1 i pET28-vektoren. Nummereringen

25 tilsvarer posisjonen i pET28.

Figur 20 viser Ub-IL-18-ekspresjon og prosessering av Ubp-1.

Figur 21 viser IL-18-aktivitetsanalyse ved anvendelse av KG-1 (human

30 myelomonocytisk cellelinje)-celler og overvåking av IFN- $\gamma$ -produksjon (IL-18 uttrykt på ulike måter som antydnet).

Figur 22 viser IL-18 aktivitetsanalyse ved anvendelse av rensset, humant PBMC for overvåking av IFN- $\gamma$ -produksjon (IL-18 uttrykt på ulike måter, som antydnet).

35

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Caspase-4 og caspase-5 er medlemmer av en familie av cysteinproteaser som inkluderer Interleukin-1 $\beta$ -konverterende enzym (ICE), som fortrinnsvis spalter substrater inneholdende et proteaseaktiverende motiv, omfattende aminosyresekvensen XEYD, der X er valgt fra en gruppe aminosyrer bestående av W, L, F, Y, I, V, D eller E; E er  
 5 glutaminsyre, Y er valgt fra en gruppe aminosyrer bestående av H, I, A, T, S, P eller E; og D er asparbinsyre (Munday, N. A., et al., 1995, J. Biol. Chemistry, **270**, 15870-15876; Talanian, R. V., et al., 1997, J. Biol. Chemistry, **272**, 9677-82; Thornberry, N. A., et al., 1997, J. Biol. Chemistry **272**, 17907-11). Substratgjenkjennelsen av caspase-5 antas å være hovedsakelig den samme for ICE og caspase-4 og forskjellig fra andre  
 10 medlemmer av caspase (Talanian, R. V., et al., 1997, J. Biol. Chemistry, **272**, 9677-82; Thornberry, N. A., et al., 1997, J. Biol. Chemistry **272**, 17907-11). Caspase-4 er beskrevet i EP-B-0 754 234. Caspase-5 er beskrevet i U.S. 5 552 536 og U.S. 5 760 180.

Ubiquitinspesifikke proteaser er en familie av ATP-avhengige enzymer som kan  
 15 anvendes og som nøyaktig kan spalte det evolusjonsmessig konserverte 76 aminosyrers ubiquitinpeptid fra den N-terminale ende av proteinet som er fusert til dette. Disse proteasene spalter spesifikt peptider bundet mellom den karboksylterminale aminosyrerest av et ubiquitinprotein og  $\alpha$ -aminogruppen fra et hvilket som helst ikke-ubiquitinprotein som ubiquitin er tilknyttet. Ubiquitinspesifikke proteaser fra  
 20 *Saccharomyces cerevisiae*, for eksempel Ubp-1, Ubp-2 og Ubp-3 er kjent og kan uttrykkes rekombinant og katalysere deubiquitineringsreaksjoner som målsøker ubiquitin fusjonsproteiner, både *in vivo* og *in vitro* (Baker, R. T., et al., 1992, J. Biol. Chem. **267**: 23364-23375; Baker R. T., et al., 1994, J. Biol. Chem. **269**:25381-25386). Spesifisiteten til *Saccharomyces cerevisiae* ubiquitinspesifikke proteaser muliggjør  
 25 nøyaktig fjerning av ubiquitin fra et hvilket som helst peptid med unntak av de som starter med prolin. Ubiquitinspesifikk protease fra andre arter, slik som muse Unp og dens humane homolog Ubph, er i stand til effektivt å spalte, selv foran prolin (Gilchrist C. A., et al., 1997, J. Biol. Chem., **272**: 32280-32285). Følgelig kan praktisk talt en hvilken som helst ønsket N-terminal ende dannes gjennom fjerning av et presist  
 30 fusjonert ubiquitinprotein når det kombineres *in vitro* eller uttrykkes samtidig med ubiquitinspesifikke proteaser. Ubiquitinspesifikke proteaser er beskrevet i U.S. 5 212 058; U.S. 5 683 904; U.S. 5 391 490; og U.S. 5 494 818.

En hvilken som helst naturlig eller syntetisk fremstilt caspase-4 eller caspase-5 kan  
 35 anvendes ifølge foreliggende oppfinnelse, så lenge de frembringer aktive polypeptider som induserer IFN- $\gamma$ -produksjon i immunkompetente celler uavhengig av deres strukturer, kilder og opprinnelse.

I human celler kan polypeptider dannet ved ekspresjon av gener prosesseres ved intracellulære enzymer. Intracellulære enzymer spalter forløpreproteiner, slik som Pro-IL-18, til deres aktive form. Polypeptider som skal inkorporeres tilfredsstillende i farmasøytiske midler, bør motta prosessering tilsvarende den prosessering polypeptider mottar i humane celler. Polypeptidene finnes vanligvis i humane celler i form av en forløper og uten biologisk aktivitet. Det er kjent at de fleste cytokiner, inkludert IL-18-polypeptidet, vanligvis produseres som forløpere uten biologisk aktivitet, og så prosesseres av intracellulære enzymer og konverteres til aktive polypeptider.

10

Forløperen til IL-18 som nevnt i foreliggende oppfinnelse, eksisterer for eksempel i celler som i seg selv fremstiller polypeptidet, i pattedyrvertsceller og i et bakteriesystem, slik som *E. coli*, transformert ved introduksjon av et DNA, for eksempel et DNA med nukleotidsekvensen ifølge SEQ ID NO: 2, inneholdende et område som koder for polypeptidet. Ved anvendelse av slike pattedyr- og bakterievertsceller kan forløper-IL-18 uttrykkes samtidig med proteaser for generering av aktive IL-18.

15

### ***In vitro*-spalting**

Foreliggende oppfinnelse frembringer fremgangsmåter for *in vitro*-aktivering av et forløperpolypeptid, slik som forløperen til IL-18, som omfatter å bringe forløperpolypeptidet i kontakt med et aktiverende enzym.

20

I en foretrukket utførelsesform frembringer den foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for *in vitro*-aktivering av forløperen for humant IL-18, som omfatter å bringe forløperen for humant IL-18 i kontakt med caspase-4 eller caspase-5.

25

Forløperen for IL-18 kan aktiveres *in vitro* ved spalting med det aktiverende enzym som gjenkjenner et spesifikt proteaseaktiverende motiv, som omfatter aminosyresekvensen XEYD, der *X* er valgt fra en gruppe aminosyrer bestående av W, L, F, Y, I, V, D eller E; og *Y* er valgt fra en gruppe aminosyrer bestående av H, I, A, T, S, P eller E.

30

Forløperen for IL-18 *in vitro* kan aktiveres ved spalting av peptidbindingen mellom asparginsyre 36 og tyrosin 37 i SEQ ID NO: 1 med caspase-4 eller caspase-5 for å fremstille et aktivt polypeptid som induserer IFN- $\gamma$ -produksjon i immunkompetente celler.

35

Vanligvis kan caspase-4 eller caspase-5 oppnås fra celler som i seg selv produserer dette, og transformanter oppnådd ved anvendelse av rekombinant DNA-teknologi. Eksempler på slike celler er de som ble etablert fra pattedyr- eller humane celler, slik som epitelceller, endotelceller, interstitielle celler, bruskceller, monocytter, 5 granulocytter, lymfocytter og etablerte cellelinjer fra disse. Eksempler på transformanter inkluderer transformerte mikroorganismer og dyreceller oppnådd ved introduksjon av et DNA som koder for caspase-5 til mikroorganismene og pattedyrcellene. Caspase-4 eller caspase-5 fremstilles ved å dyrke disse transformantene i konvensjonelle dyrkingsmedier anvendt innen området, enten ultralydbehandle dem som intakte 10 kulturer eller etter atskillelse fra kulturen eller nedsenke transformantene i hypotoniske løsningsmidler, og anvende på de resulterende cellerester eller blandinger inneholdende kultursupernatanter og cellerester, de følgende konvensjonelle teknikker anvendt for rensing av enzymer innenfor dette området; utsalting, dialyse, filtrering, konsentrering, separeringssedimentering, ionebytterkromatografi, gelfiltreringskromatografi, 15 adsorpsjonskromatografi, isoelektrisk kromatografi, hydrofob kromatografi, reversfase kromatografi, affinitetskromatografi, gelelektroforese og elektrofokusering. To eller flere av disse rensemetodene kan anvendes i kombinasjon. DNA som koder for caspase-4 (fig. 5) (SEQ ID NO: 5) og caspase-5 (fig. 7) (SEQ ID NO: 7) og transformantene som produserer caspase-4 og caspase-5, er kjent innen teknikken. 20 Enzymene kan for eksempel fremstilles i aktiv form i *E. coli* ved ekspresjon av N-terminalt avkortete peptider som mangler Pro-regionen, som beskrevet (Munday N. A., et al., 1996, J. Biol. Chem. **26**, 15870-76).

Celler som fremstiller forløperpolypeptider, slik som Pro-IL-18, innebygget i seg selv 25 eller de som ble transformert for å fremstille forløperen, dyrkes i næringsmedia. Foretrukne kulturmedia inkluderer kulturmedia velkjente innen teknikken, slik som Luria-Bertani-mediet eller andre rike medier for dyrking av *E. coli*, omfattende trypton og gjærekstrakt.

30 Caspase-4 eller caspase-5 som er oppnådd ved anvendelse av den overnevnte fremgangsmåte, tillates å eksistere samtidig i de resulterende kulturer eller tilsettes de resulterende blandinger eller cellerester etter ødeleggelse av de prolifererte celler som er separert eller useparert fra kulturene. Mengden av caspase-4 eller caspase-5 som er nødvendig er mindre enn det som er ekvimolart med forløperen. Caspase-4 eller 35 caspase-5 bringes i kontakt med forløperen ved temperaturer og pH som tillater caspase-4 eller caspase-5 å virke på forløperen, vanligvis tillates caspase-4 eller caspase-5 å reagere med forløperen inntil den ønskete mengde av aktivt polypeptid dannes fra

forløpermaterialet ved temperaturer på ca. 4 °C til 40 °C og pH rundt 6 til 9. Foretrukket temperatur er ca. 25 °C og foretrukket pH er ca. 7,2. Reaksjonsblandingene inneholdende det aktive polypeptid kan således oppnås.

- 5 Aktiviteten til caspase-4 eller caspase-5 kan analyseres og uttrykkes ved enheter for aktivitet ifølge µg prosessert polypeptid pr. µg caspase-4 eller caspase-5 pr. minutt.

#### *Ko-ekspressjon in vivo*

- 10 Fremgangsmåter for *in vivo* aktivering av et forløperpeptid, slik som en forløper for IL-18, omfattende ko-ekspressjon av proteinet med en aktiverende protease kan anvendes. Det gjelder også fremgangsmåter for *in vivo* aktivering av IL-18, omfattende den bisistroniske ko-ekspressjon av polypeptider, slik som IL-18 med proteaser, slik som caspase-4, også kjent som ICE<sub>RELII</sub>, caspase-5, også kjent som ICE<sub>RELI</sub>, og ubiquitin.

15

Humant caspase-4 kan uttrykkes, og er også kjent som ICE<sub>RELII</sub>, bisistronisk samtidig med humant Pro-IL-18 for å tillate *in vivo* prosessering av Pro-IL-18 til aktivt IL-18.

- Også avkortet humant caspase-4 (SEQ ID NO: 4) bisistronisk kan uttrykkes samtidig med humant Pro-IL-18 for å tillate *in vivo* prosessering av Pro-IL-18 (SEQ ID NO: 1) til aktivt IL-18 (SEQ ID NO: 3).

- Det er også mulig å uttrykkes humant caspase-5, også kjent som ICE<sub>RELI</sub>, bisistronisk samtidig med humant Pro-IL-18 for å tillate *in vivo* prosessering av Pro-IL-18 til aktivt IL-18 (SEQ ID NO: 3).

Det samme gjelder ubiquitin protease-1 (Ubp-1) bisistronisk samtidig med ubiquitin-IL-18 (Ubp-IL-18) for *in vivo* prosessering av Ub-IL-18 til aktivt IL-18.

- 30 Ubiquitin protease-1 (Ubp-1) kan uttrykkes bisistronisk samtidig med ubiquitin-IL-18 (Ubp-IL-18) for *in vivo* prosessering av Ub-IL-18 (SEQ ID NO: 9) til aktivt IL-18 (SEQ ID NO: 3).

- Videre er det mulig å uttrykke avkortet humant caspase-5 (SEQ ID NO: 5) bisistronisk samtidig med humant Pro-IL-18 for å tillate *in vivo* prosessering av Pro-IL-18 (SEQ ID NO: 1) til aktivt IL-18 (SEQ ID NO: 3).

35

Et DNA som koder for caspase-4 eller caspase-5 og et DNA som koder for en forløper for polypeptidet, introduseres begge i en passende bakterie- eller pattedyrvertscelle for transformering av denne. I dette tilfellet virker caspase-4 eller caspase-5, som er dannet ved DNA-ekspresjonen på en forløper av polypeptidet og ved DNA-ekspresjonen i den samme transformant, for å danne et aktivt polypeptid (figurene 11 og 15). Mulige vertyceller er epidermale-, intestinale-, neuroblast- og hematopoetiske cellelinjer, avledet fra mennesker, aper, mus og hamstere og anvendes konvensjonelt som verter, slik som 3T3-celler inkludert 3T3-swiss albino celler (ATCC CCL 92), C1271-celler (ATCC CRL 1616), CHO-celler inkludert CHO-K1-celler (ATCC CCL 61), CV-1-celler (ATCC CCL 70), COS-celler inkludert COS-1-celler (ATCC CCL 1650), HeLa-celler (ATCC CCL 2), MOP-celler inkludert MOP-8-celler (ATCC CRL 1709) og mutanter derav. *E. coli* kan benyttes som vertyscelle. En fremgangsmåte for introduksjon av DNA som koder for caspase-4 eller caspase-5, og DNA som koder for en forløper for polypeptidet til *E. coli* kan være kjemisk transformering med rubidiumklorid, som er velkjent innen teknikken. Fremgangsmåter for introduksjon av et DNA som koder for caspase-4 eller caspase-5 og et DNA som koder for en polypeptidforløper til pattedyrvertsceller, inkluderer konvensjonell DEAE-dekstranmetoden, fosforsyre-kalsiummetoden, elektroporering, lipofeksjon, mikroinjeksjon og virusinfeksjonsmetoden ved anvendelse av retrovirus, adenovirus, herpesvirus og vacciniavirus. I dette tilfellet kan vektorer, slik som pCD, pCDL-SR $\alpha$ , pKY4, pCDM8, pCEV4, pME18S og pSV2-gpt, inkludert passende promotere, enhancere, replikasjons-startpunkt, termineringsseter, spleisesekvenser, polyadenyleringssekvenser og/eller seleksjonsmarkører anvendes ifølge standard teknikker beskrevet i Ausubel F. M., et al., 1994, Current Protocols in Molecular Biology, New York: Greene Publishing Ass. and Wiley Interscience. Kloner som ved immunologisk påvisning ble observert å produsere et aktivert polypeptid, ble utvalgt ved å velge den ønskete klon fra transformantene etter dyrking i næringsmedium. Kulturer inneholdende det aktive polypeptid kan oppnås ved dyrking av den klonete transformant med anvendte, konvensjonelle næringsmedier innen området. Som for celler som naturlig produserer en forløper for polypeptidet og andre celler som ble transformert til å produsere polypeptidet, kan de produsere forløperen samtidig med aktiveringsenzymene, som aktiverer polypeptidet, slik som caspase-4, caspase-5 og ubiquitin. Rekombinante DNA-teknologier som anvender pattedyrvertsceller er beskrevet i detalj i Glutzman, Cell, 23:175 (1981) Mulligan, PNAS 78:2072 (1981). Rekombinant DNA-teknologi som anvender bakterievertsceller er beskrevet i Protein Expression: A Practical Approach, S. J. Higgins og B. D. Hames, red. 1999, New York, Oxford University Press.

Samtidig som de resulterende reaksjonsblandinger og kulturer inneholdende et aktivt IL-18-polyeptid kan anvendes inntakt som en IFN- $\gamma$ -induser, kan cellene i kulturene ødelegges ved ultralyd, cellelyse-enzymmer og/eller surfaktanter, etterfulgt av separering  
 5 av polypeptidet fra de resulterende celler og cellerester ved filtrering, sentrifugering etc., ifølge standard industrielle prosedyrer beskrevet i Protein Purification: Principles and Practice, Cantor, C. R., red., 1993, New York, Springer-Verlag. Polypeptidet, fritt for celler og cellerester kan renses ved konvensjonelle rensemetoder anvendt for å rens biologisk aktive substanser innenfor dette området, for eksempel utsalting, dialyse,  
 10 filtrering, konsentrering, separatorisk sedimentering, ionebytterkromatografi, gelfiltreringskromatografi, adsorpsjonskromatografi, isoelektrisk kromatografi, hydrofob kromatografi, reversfase kromatografi, affinitetskromatografi, gelelektroforese og elektrofokusering. Om nødvendig kan to eller flere av disse rens fremgangsmåtene anvendes i kombinasjon. Det resulterende, rensede polypeptid kan konsentreres og  
 15 lyofiliseres til en væske eller et fast stoff for å imøtekomme deres endelige anvendelse.

Bisstroniske ekspresjonskassetter er allsidige vektorer som kan anvendes for *in vivo* prosessering av faktisk et hvilket som helst peptid inneholdende den passende caspase-4/caspase-5 eller ubiquitinase spaltingsgjennkjennelsessettene, som tidligere er blitt  
 20 beskrevet (Tobias, J. W. et al., *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(18): s. 12021-12028; Talanian, R. V. et al., *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(15): s. 9677-9682). Bisstronisk ekspresjon medfører fordeler i forhold til andre ko-ekspresjonsstrategier fordi begge gener er tilføyet den samme transkripsjonsenhet, som sikrer konsistent ekspresjon av begge gener over tid. Dette er i motsetning til doble  
 25 plasmidsystemer der ett plasmid kan forsvinne over tid, eller enkelt plasmid - doble promotersystemer der ekspresjon kan variere fra hver promoter fra ett eksperiment til det neste. I særdeleshet er de bisstroniske ekspresjonssystemer beskrevet heri ideelt egnet for *in vivo* aktivering av enzymer, cytokiner, vekstfaktorer og andre proteolytisk  
 30 aktiverbare proteiner, og muliggjør dermed storskalaproduksjon av slike proteiner fra celler i et enkelt trinn og eliminerer behovet for et separat *in vitro* aktiveringstrinn.

Aktiverende proteaser, caspase-4 (Ala105 til Asn377) eller caspase-5 (Ile146 til Asn418), ble subklonet som N-terminale 6-His-fusjoner umiddelbart etterfølgende Pro-IL-18-sekvensen for å danne en transkripsjonell fusjon av de to gener. En T7-  
 35 terminatorsekvens er lokalisert nedstrøms for caspase 4-sekvensen for translasjonsterminering av den bisstroniske transkripsjonsenhet. Et lite intergenområde som inkluderer en defekt Shine-Dalgarno-sekvens ble også tilføyet for å tillate kun

minimal translasjonsinitiering fra caspase-4-sekvensen (figurene 10 og 14). Andre regulatoriske områder inkluderer en 25-basepar-lac-operatorsekvens lokalisert umiddelbart nedstrøms for den 17-basepar-promoterregion som er bundet av lac-repressor, kodet av en kopi av *lac-I*-genet lokalisert på plasmider, dermed undertrykkes basal transkripsjon i fravær av T7-RNA-polymerase. De resulterende plasmider betegnet ProIL18/Casp4 og ProIL18/Casp5 ble deretter hver for seg transfektert til *E. coli* BL21 (DE3)-stammen som inneholder en induserbar kromosomal kopi av T7-polymerasegenet.

Transkripsjonen av den bisstroniske kassett er under styring av T7-promoterer, som kontrolleres av fag T7-RNA-polymeraseproteiner, som kodes av en lysogen kopi av T7-RNA-polymerasegenet. Denne kromosomale kopi av T7-polymerase er selv under kontroll av lacUV5-promoterer, induserbar ved tilsetning av isopropyl-1-tio-b-D-galactopyranosid. Induksjonen fører til sideordnet transkripsjon og translasjon av Pro-IL-18 og His-caspase-4 eller His-caspase-5. Begynnende translatert caspase-4 eller caspase-5 autoproseseres til en aktiv forbindelse, som initierer den proteolytiske aktivering av Pro-IL-18. Både den translaterede forløper-IL-18, så vel som det post-translasjonelt aktiverte IL-18, er hovedsakelig løselig inni *E. coli*. Modent, aktivt IL-18 inneholdende en N-terminal tyrosin renses direkte fra bakteriecellelysater etter induksjon ved konvensjonelle kromatografimetoder. Spalting til modent IL-18 med caspase-4 fullføres etter 4 timer ved 37 °C eller etter 18 timer ved 29 °C (figur 11) og spalting til modent IL-18 med caspase-5 fullføres ved 18 timer ved 29 °C (figur 15).

En avkortet caspase-4, som vist i figur 4 (SEQ ID NO: 4 og SEQ ID NO: 5), eller avkortet caspase-5 som vist i figur 5 (SEQ ID NO: 6 og SEQ ID NO: 7) kan anvendes. Avkortning av caspase-4 og caspase-5 er beskrevet i Munday, N. A., *et al.*, 1995, *J. Biol. Chemistry*, **270**, 15870-15876.

Fremgangsmåte for dannelse av et aktivt polypeptid ved ko-ekspressjon av en ubiquitinspesifikk protease med en N-terminal ubiquitin-IL-18-fusjon (forløper) som konverteres til aktivt IL-18 ved den ubiquitin C-terminale hydrolaseaktivitet kan benyttes. Et 76-aminosyrer-ubiquitinprotein inneholdende en autentisk N-terminal tyrosin, fusjoneres til den modne N-terminale ende av humant IL-18 og uttrykkes samtidig med en ubiquitinspesifikk protease i *E. coli*, for eksempel som vist i SEQ ID NO: 10 og SEQ ID NO: 11. Ubiquitin er et svært konservert 76-resters protein funnet i eukaryote celler som fungerer ved markering av proteinene for degradering (Baker, R. T., *Current Opinion in Biotechnology*, 1996. 7(5): s. 541-546). Ubiquitin spaltes

spesifikt fra proteiner ved aktivering av ubiquitinspesifikke proteaser som uttrykkes endogent i eukaryote celler, men som er fraværende i bakterier. Ko-ekspressjonen av ubiquitin fuserte proteiner med ubiquitinspesifikke proteaser i *E. coli* fører også til en effektiv fjerning av ubiquitin (Baker, R. T. et al., *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(32): s. 23364-75) (figur 20). I tillegg er de fleste av disse deubiquitinerte enzymer i stand til å spalte foran hovedsakelig en hvilken som helst aminosyre med unntak av prolin. Følgelig er spalting av ubiquitin fra modent IL-18 mulig til tross for tilstedeværelse av den store aromatiske tyrosinresten i P1'-posisjonen.

Ko-ekspressjonen av ubiquitin-IL-18 (Ub-IL-18) og Ubiquitin-protease-1 (Ubp-1) (Tobias, J. W. et al., *Journal of Biological Chemistry*, 1991. 266(18): s. 12021-12028) oppnås gjennom den bisstroniske ekspressjon av de to gener under induserbar T7-promoterkontroll. Modent IL-18 uttrykkes som en N-terminal fusjon med den evolusjonsmessige konserverte 76-aminosyrers ubiquitinpeptid. Ub-IL-18-cDNA subklones under kontroll av T7-RNA-polymerasepromoteren i pET28a-vektoren. Deretter subklones cDNA som koder for fullengde ubiquitinspesifikke protease nedstrøms foran t/-terminatorsekvensen (figur 19). Både cDNA til Ub-IL-18 og ubiquitinspesifikk protease transkribes til et enkelt mRNA-transkript fra hvilket Ub-IL-18 og ubiquitinspesifikke proteaseproteiner translateres hver for seg.

Som beskrevet ovenfor har det aktive, humane IL-18-polypeptid, oppnådd ifølge foreliggende fremgangsmåter, en aktivitet som induserer produksjon av IFN- $\gamma$  som en nyttig, biologisk aktiv substans, stimulerer produksjon av IFN- $\gamma$  fra KG-1 (human myelomonocytisk celledinje)-celler (figur 21) og rensset, humant PBMC (figur 22).

#### 25 EKSEMPEL 1 - Tilberedning av forløper IL-18 (Pro-IL-18)

Human forløper IL-18 ble uttrykt som en N-terminal heksahistidinmerket fusjon i *E. coli*. Ekspressjonsplasmidet, ProEx-hIL18 ble avledet fra en vektor, pROEX-1 (Life Technologies) inneholdende Trc-promoteren og IacIq for induserbar ekspressjon med isopropyl-1-tio- $\beta$ -D-galaktopyranosid (IPTG). For å konstruere den rekombinante ekspressjonsvektor ble et DNA-fragment inneholdende hele caspase-5-forløpergenet amplifisert ved PCR fra en cDNA-klon, tilført i den 5' ende *Nde*I restriksjonssendonukleasetet og 3' med *Bam*HI-restriksjonssendonukleasetet. Det amplifiserte produkt ble subklonet mellom disse to restriksjonssetene i pROEX-, følgelig dannes en N-terminal fusjon med den hekso-histidinkodende sekvens tilstede i vektoren.

Den resulterende plasmid ble uttrykt i DH10B-vertsceller etter induksjon med 1mM IPTG i 5 timer ved 37 °C. Rekombinant protein ble høstet fra cellepelleter oppnådd etter sentrifugering av de induserte kulturer.

#### EKSEMPEL 2 - Rensing av Pro-IL-18

1,5 kg av *E. coli*-celler som uttrykker Pro-IL-18 som beskrevet i eksempel 1, ble suspendert i 3,6 l lysebuffer C (50 mM Tris HCl, 10 mM BME, 0,5 M NaCl, 5% glyserol, 1 µg/ml pepstatin A, 1 µg/ml leupepsin, 0,4 mM AEBSF), lysert ved 5 passasjer gjennom Microfluidics ved 12000 psi, sentrifugert ved 28000 x g, og 3,7 l supernatant ble innsamlet. 600 ml av NiNTA-agarose forhåndsekvilibrert med buffer C inneholdende 5 mM imidazol (buffer D) ble tilsatt supernatanten og oppslemmingen ble inkubert i en time for å fange opp Pro-IL-18. Oppslemmingen ble sentrifugert ved lav 10 hastighet (3000 rpm), supernatanten ble dekantert og oppslemmingen ble pakket i en kolonne. Kolonnen ble vasket med buffer D og pro-IL-18 ble eluert med 300 mM imidazol i buffer C. Oppsamlingen ble dialysert i buffer E (25 mM HEPES, 10 mM BME, pH 8,0) og anbrakt på DEAE ToyoPearl 650M-kolonne ekvillibrert med den samme buffer. Kolonnen ble eluert med en lineær gradient fra 0 til 0,5 M NaCl i buffer 15 E. Ansamlingen inneholdt 650 mg av >90% rent pro-IL-18.

#### EKSEMPEL 3 - Tilberedning av caspase-4

Humant caspase-4 ble også uttrykt som en N-terminal heksahistidinmerket fusjon i *E. coli*. 20 Ekspresjonsplasmidet, pET16b-caspase-4, ble avledet fra en vektor pET16b (Novagen) inneholdende fag T7-promoter. Den rekombinante vektor ble konstruert ved PCR-amplifisering av det caspase-4-aktive doménet (aminosyre Ile146 til Asn418), inkorporert med en hekso-histidinkodende sekvens ved den N-terminale ende og avsluttet med *NcoI*- og *XhoI*-restriksjonsendonukleaser. Det resulterende PCR- 25 produkt ble deretter subklonet mellom disse to restriksjonssteder for å danne den N-terminale Hekso-Histidin-Caspase-4-fusjonsvektoren.

Det resulterende plasmid ble overført til den lysogene BL21 DE3 *E. coli*-stammen inneholdende en kromosomal kopi av T7 RNA-polymerase under lacUV5- 30 promoterkontroll som muliggjør induserbar ekspresjon av caspase-4 etter induksjon med 1mM IPTG. Aktivt protein ble rensset fra cellepelleter isolert etter induksjon ved 37 °C i 3 timer.

#### EKSEMPEL 4 - Rensing av caspase-4

35

Når *E. coli*-celler som uttrykker N-terminalt hekso-Hismerket human caspase-4, beskrevet i eksempel 2 lyses, kan caspase-4-aktiviteten påvises i lysatsupernatanten.

Når proteinet oppfanges på NiNTA-agarosekuler fra supernatanten, gjenvinnes både p10 og p20. Dette antyder at caspase-4-proteasedoméne aktiveres under cellekulturen gjennom autospalting av koblingen p10 og p20 og forblir som en løselig, ikke-kovalent heterodimér. Med denne informasjon kan hekso-His-merket p20/p10 heterodimér  
 5 renses. Hele prosessen utføres ved 4 °C for å unngå ytterligere nedbryting av molekylet.

Omtrent 400 g av våt *E. coli*-cellepellet ble suspendert i 1,6 l lysebuffer inneholdende 25 mM HEPES, 0,1% CHAPS, 500 mM NaCl, 10 mM beta merkaptoetanol (BME) ved pH 7,4, og 10% glyserol (Buffer A) og lysert ved to passasjer gjennom Microfluidics  
 10 ved 12000 psi. Lysatet ble sentrifugert ved 30000 x g i 1 time og lysatsupernatanten, 1,7 l, ble gjenvunnet. NiNTA-agarose, 150 ml, som på forhånd var ekvillibrert med lysebuffer inneholdende 5 mM imidazol, ble tilsatt lysatsupernatanten, suspensjonen ble pH-justert til 8,0 med 2N NaOH, og caspase-4 ble batch-absorbert i en time. NiNTA-agarose ble pakket i kolonnen, vasket med 5 mM og 25 mM imidazol i Buffer A etter  
 15 hverandre for å fjerne forurensninger, og caspase-5 ble eluert med 300 mM imidazol i Buffer A. Proteinene ble dialysert mot Buffer B (25 mM HEPES, 0,1% CHAPS, 10% glyserol, 10 mM BME, pH 8,0) og anbrakt på DEAE ToyoPearl 650M kolonne, forhåndsekvillibrert med den samme buffer. Caspase-4 ble eluert fra kolonnen med 100 mM NaCl i den samme buffer. Fraksjonene som viste høyeste spesifikke aktivitet av  
 20 caspase-4 ved anvendelse av fluorescerende peptidsubstrat, LEED-AMC, ble samlet.

#### EKSEMPEL 5 - *In vitro* aktivering og tilberedning av polypeptid

Pro-IL-18 renses som beskrevet i eksempel 2, ble inkubert med caspase-4 ved 1:500  
 25 vekt/vekt forhold i 3 timer ved romtemperatur. Spaltingsreaksjonen av prodoméne var >90% fullført ifølge SDS-PAGE-analyse. Til reaksjonsblandingen ble 140 ml NiNTA-agarose i Buffer D tilsatt, inkubert i en time og helt gjennom en sintret glasstrakt for å gjenvinne ubundet materiale inneholdende hovedsakelig modent IL-18. Mindre mengder av gjenværende Pro-IL-18, prodoméne, caspase-4 og andre urenheter, ble  
 30 bundet til en NiNTA-agarose. Den ubundete løsningen ble justert til 25 mM DTT, inkubert i en time for fullføring av reduksjonsreaksjonen, pH-justering av løsningen til 6,0 ved tilsetning av 2M fosforsyre, og konsentrert til 86 ml ved anvendelse av YM10-membran. Den konsentrerte prøven ble anbrakt på Superdex 75-kolonne ekvillibrert med 10 mM NaFosfat pH 6,0 inneholdende 0,1 M NaCl. Sammenslåtte fraksjoner  
 35 inneholdt 560 mg av modent IL-18.

#### EKSEMPEL 6 - *In vivo* aktivering og tilberedning av polypeptid

Aktivering av IL-18 kan også oppnås *in vivo* gjennom samtidig ekspresjon av human forløper IL-18 og caspase-4. Pro-IL-18 ko-uttrykkes bisstronisk i *E. coli* fra et enkelt  
 5 transkript med human caspase-4 i ekspresjonsplasmidet pET28-Pro-IL-18/Casp4 (figurene 5 og 6). Det humane Pro-IL-18-genet subklones i pET28a (Novagen) under kontroll av T7-promoteren inkludert en effektiv Shine-Dalgarno-sekvens for optimal translasjonsinitiering fra Pro-IL-18-sekvensen (figur 8). Caspase-4-genet (Ile146 til  
 10 Asn418) ble umiddelbart subklonet etter Pro-IL-18-sekvensen inkludert en defekt Shine-Dalgarno sekvens, som tillater minimal translasjonsinitiering fra caspase-4-sekvensen. En T7-termineringssekvens ble inkludert for translasjonsterminering etter den bisstroniske transkripsjonsenheten. Den resulterende konstruksjonen ble deretter transfektert i en BL21(DE3)-vert inneholdende en induserbar, kromosomal kopi av T7-polymerasegenet. Induksjon av denne konstruksjon i denne vert med 1 mM IPTG  
 15 resulterte i sideordnet transkripsjon og translasjon av Pro-IL-18 og pro-caspase-4. Nylig translert pro-caspase-4 autoproseseres til en aktiv forbindelse som initierer den proteolytiske aktivering av Pro-IL-18. Figur 8 viser et tidsforløp av IL-18-aktiveringen i løpet av 18 timer ved 29 °C etterfulgt av 1 mM IPTG-induksjon (0-18 timer).

#### 20 EKSEMPEL 7 - *In vivo* aktivering av caspase-4

*In vivo* aktiveringen av caspase-4 er beskrevet i Munday, N. A., *et al.*, 1995, J. Biol. Chemistry, 270, 15870-15876. Ekspresjon av en avkortet form av caspase-4 som begynner ved Ala59 som mangler proregionen i *E. coli*, fører til egenaktivering ved  
 25 spalting til p10- og p20-subenheter som sammenkobles til en aktiv enzymheterodimér. Forsinkelsen i caspase-4-aktiveringen overføres til en forsinkelse i spaltingen og aktiveringen av Pro-IL-18 til modent IL-18 (figur 9). Dette muliggjør akkumulering av det mer stabile Pro-IL-18 før dets spalting til modent IL-18 som er mindre stabilt i celler.

30

#### EKSEMPEL 8 - Rensing av humant IL-18 ko-uttrykt med caspase-4

66 g *E. coli*-celler som uttrykker IL-18 som beskrevet i eksempel 6, ble suspendert i 130 ml 0,1 M HEPES, pH 7,5 inneholdende 1 mM EDTA og 10 mM DTT (hele prosessen  
 35 ble utført ved 4 °C i nærvær av 10 mM DTT, med unntak av det siste trinn for å opprettholde frie SH) og lysert ved 15000 psi ved to passasjer ved anvendelse av Microfluidics. Lysatet (230 ml) ble sentrifugert ved 34000 x g i 30 minutter.

Supernatanten (200 ml) ble fortynnet til 1 l med 25 mM HEPES, pH 7,0 og gjennomstrømmet to kolonner etter hverandre, ToyoPearl SP 650M og ToyoPearl DEAE 650M. Mye av urenheterne avledet fra *E. coli*-celler, ble bundet til kolonnene. Det gjennomstrømmede materiale ble justert til pH 9,5 med 25 mM bistris propan, fortynnet til 2 l og anbrakt på Source 15Q-kolonne, ekvillibrert med 25 mM bistris propan HCl pH 9,5. Kolonnen ble eluert med en lineær gradient av 0 til 0,5 M NaCl i den samme bufferen. Fraksjoner inneholdende IL-18 ble identifisert ved hjelp av Vydac C4 RP-HPLC og samlet (250 ml). Samlingen ble konsentrert til 50 ml ved anvendelse av YM10-membran, og anbrakt på Superdex 75-kolonne som var forhåndsekvillibrert med 10 mM NaPO<sub>4</sub> med pH 6,0, inneholdende 1 mM EDTA og 0,15 M NaCl (ingen DTT for *in vivo* anvendelse).

#### EKSEMPEL 9 - Tilberedning av trunkert caspase 5

Humant, trunkert caspase-5 ble også uttrykt som en N-terminal hekso-histidinmerket fusjon i *E. coli*. Det uttrykte plasmid, pET16b-trunkert caspase-5, ble avledet fra en vektor pET16b (Novagen) inneholdende fag-T7-promoteren. Den rekombinante vektoren ble konstruert ved PCR-amplifisering av det trunkerte caspase-5-aktive doméne (aminosyre Ile146 til Asn418) ved inkorporering av en hekso-histidinkodende sekvens ved den N-terminale ende og avsluttet med *NcoI*- og *XhoI*-restriksjonsendonukleaser. Det resulterende PCR-produkt ble deretter subklonet mellom disse to restriksjonssetene for å danne den N-terminale hekso-histidintrunkerte caspase-5-fusjonsvektor.

Det resulterende plasmid ble transformert til den lysogene BL21 DE3 *E. coli*-stammen, inneholdende en kromosomal kopi av T7-RNA-polymerase under lacUV5-promoterkontroll, som muliggjør induserbar ekspresjon av trunkert caspase-5 etter induksjon med 1 mM IPTG. Aktivt protein ble renset fra cellepelleten isolert etter induksjon ved 37 °C i 3 timer.

30

#### EKSEMPEL 10 - Rensing av trunkert caspase-5

Når *E. coli*-celler som uttrykker N-terminalt hekso-His-merket humant, trunkert caspase-5, beskrevet i eksempel 9 lyseres, kan trunkert caspase-5-aktivitet bestemmes i lysatsupernatanten. Når proteinet oppfanges på NiNTA-agarosekuler fra supernatanten, gjenvinnes både p10 og p20. Dette indikerer at trunkert caspase-5-proteasedoméne aktiveres under celledyrking gjennom autospalting av forbindelsen mellom p10 og p20

35

og opprettholdes som en løselig, ikke-kovalent heterodimér. Med denne informasjon kan hekso-His-merket p20/p10-heterodimér renses. Hele prosessen utføres ved 4 °C for å unngå ytterligere nedbrytning av molekylet.

5 Omtrent 400 g våt *E. coli*-cellepellet ble suspendert i 1,6 l lysebuffer inneholdende 25 mM HEPES, 0,1% CHAPS, 500 mM NaCl, 10 mM beta merkaptoletanol (BME) ved pH 7,4, og 10% glyserol (Buffer A) og lysert ved to passasjer gjennom Microfluidics ved 12000 psi. Lysatet ble sentrifugert ved 30000 x g i 1 time og lysatsupernatanten, 1,7 l, ble gjenvunnet. NiNTA-agarose, 150 ml, som på forhånd var ekvillibrert med lysebuffer  
 10 inneholdende 5 mM imidazol, ble tilsatt lysatsupernatanten, suspensjonen ble pH-justert til 8,0 med 2N NaOH, og caspase-5 ble batch-absorbert i en time. NiNTA-agarose ble pakket i kolonnen, vasket med 5 mM og 25 mM imidazol i Buffer A etter hverandre for å fjerne forurensninger, og caspase-5 ble eluert med 300 mM imidazol i Buffer A. Proteinet ble dialysert mot Buffer B (25 mM HEPES, 0,1% CHAPS, 10% glyserol, 10  
 15 mM BME, pH 8,0) og anbrakt på DEAE ToyoPearl 650M kolonne, forhåndsekvillibrert med den samme buffer. Det blokkerte caspase-5 ble eluert fra kolonnen med 100 mM NaCl i den samme buffer. Fraksjonene som viste den høyeste spesifikke aktivitet av caspase-5 ved anvendelse av det fluorescerende peptidsubstrat, LEED-AMC, ble oppsamlet.

20

#### EKSEMPEL 11 - *In vitro* aktivering og tilberedning av polypeptid

Pro-IL-18, tilberedt og rensert som beskrevet i eksempel 1 og 2, ble inkubert med trunkert caspase-5 ved 1:500 vekt/vekt forhold i 3 timer ved romtemperatur.  
 25 Spaltingsreaksjonen av pro-doméne var >90% fullført ifølge SDS-PAGE-analyse. Til reaksjonsblandingen ble 140 ml NiNTA-agarose i Buffer D tilsatt, inkubert i en time og helt gjennom en sintret glasstrakt for å gjenvinne ubundet materiale inneholdende hovedsakelig modent IL-18. Mindre mengder av gjenværende Pro-IL-18, pro-doméne, trunkert caspase-5 og andre urenheter, ble bundet til NiNTA-agarose. Den ubundete  
 30 løsningen ble justert til 25 mM DTT, inkubert i en time for fullføring av reduksjonsreaksjonen, pH-justering av løsningen til 6,0 ved tilsetning av 2M fosforsyre, og konsentrert til 86 ml ved anvendelse av YM10-membran. Den konsentrerte prøven ble anbrakt på Superdex 75-kolonne ekvillibrert med 10 mM NaFosfat pH 6,0 inneholdende 0,1 M NaCl. Sammenslåtte fraksjoner inneholdt 560 mg av modent IL-18.

35

### EKSEMPEL 12 - *In vivo* aktivering og tilberedning av polypeptid

Aktivering av IL-18 kan også oppnås *in vivo* gjennom samtidig ekspresjon av human forløper IL-18 og trunkert caspase-5. Pro-IL-18 ble ko-uttrykt i bisistronisk i *E. coli* fra et enkelt transkript med human caspase-5 i ekspresjonsplasmidet pET28-Pro-IL-18/Casp5 (figurene 9). Det humane Pro-IL-18-genet subklones i pET28a (Novagen) under kontroll av T7-promoteren som inkluderer en effektiv Shine-Dalgarno-sekvens for optimal translasjonsinitiering fra Pro-IL-18-sekvensen (figur 10). Det trunkerte caspase-5-genet (Ile146 til Asn418) ble umiddelbart subklonet etter Pro-IL-18-sekvensen som inkluderer en defekt Shine-Dalgarno sekvens, som tillater minimal translasjonsinitiering fra den trunkerte caspase-5-sekvensen. En T7-termineringssekvens ble inkludert for translasjonsterminering etter den bisistroniske transkripsjonsenheten. Den resulterende konstruksjonen ble deretter transfektert i en BL21(DE3)-vert inneholdende en induserbar, kromosomal kopi av T7-polymerasegenet. Induksjon av denne konstruksjon i denne vert med 1 mM IPTG resulterte i sideordnet transkripsjon og translasjon av Pro-IL-18 og pro-caspase-5. Nylig tillaget, translaterert pro-caspase-5 autoproseseres til en aktiv forbindelse som initierer den proteolytiske aktivering av Pro-IL-18.

### 20 EKSEMPEL 13 - Rensing av humant IL-18 ko-uttrykt med trunkert caspase-5

66 g *E. coli*-celler som uttrykker IL-18, som beskrevet i eksempel 6, ble suspendert i 130 ml 0,1 M HEPES, pH 7,5 inneholdende 1 mM EDTA og 10 mM DTT (hele prosessen ble utført ved 4 °C og i nærvær av 10 mM DTT, med unntak av det siste trinn for å opprettholde frie SH) og lysert ved 15000 psi ved to passasjer ved anvendelse av Microfluidics. Lysatet (230 ml) ble sentrifugert ved 34000 x g i 30 minutter. Supernatanten (200 ml) ble fortynnet til 1 l med 25 mM HEPES, pH 7,0 og gjennomstrømmet to kolonner etter hverandre, ToyoPearl SP 650M og ToyoPearl DEAE 650M. Mye av urenheterne avledet fra *E. coli*-celler, ble bundet til kolonnene. Det gjennomstrømmede materiale ble justert til pH 9,5 med 25 mM bistris propan, fortynnet til 2 l og anbrakt på Source 15Q-kolonne, ekvillibrert med 25 mM bistris propan HCl pH 9,5. Kolonnen ble eluert med en lineær gradient fra 0 til 0,5 M NaCl i den samme bufferen. Fraksjoner inneholdende IL-18 ble identifisert ved hjelp av Vydac C4 RP-HPLC og slått sammen (250 ml). Samlingen ble konsentrert til 50 ml ved anvendelse av YM10-membran, og anbrakt på Superdex 75-kolonne som var forhåndsekvillibrert med 10 mM NaPO<sub>4</sub> pH 6,0, inneholdende 1 mM EDTA og 0,15 M NaCl (ingen DTT for *in vivo* anvendelse).

#### EKSEMPEL 14 - Tilberedning av Ubiquitin/Pro-IL-18/Ubp1

Den 76 aminosyrers ubiquitinkodende sekvens fuseres i rammen med start på det modne, humane IL-18 gjennom butt-endering, slik at det første tyrosinkodon i modent IL-18 følger umiddelbart etter glysin 76-kodonet av ubiquitin. Genfusjonen subklones deretter i en pEt-vektor under kontroll av T7-promoteren som inkluderer en effektiv Shine-Dalgarno-sekvens for optimal translasjonsinitiering fra ubiquitin-IL-18-gensekvensen. Fullengde Ubp-1-genet subklones deretter umiddelbart etter IL-18 som inkluderer en defekt Shine-Dalgarno-sekvens for minimal translasjon av Ubp-1. Figur 11 viser sekvensen av UbIL-18/Ubp-1-ekspresjonskassetten i pET28. Figur 13 viser den kommenterte sekvensen av UbIL-18/Ubp-1 i pET28. Tallene tilsvarer posisjonen i pET28.

#### 15 EKSEMPEL 15 - *In vivo* aktivering og tilberedning av IL-18

Konstruksjonen ifølge eksempel 14 ble deretter transfektert i en BL(DE3)-vert. Induksjon med 1mM IPTG resulterte i den samordnete transkripsjon og translasjon av Ubiquitin-IL-18 og Ubp-1. Den enzymatiske effekt av Ubp-1 førte til effektiv prosessering av Ub-IL-18 til modent, aktivt IL-18 som deretter direkte kan renses fra *E. coli*-lysater ved konvensjonelle metoder. Figur 16 illustrerer tidsforløpet for IL-18-ekspresjon og prosessering ved 30 °C og 37 °C etter induksjon med 1 mM IPTG. Den øvre pil antyder andelen uprosessert Ub-IL-18 i felt 1. Den nedre pil antyder andelen prosessert IL-18 i felt 3. (Western blot påvisning ved anvendelse av anti-IL-18-antisera).

#### EKSEMPEL 16 - Rensing av humant IL-18 ko-uttrykt med ubiquitin

66 g *E. coli*-celler som uttrykker IL-18, som beskrevet i eksempel 15, ble suspendert i 130 ml 0,1 M HEPES, pH 7,5 inneholdende 1 mM EDTA og 10 mM DTT (hele prosessen ble utført ved 4 °C og i nærvær av 10 mM DTT, med unntak av det siste trinn for å opprettholde frie SH) og lysert ved 15000 psi ved to passasjer ved anvendelse av Microfluidics. Lysatet (230 ml) ble sentrifugert ved 34000 x g i 30 minutter. Supernatanten (200 ml) ble fortynnet til 1 l med 25 mM HEPES, pH 7,0 og gjennomstrømmet to kolonner etter hverandre, ToyoPearl SP 650M og ToyoPearl DEAE 650M. Mye av urenheterne avledet fra *E. coli*-celler, ble bundet til kolonnene. Det gjennomstrømmede materiale ble justert til pH 9,5 med 25 mM bistris propan,

fortynnet til 2 l og anbrakt på Source 15Q-kolonne, ekvillibrert med 25 mM bistris propan HCl pH 9,5. Kolonnen ble eluert med en lineær gradient fra 0 til 0,5 M NaCl i den samme bufferen. Fraksjoner inneholdende IL-18 ble identifisert ved anvendelse av Vydac C4 RP-HPLC og slått sammen (250 ml). Samlingen ble konsentrert til 50 ml ved  
5 anvendelse av YM10-membran, og anbrakt på Superdex 75-kolonne som var forhåndsekvillibrert med 10 mM NaPO<sub>4</sub> pH 6,0, inneholdende 1 mM EDTA og 0,15 M NaCl (ingen DTT for *in vivo* anvendelse).

P a t e n t k r a v

1.

Fremgangsmåte for fremstilling av aktivt, humant IL-18 polypeptid fra et humant  
5 forløper-IL-18-polypeptid, k a r a k t e r i s e r t v e d at den  
omfatter:

- (i) bicistronisk ko-ekspressjon av caspase-4 eller caspase 5 med den humane  
forløper-IL-18 polypeptid ved å bruke en bicistronisk ekspresjonsvektor som  
omfatter en sekvens som koder for den humane forløper-IL-18 etterfulgt av en  
10 sekvens som koder for caspase 4 eller caspase 5 separert av en intergenisk region  
som inkluderer en defekt Shine-Dalgarno sekvens og  
(ii) rensing av det aktive polypeptidet.

2.

Fremgangsmåte i følge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at  
15 det aktive IL-18 polypeptidet er et polypeptid som har aminosyresekvensen SEQ ID  
NO: 3.

3.

Fremgangsmåte i følge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t  
20 v e d at caspase 4 har aminosyresekvensen SEQ ID NO: 4 eller caspase 5 har  
aminosyresekvensen SEQ ID NO: 6.

1

## SEQUENCE LISTING

5 <110> SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION

<120> METHOD FOR PREPARING A PHYSIOLOGICALLY  
ACTIVE IL-18 POLYPEPTIDE

10 <130> P51137

<140> TO BE ASSIGNED  
<141> Herewith

15 <150> 60/211,832  
<151> 2000-06-15

<150> 60/224,128  
<151> 2000-08-10

20 <150> 60/264,923  
<151> 2001-01-30

<160> 12

25 <170> FastSEQ for Windows Version 3 0

<210> 1  
<211> 193

30 <212> PRT  
<213> Homo sapien

<400> 1

Met Ala Ala Glu Pro Val Glu Asp Asn Cys Ile Asn Phe Val Ala Met  
35 1 5 10 15  
Lys Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ile Ala Glu Asp Asp Glu Asn  
20 25 30  
Leu Glu Ser Asp Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile  
35 40 45

40 Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro  
50 55 60  
Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg  
65 70 75 80







5

&lt;213&gt; Homo sapien

&lt;400&gt; 6

5 Met Gly His His His His His His Gly Ile Leu Lys Leu Cys Pro Arg  
 1 5 10 15  
 Glu Glu Phe Leu Arg Leu Cys Lys Lys Asn His Asp Glu Ile Tyr Pro  
 20 25 30  
 Ile Lys Lys Arg Glu Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Ile Ile Cys Asn  
 35 40 45  
 10 Thr Lys Phe Asp His Leu Pro Ala Arg Asn Gly Ala His Tyr Asp Ile  
 50 55 60  
 Val Gly Met Lys Arg Leu Leu Gln Gly Leu Gly Tyr Thr Val Val Asp  
 65 70 75 80  
 Glu Lys Asn Leu Thr Ala Arg Asp Met Glu Ser Val Leu Arg Ala Phe  
 15 85 90 95  
 Ala Ala Arg Pro Glu His Lys Ser Ser Asp Ser Thr Phe Leu Val Leu  
 100 105 110  
 Met Ser His Gly Ile Leu Glu Gly Ile Cys Gly Thr Ala His Lys Lys  
 115 120 125  
 20 Lys Lys Pro Asp Val Leu Leu Tyr Asp Thr Ile Phe Gln Ile Phe Asn  
 130 135 140  
 Asn Arg Asn Cys Leu Ser Leu Lys Asp Lys Pro Lys Val Ile Ile Val  
 145 150 155 160  
 Gln Ala Cys Arg Gly Glu Lys His Gly Glu Leu Trp Val Arg Asp Ser  
 165 170 175  
 25 Pro Ala Ser Leu Ala Val Ile Ser Ser Gln Ser Ser Glu Asn Leu Glu  
 180 185 190  
 Ala Asp Ser Val Cys Lys Ile His Glu Glu Lys Asp Phe Ile Ala Phe  
 195 200 205  
 30 Cys Ser Ser Thr Pro His Asn Val Ser Trp Arg Asp Arg Thr Arg Gly  
 210 215 220  
 Ser Ile Phe Ile Thr Glu Leu Ile Thr Cys Phe Gln Lys Tyr Ser Cys  
 225 230 235 240  
 Cys Cys His Leu Met Glu Ile Phe Arg Lys Val Gln Lys Ser Phe Glu  
 245 250 255  
 35 Val Pro Gln Ala Lys Ala Gln Met Pro Thr Ile Glu Arg Ala Thr Leu  
 260 265 270  
 Thr Arg Asp Phe Tyr Leu Phe Pro Gly Asn  
 275 280  
 40

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 849

&lt;212&gt; DNA

6

&lt;213&gt; Homo sapien

&lt;400&gt; 7

	atgggccatc	atcatcatca	tcatggcata	ctcaaacttt	gtcctcgtga	agaattcctg	60
5	agactgtgta	aaaaaatca	tgatgagatc	tatccaataa	aaaagagaga	ggaccgcaga	120
	cgcttggtc	tcatcatatg	caatacaaag	tttgatcacc	tgcctgcaag	gaatggggct	180
	cactatgaca	tcgtggggat	gaaaaggctg	cttcaaggcc	tggtctacac	tgtggttgac	240
	gaaaagaatc	tcacagccag	ggatatggag	tcagtgtctga	gggcatttgc	tgccagacca	300
	gagcacaagt	cctctgacag	caogttcttg	gtactcatgt	ctcatggcat	cctagagggg	360
10	atctgoggaa	ctgcgcataa	aaagaaaaaa	ccggatgtgc	tgctttatga	caccatcttc	420
	cagatattca	acaaccgcaa	ctgcctcagt	ctaaaggaca	aaccaaggt	catcattgtc	480
	caggcctgca	gaggtgaaaa	acatggggaa	ctctgggtca	gagactctcc	agcatccttg	540
	gcagtcattc	cttcacagtc	atctgagaac	ctggaggcag	attctgtttg	caagatccac	600
	gaggagaagg	acttcattgc	tttctgttct	tcaacaccac	ataacgtgtc	ctggagagac	660
15	cgcaacaagg	gtccatctt	cattacggaa	ctcatcacat	gcttccagaa	atattcttgc	720
	tgctgccacc	taatggaaat	alttcggaag	gtacagaaat	catttgaagt	tccacaggct	780
	aaagcccaga	tgcccacat	agaacggaca	accttgacaa	gagatttcta	cctctttcct	840
	ggcaattga						849

20

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 1743

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapien

25

&lt;400&gt; 8

	agatctcgat	cccgcgaaat	taatacgact	cactataggg	gaattgtgag	cggataacaa	60
	ttcccctcta	gaccacacct	taaggaggat	ataacatag	gctgctgaac	cagtagaaga	120
	caattgcac	aactttgtgg	caatgaaatt	tattgacaat	acgctttact	ttatagctga	180
	agatgatgaa	aacctggaat	cagattactt	tggcaagctt	gagagcaaac	tatcggtcat	240
30	tcgtaattta	aatgaccagg	tcctattht	cgaccaaggg	aatcgtccac	tattcgagga	300
	catgacagac	agtgactgcc	gagacaatgc	gccgcgaacc	atthtcatta	tatctatgta	360
	caaggattct	cagccgcgcg	gaatggccgt	aactattht	gtcaaatgtg	aaaagatata	420
	cacgctgtcg	tgtgagaaca	agattattag	tttcaagag	atgaatccgc	cggataatat	480
	caaggacacg	aagtctgata	tcatattht	ccagcgcagc	gtgccggggc	acgataacaa	540
35	gatgcaattt	gaatcatcca	gctatgaagg	gtacttht	gcatgcgaga	aggaacgcga	600
	tctctthtaa	cttattthta	agaaagagga	cgagctaggc	gatcgcagca	ttatgttcac	660
	tgtccaaaat	gaagactagt	ggaggatata	ataccaggaa	taaataaaat	ccatgggcca	720
	tcatcatcat	catcatggcg	ccctcaagct	ttgtcctcat	gaagaattcc	tgagactatg	780
	taaagaaaga	gctgaagaga	tctatccaat	aaaggagaga	aacaaccgca	cacgcctggc	840
40	tctcatcata	tgcaatacag	agthtgacca	tctgcctcog	aggaatggag	ctgactthga	900
	catcacaggg	atgaaggagc	tacttgaggg	tctggactat	agtgtagatg	tagaagagaa	960
	tctgacagcc	agggatatgg	agtcagcgt	gagggcattt	gctaccagac	cagagcacia	1020
	gtcctctgac	agcacattct	tggtactcat	gtctcatggc	atcctggagg	gaatctgcgg	1080

7

	aactgtgcat	gatgagaaaa	aaccagatgt	gctgctttat	gacaccatct	tccagatatt	1140
	caacaaccgc	aactgcctca	gtctgaagga	caaacccaag	gtcatcattg	tccaggcctg	1200
	cagaggtgca	aaccgtgggg	aactgtgggt	cagagactct	ccagcatcct	tggaagtggc	1260
	ctottcagag	tcatctgaga	acctggagga	agatgctggt	tacaagaccc	acgtggagaa	1320
5	ggacttcatt	gctttctgct	ottcaacgcc	acacaacgtg	tcctggagag	acagcacaat	1380
	gggtctctatc	ttcatcacac	aactcatcac	atgcttccag	aaatattctt	gggtctgcca	1440
	cctagaggaa	gtatltcggg	aggtacagca	atcatttgaa	actccaaggg	ccaaagctca	1500
	aatgccacc	atagaacgac	tgtccatgac	aagatatttc	tacctcttcc	ctggcaattg	1560
	aaaatggatc	cgaattcgag	ctccgtcgac	aagcttgcgg	ccgcactcga	gcaccaccac	1620
10	caccaccact	gagatccggc	tgctaacaaa	gcccgaaagg	aagctgagtt	ggctgctgcc	1680
	accgctgagc	aataactagc	ataaccctt	ggggcctcta	aacgggtctt	gaggggtttt	1740
	ttg						1743
	<210>	9					
15	<211>	1464					
	<212>	DNA					
	<213>	Homo sapien					
	<400>	9					
20	atggctgctg	aaccagtaga	agacaattgc	atcaactttg	tggcaatgaa	atttattgac	60
	aatacgcttt	actttatagc	tgaagatgat	gaaaacctgg	aatcagatta	ctttggcaag	120
	cttgagagca	aactatcggg	cattcgtaat	ttaaattgacc	aggtectatt	tatcgaccaa	180
	gggaatcgtc	cactattcga	ggacatgaca	gacagtgact	gccgagacaa	tgcgccgca	240
	accattttca	ttatatctat	gtacaaggat	tctcagccgc	gcggaatggc	cgtaactatt	300
25	totgtcaaat	gtgaaaagat	atccacgctg	tcgtgtgaga	acaagattat	tagtttcaaa	360
	gagatgaatc	cgccggataa	tatcaaggac	acgaagtctg	atatcatatt	tttccagcgc	420
	agcgtgccgg	ggcacgataa	caagatgcaa	tttgaatcat	ccagctatga	agggtacttt	480
	cttgcatgcg	agaaggaacg	cgatctcttt	aaacttattt	taaagaaaaga	ggacgagcta	540
	ggcgatcgca	gcattatggt	cactgtccaa	aatgaagact	agtggaggat	ataataccag	600
30	gaataaataa	aatocatggg	ccatcatcat	catcatcatg	gcatactcaa	actttgtcct	660
	cgtgaagaat	tcctgagact	gtgtaaaaaa	aatcatgatg	agatctatcc	aataaaaaag	720
	agagaggacc	gcagacgcct	ggctctcacc	atalgcaata	caaagtttga	tcacctgcct	780
	gcaaggaatg	gggctcacta	tgacatcgtg	gggalgaaaa	ggctgcttca	aggcctgggc	840
	tacaotgtgg	ttgacgaaaa	gaatctcaca	gccagggata	tggagtcagt	gctgagggca	900
35	tttgcctgcca	gaccagagca	caagtcctct	gacagcacgt	tcttgggtact	catgtctcat	960
	ggcatcctag	agggaatctg	cggaactgcg	cataaaaaaga	aaaaaccgga	tgtgctgctt	1020
	tatgacacca	tcttccagat	attcaacaac	cgcaactgcc	tcagtctaaa	ggacaaaccc	1080
	aaggatcatca	ttgtccaggc	ctgcagaggt	gaaaaacatg	gggaactctg	ggtcagagac	1140
	tctccagcat	ccttggcagt	catctcttca	cagtcactctg	agaacctgga	ggcagattct	1200
40	gtttgcaaga	tccacgagga	gaaggacttc	attgctttct	gttcttcaac	accacataac	1260
	gtgtcctgga	gagaccgcac	aaggggctcc	atcttcatta	cggaactcat	cacatgcllc	1320
	cagaaatatt	cttgctgctg	ccaactaatg	gaaatatttc	ggaaggtaca	gaaatcattt	1380
	gaagttccac	aggctaaagc	ccagatgccc	accalagaac	gagcaacctt	gacaagagat	1440

8

ttctacctct ttctctggcaa ttga

1464

5 <210> 10  
 <211> 233  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapien

<400> 10  
 Met Gln Ile Phe Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu  
 10 1 5 10 15  
 Val Glu Ser Ser Asp Thr Ile Asp Asn Val Lys Ser Lys Ile Gln Asp  
 20 25 30  
 Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys  
 35 40 45  
 15 Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu  
 50 55 60  
 Ser Thr Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Tyr Phe Gly Lys  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu  
 20 85 90 95  
 Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser  
 100 105 110  
 Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr  
 115 120 125  
 25 Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys  
 130 135 140  
 Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys  
 145 150 155 160  
 Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile  
 30 165 170 175  
 Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu  
 180 185 190  
 Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp  
 195 200 205  
 35 Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser  
 210 215 220  
 Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp  
 225 230

40 <210> 11  
 <211> 702  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapien

	<400> 11					
	atgcagatct	tcgtcaagac	gttaaccggt	aaaaccataa	ctctagaagt	lgaatcttcc 60
	gataccatcg	acaacgtaa	gtcgaaaatt	caagacaagg	aaggcattcc	acctgatcaa 120
5	caaagattga	tctttgccgg	taagcagctc	gaagacggtg	gaacgctgtc	tgattacaac 180
	attcagaagg	agtcgacctt	acatcttgct	ttaagactaa	gaggagggtg	ctttggcaag 240
	cttgagagca	aactatcggg	cattcgtaat	ttaaatgacc	aggtcctatt	tatcgaccaa 300
	gggaatcgtc	cactattcga	ggacatgaca	gacagtgact	gccgagacia	tgccgcccga 360
	accattttca	ttatatctat	gtacaaggat	tctcagccgc	gccggaatggc	cgtaactatt 420
10	tctgtcaaat	gtgaaaagat	atocacgctg	tcgtgtgaga	acaagattat	tagtttcaaa 480
	gagatgaatc	cgccggataa	tatcaaggac	acgaagtctg	atatcatatt	lttccagccg 540
	agcgtgccgg	ggcacgataa	caagatgcaa	tttgaatcat	ccagctatga	agggtaacttt 600
	cttgcatgcg	agaaggaacg	cgatctcttt	aaacttattt	taaagaaaga	ggacgagcta 660
15	ggcgatcgca	gcattatggt	cactgtccaa	aatgaagact	ag	702
	<210> 12					
	<211> 3419					
	<212> DNA					
	<213> <i>Homo sapien</i>					
20	<400> 12					
	agatctcgat	cccgcgaaat	taatacgact	cactataggg	gaattgtgag	cggataacaa 60
	ttccccctcta	gaccacacct	taaggaggat	ataacatag	cagatcttcc	tcaagacggt 120
	aacocggtaaa	accataaactc	tagaagttga	atcttccgat	accatcgaca	acgttaagtc 180
25	gaaaattcaa	gacaaggaag	gcattccacc	tgatcaacaa	agattgatct	ttgccggtaa 240
	gcagctcgag	gacggtagaa	cgctgtctga	ttacaacatt	cagaaggagt	cgaccttaca 300
	tcttgtctta	agactaagag	gagggtactt	tggcaagcct	gagagcaaac	tatcggtcot 360
	tcgtaattta	aatgaccagg	tcctatttat	cgaccaaggg	aatcgtccac	tattcgagga 420
	catgacagac	agtgactgcc	gagacaatgc	gccgcgaacc	atcttcatta	tatctatgta 480
30	caaggattct	cagccgcgcg	gaatggccgt	aactatttct	gtcaaatgtg	aaaagatata 540
	cacgctgtcg	tgtgagaaca	agattattag	tttcaaagag	atgaatccgc	cggataatat 600
	caaggacacg	aagtctgata	tcatattttt	ccagcgcagc	gtgccggggc	acgataacaa 660
	gatgcaattt	gaatcatcca	gctatgaagg	gtactttctt	gcatgcgaga	aggaacgcga 720
	totctttaaa	cttattttta	agaaagagga	cgagctaggg	gatcgcagca	ttatggtcac 780
35	tgtccaaaat	gaagactagt	ggaggatata	ataccaggaa	taaataaaaat	ccatgggcca 840
	tcatcatcat	catcatggca	tggatgaaag	caagataaac	agtttattac	aatttttatt 900
	tggttcccga	caggattttt	tgagaaatth	taaaacttgg	agtaacaaca	ataacaatct 960
	atcgatttat	ttattaatth	ttggcatagt	agtatttttt	tataaaaaac	cagaccatct 1020
	aaactacatt	gttgagagcg	ttagtgaaat	gacaacaaac	ttcagaaata	ataatagcct 1080
40	tagccggttg	ttgccagaa	gtaagtttac	ccacttagac	gaagagatct	tgaaaagagg 1140
	tggtttcatt	gctgggttag	ttaatgatgg	taacacttgt	ttlatgaact	ctgttttgca 1200
	atcattggca	tcatccagag	aattaatgga	gttcttgagc	aataatgtca	taaggaccia 1260
	tgaggagata	gaacaaaatg	aacacaatga	agaaggaaac	gggcaagaat	ctgctcaaga 1320

## 10

	tgaagccact	cataagaaaa	acactcgtaa	gggtggcaaa	gtttatggta	agcataagaa	1380
	gaaattgaat	aggaagtcaa	gttcgaaaaga	agacgaagaa	aagagccagg	agccagatat	1440
	cactttcagt	gtcgccttaa	gggatctact	ttctgcctta	aatgcgaagt	attatcggga	1500
	taaaccctat	ttcaaaacca	atagtttatt	gaaagcaatg	tccaaatctc	caagaaaaaa	1560
5	tattcttctt	ggctacgacc	aagaggacgc	gcaagaattc	ttccagaaca	tactagccga	1620
	gttgaaagt	aacgttaaat	cattgaatac	tgaaaaacta	gataccactc	cagttgcgaa	1680
	atcagaatta	cccgatgatg	ctttagtagg	tcaacttaac	cttgggtgaag	ttggcactgt	1740
	ttacattcca	actgaacaga	ttgatcctaa	ctctatacta	catgacaagt	ccattcaaaa	1800
	tttcacacct	ttcaaaacta	tgactccttt	agatggtatc	acggcagaaa	gaattgggtg	1860
10	tttacagtgt	ggtgagaacg	gtggcataag	atattocgta	ttttcgggat	taagcttaaa	1920
	tttaccgaac	gagaatattg	gttccacttt	aaaattatct	cagttattga	gogactggag	1980
	taaacctgaa	atcatcgaag	tcgtagaatg	taaccgttgt	gccotcacag	cagcgcactc	2040
	tcatattttt	ggtcagttga	aagaatttga	aaaaaacct	gagggttcga	tcccagaaaa	2100
	gccaattaac	gctgtaaaag	atagggcca	tcaaatcgaa	gaagttcttg	ccaaaccagt	2160
15	tattgacgat	gaagattata	agaagttgca	tacagcaa	atggtacgta	aatgctctaa	2220
	atctaagcag	attttaatat	caagacctcc	accattatta	tccattcata	tcaacagatc	2280
	cgtatttgat	ccaagaacgt	acatgattag	aaaaataac	tcgaaagtat	tgtttaagtc	2340
	aacgttgaat	cttgcccctt	ggtgttgtga	tattaatgaa	atcaatttgg	atgctcgttt	2400
	gccaatgtca	aaaaaggaaa	aagctgcgca	acaagattca	agtgaagatg	aaaacattgg	2460
20	cgggtgaatac	tatacgaat	tacatgaacg	cttcgagcag	gaatttgaag	acagcagagga	2520
	agaaaaagaa	tacgatgacg	cagaggggaa	ctatgcgtct	cattacaatc	ataccaagga	2580
	tatcagtaac	tatgatcccc	taaacggtga	agtogattggc	gtgacatccg	atgatgaaga	2640
	tgagtacatt	gaagaaaccg	atgcttttagg	gaatacaatc	aaaaaaagga	tcatagaaca	2700
	ttctgatggt	gaaaacgaga	atgtaaaaga	taatgaagaa	ctgcaagaaa	tcgacaatgt	2760
25	gagccttgac	gaaccaaaga	tcaatggtga	agatcaacta	gaaacatcat	ctgatgagga	2820
	agatggtata	ccagctccac	ctatcaatta	tgotaggtca	ttttccacag	ttccagccac	2880
	tccattgaca	tattcattgc	gctctgtcat	tgttcaactac	ggtaccata	attatggtca	2940
	ttacattgca	tttagaaaat	acaggggttg	ttgggtggaga	atatctgatg	agactgtgta	3000
	cgttgtggac	gaagctgaag	tcctttcaac	accgggtgta	tttatgttat	tttacgaata	3060
30	tgactttgat	gaagaaactg	ggaagatgaa	ggatgatttg	gaagctattc	agagtaataa	3120
	tgaagaagat	gatgaaaaag	agcaggagca	aaaaggagtc	caggagccaa	aggaaagcca	3180
	agagcaagga	gaaggtgaag	agcaagagga	aggtcaagag	cagatgaagt	tcgagagaac	3240
	agaagaccat	agagatattt	ctggtaaaga	tgtaaaacta	gotcagacac	caccaccacc	3300
	accactgaga	tcoggctgct	aacaaagccc	gaaaggaagc	tgagttggct	gctgccaccg	3360
35	ctgagcaata	actagcataa	ccccttgggg	cctctaaacg	ggtcttgagg	ggttttttg	3419

1/31

## FIGUR 1

SEQ ID NO 1

1 MAAEPVEDNC INFVAMKFID NTLYFIAEDD ENLESDYFGK LESKLSVIRN  
 5 51 LNDQVLFIDQ GNRPLFEDMT DSDCRDNAPR TIFIISMYKD SQPRGMAVTI  
 101 SVKCEKISTL SCENKIISFK EMNPPDNIKD TKSDIIFQR SVPGHDKMQ  
 151 FESSYEGYF LACEKERDLF KLILKKEDEL GDRSIMFTVQ NED

## FIGUR 2

10 SEQ ID NO 2

1 50  
 ATGGCTGCTG AACCAGTAGA AGACAATTGC ATCAACTTTG TGGCAATGAA  
 51 100  
 ATTTATTGAC AATACGCTTT ACTTTATAGC TGAAGATGAT GAAAACCTGG  
 15 101 150  
 AATCAGATTA CTTTGGCAAG CTGAGAGCA AACTATCGGT CATtCGTAAT  
 151 200  
 TTAAATGACC AGGTCCTATT TATCGACCAA GGAATCGTC CACTATTGCA  
 201 250  
 20 GGACATGACA GACAGTGACT GCCGAGACAA TCGCCGCGA ACCATtTTCA  
 251 300  
 TTATATCTAT GTACAAGGAT TCTCAGCCGC GCGGAATGGC CGTAACTATT  
 301 350  
 TCTGTCAAAT GTGAAAAGAT ATCCACGCTG TCGTGTGAGA ACAAgATTAT  
 25 351 400  
 tAGTTTCAAA GAGATGAATC CGCCGATAA TATCAAGGAC ACGAAGTCTG  
 401 450  
 ATATCATATT TTTCCAGCGC AGCGTGCCGG GGCACGATAA CAAGATGCAA  
 451 500  
 30 TTTGAATCAT CCAGCTATGA AGGGTACTTT CTTGCATGCG AGAAGGAACG  
 501 550  
 CGATCTCTTT AAActTATT TAAAGAAAGA GGACGAGCTA GGCGATCGCA  
 551 582  
 GCATtATGTT CACTGTCCAA AATGAAGACT AG  
 35

## FIGUR 3

SEQ ID NO.3

1 YFGKLESKLS VIRNLNDQVL FIDQGNRPLF EDMTDSDCRD NAPRTIFIIS  
 51 MYKDSQPRGM AVTISVKCEK ISTLSCENKI ISFKEMNPPD NIKD'TKSDII  
 40 101 FFQRSVPGHD NKMQFESSY EGYFLACEKE RDLFKLILKK EDELGDRSIM

2/31

151 FTVQNE

## FIGUR 4

SEQ ID NO 4

5 1 MGHHHHHHGA LKLCPHEEFL RLCKERAEEI YPIKERNNRT RLALICNTE  
 51 FDHLPPRNGA DFDITGMKEL LEGLDYSVDV EENLTARDME SALRAFATRP  
 101 EHKSSDSTFL VLMSHGILEG ICGTVHDEK PDVLLYDTIF QIFNNRNCLS  
 151 LKDKPKVIIV QACRGANRGE LWVRDPTSL EVASSQSEN LEEDAVYKTH  
 201 VEKDFIAFCS STPHNVSWRD STMGSIFITQ LITCFQKYSW CCHLEEVFRK  
 10 252 VQOSFETPRA KAQMPTIERL SMTRYFYLF GN

## FIGUR 5

SEQ ID NO 5

1 50  
 15 ATGGGCCATC ATCATCATCA TCATGGCGCC CTCAGCTTT GTCCTCATGA  
 51 100  
 AGAATTCCTG AGACTATGTA AAGAAAGAGC TGAAGAGATC TATCCAATAA  
 101 150  
 AGGAGAGAAA CAACCGCACA CGCCTGGCTC TCATCATATG CAATACAGAG  
 20 151 200  
 TTTGACCATC TGCCTCCGAG GAATGGAGCT GACTTTGACA TCACAGGGAT  
 201 250  
 GAAGGAGCTA CTTGAGGGTC TGGACTATAG TGTAGATGTA GAAGAGAATC  
 251 300  
 25 TGACAGCCAG GGATATGGAG TCAGCGCTGA GGGCATTTC TACCAGACCA  
 301 350  
 GAGCACAAGT CCTCTGACAG CACATTCTTG GTACTCATGT CTCATGGCAT  
 351 400  
 CCTGGAGGGA ATCTGCGGAA CTGTGCATGA TGAGAAAAA CCAGATGTGC  
 30 401 450  
 TGCTTTATGA CACCATCTTC CAGATATTCA ACAACCGCAA CTGCCTCAGT  
 451 500  
 CTGAAGGACA AACCCAAGGT CATCATTGTC CAGGCCTGCA GAGGTGCAAA  
 501 550  
 35 CCGTGGGGAA CTGTGGGTCA GAGACTCTCC AGCATCCTTG GAAGTGGCCT  
 551 600  
 CTTACAGTC ATCTGAGAAC CTGGAGGAAG ATGCTGTTTA CAAGACCCAC  
 601 650  
 GTGGAGAAGG ACTTCATTGC TTCTTGCTCT TCAACGCCAC ACAACGTGTC  
 40 651 700  
 CTGGAGAGAC AGCACAATGG GCTCTATCTT CATCACACAA CTCATCACAT  
 701 750  
 GCTTCCAGAA ATATTCTTGG TGCTGCCACC TAGAGGAAGT ATTTCCGAAG  
 751 800

3/31

GTACAGCAAT CATTGAAAC TCCAAGGGCC AAAGCTCAA TGCCCACCAT  
 801 849  
 AGAACGACTG TCCATGACAA GATATTTCTA CCTCTTCTCT GGCAATGA

## 5 FIGUR 6

SEQ ID NO 6

1 MGHHHHHHGI LKLCPREEFL RLCKKNHDEI YPIKKREDRR RLALIICNTK  
 51 FDHLPARNGA HYDIVGMKRL LQGLGYTVVD EKNLTARDME SVLRAFAARP  
 101 EHKSSDSTFL VLMSHGILEG ICGTAHKKKK PDVLLYDTIF QIFNNRNCLS  
 10 151 LKDKPKVIIV QACRGEKHGE LWVRDSPASL AVISSQSSSEN LEADSVCKIH  
 201 EEKDFIAFCS STPHNVSWRD RTRGSIFITE LITCFQKYSC CCHLMEIFRK  
 251 VQKSFEVPOA KAQMPTIERA TLTRDFYLFP GN

## FIGUR 7

15 SEQ ID NO 7

1 50  
 ATGGGCCATC ATCATCATCA TCATGGCATA CTCAAACCTT GTCCTCGTGA  
 51 100  
 AGAATTCCTG AGACTGTGTA AAAAAATCA TGATGAGATC TATCCAATAA  
 20 101 150  
 AAAAGAGAGA GGACCGCAGA CGCCTGGCTC TCATCATATG CAATACAAAG  
 151 200  
 TTTGATCACC TGCCCTGCAAG GAATGGGGCT CACTATGACA TCGTGGGGAT  
 201 250  
 25 GAAAAGGCTG CTTCAAGGCC TGGGCTACAC TGTGGTTGAC GAAAAGAATC  
 251 300  
 TCACAGCCAG GGATATGGAG TCAGTGCTGA GGGCATTTC TGCCAGACCA  
 301 350  
 GAGCACAAGT CCTCTGACAG CACGTTCTTG GTACTCATGT CTCATGGCAT  
 30 351 400  
 CCFAGAGGGA ATCTGCGGAA CTGCGCATAA AAAGAAAAA CCGGATGTGC  
 401 450  
 TGCTTTATGA CACCATCTTC CAGATATTCA ACAACCGCAA CTGCCTCAGT  
 451 500  
 35 CFAAAGGACA AACCCAAGGT CATCATTGTC CAGGCCTGCA GAGGTGAAAA  
 501 550  
 ACATGGGGAA CTCTGGGTCA GAGACTCTCC AGCATCCTTG GCAGTCATCT  
 551 600  
 CTTACAGTC ATCTGAGAAC CTGGAGGCAG ATTCTGTTTG CAAGATCCAC  
 40 601 650  
 GAGGAGAAGG ACTTCATTGC TTTCTGTTCT TCAACACCAC ATAACGTGTC  
 651 700  
 CTGGAGAGAC CGCACAAGGG GCTCCATCTT CATTACGGAA CTCATCACAT

4/31

```

701      750
GCTTCCAGAA ATATTCTTGC TGCTGCCACC TAATGGAAAT ATTTCCGGAAG
751      800
GTACAGAAAT CATTTGAAGT TCCACAGGCT AAAGCCCAGA TGCCCACCAT
5 801      849
AGAACGAGCA ACCTTGACAA GAGATTTCTA CCTCTTTCTT GGCAATTGA

```

FIGURE 8



FIGURE 9

```

15 SEQ ID NO 8
1      50
AGATCTCGAT CCCGCGAAAT TAATACGACT CACTATAGGG GAATTGTGAG
51      100
CGGATAACAA TTCCCCTCTA GACCACACCT taaggaggat ataacatATG
20 101      150
GCTGCTGAAC CAGTAGAAGA CAATTGCATC AACTTTGTGG CAATGAAATT
151      200
TATTGACAAT ACGCTTTACT TTATAGCTGA AGATGATGAA AACCTGGAAT
201      250
25 CAGATTACTT TGGCAAGCTT GAGAGCAAAC TATCGGTCAT tCGTAATTTA
251      300
AATGACCAGG TCCTATTTAT CGACCAAGGG AATCGTCCAC TATTCGAGGA
301      350
CATGACAGAC AGTGACTGCC GAGACAATGC GCCGCGAACC ATtTTCATTA
30 351      400
TATCTATGTA CAAGGATTCT CAGCCGCGCG GAATGGCCGT AACTATTTCT
401      450
GTCAAATGTG AAAAGATATC CACGCTGTCG TGTGAGAACA AgATtATtAG
451      500
35 TTTCAAAGAG ATGAATCCGC CGGATAATAT CAAGGACACG AAGTCTGATA
501      550
TCATATTTTT CCAGCGCAGC GTGCCGGGGC ACGATAACAA GATGCAATTT
551      600
GAATCATCCA GCTATGAAGG GTACTTTCTT GCATGCGAGA AGGAACGCGA
40 601      650
TCTCTTTAAA CTTATTTTAA AGAAAGAGGA CGAGCTAGGC GATCGCAGCA

```

5/31

```

651 . 700
TtATGTTTcAC TGTCCAAAAT GAAGACTAGT ggaggatata aTACCAGGaa
701 750
taaataaaat ccatgGgcca tcatcatcat catcatggcG CCCTCAAGCT
5 751 800
TTGTCCTCAT GAAGAATTCC TGAGACTATG TAAAGAAAGA GCTGAAGAGA
801 850
TCTATCCAAT AAAGGAGAGA AACAAACGCA CACGCCTGGC TCTCATCATA
851 900
10 TGCAATACAG AGTTTGACCA TCTGCCTCCG AGGAATGGAG CTGACTTTGA
901 950
CATCACAGGG ATGAAGGAGC TACTTGAGGG TCTGGACTAT AGTGTAGATG
951 1000
TAGAAGAGAA TCTGACAGCC AGGGATATGG AGTCAGCGCT GAGGGCATTT
15 1001 1050
GCTACCAGAC CAGAGCACAA GTCCTCTGAC AGCACATCTT TGGTACTCAT
1051 1100
GTCTCATGGC ATCCTGGAGG GAATCTGCGG AACTGTGCAT GATGAGAAAA
1101 1150
20 AACCAGATGT GCTGCTTTAT GACACCATCT TCCAGATATT CAACAACCGC
1151 1200
AACTGCCTCA GTCTGAAGGA CAAACCCAAG GTCATCATTG TCCAGGCCTG
1201 1250
CAGAGGTGCA AACCGTGGGG AACTGTGGGT CAGAGACTCT CCAGCATCCT
25 1251 1300
TGGAAGTGGC CTCTTCACAG TCATCTGAGA ACCTGGAGGA AGATGCTGTT
1301 1350
TACAAGACCC ACGTGGAGAA GGACTTCATT GCTTTCTGCT CTTCACGCC
1351 1400
30 ACACAACGTG TCCTGGAGAG ACAGCACAAAT GGGCTCTATC TTCATCACAC
1401 1450
AACTCATCAC ATGCTTCCAG AAATATTCTT GGTGCTGCCA CCTAGAGGAA
1451 1500
GTATTTCCGA AGGTACAGCA ATCATTTGAA ACTCCAAGGG CCAAAGCTCA
35 1501 1550
AATGCCACCC ATAGAACGAC TGTCCATGAC AAGATATTTT TACCTCTTTC
1551 1600
CTGGCAATTG AAAATGGATC CGAATTGAG C'TCCGTCGAC AAGCTTGCGG
1601 1650
40 CCGCACTCGA GCACCACCAC CACCACCACT GAGATCCGGC TGCTAACAAA
1651 1700
GCCCGAAAGG AAGCTGAGTT GGCTGCTGCC ACCGCTGAGC AATAACTAGC

```











11/31

FIGURE 13  
SEQ ID NO 9

	1		50
	ATGGCTGCTG	AACCAGTAGA	AGACAATTGC
	ATCAACTTTG	TGGCAATGAA	
5	51		100
	ATTTATGAC	AATACGCTTT	ACTTTATAGC
	TGAAGATGAT	GAAAACCTGG	
	101		150
	AATCAGATTA	CTTTGGCAAG	CTTGAGAGCA
	AACTATCGGT	CATTCGTAAT	
	151		200
10	TTAAATGACC	AGGTCCTATT	TATCGACCAA
	GGGAATCGTC	CACTATTCGA	
	201		250
	GGACATGACA	GACAGTGAAT	GCCGAGACAA
	TGCGCCGCGA	ACCATTTTCA	
	251		300
	TTATATCTAT	GTACAAGGAT	TCTCAGCCGC
	GCGGAATGGC	CGTAACTATT	
15	301		350
	TCTGTCAAAT	GTGAAAAGAT	ATCCACGCTG
	TCGTGTGAGA	ACAAGATTAT	
	351		400
	TAGTTTCAA	GAGATGAATC	CGCCGATAA
	TATCAAGGAC	ACGAAGTCTG	
	401		450
20	ATATCATATT	TTCCAGCGC	AGCGTGCCGG
	GGCACGATAA	CAAGATGCAA	
	451		500
	TTTGAATCAT	CCAGCTATGA	AGGGTACTTT
	CTTGATGCG	AGAAGGAACG	
	501		550
	CGATCTCTTT	AACTTATTT	TAAAGAAAGA
	GGACGAGCTA	GGCGATCGCA	
25	551		600
	IGCATTATGTT	CACTGTCCAA	AATGAAGACT
	AGTGGAGGAT	ATAATACCAG	
	601		650
	GAATAAATAA	AATCCATGGG	CCATCATCAT
	CATCATCATG	GCATACTCAA	
	651		700
30	ACTTTGTCCT	CGTGAAGAAT	TCCTGAGACT
	GTGTAAAAA	AATCATGATG	
	701		750
	AGATCTATCC	AATAAAAAG	AGAGAGGACC
	GCAGACGCCT	GGCTCTCATC	
	751		800
	ATATGCAATA	CAAAGTTTGA	TCACCTGCCT
	GCAAGGAATG	GGGCTCACTA	
35	801		850
	TGACATCGTG	GGGATGAAAA	GGCTGCTTCA
	AGGCCTGGGC	TACACTGTGG	
	851		900
	TTGACGAAAA	GAATCTCACA	GCCAGGGATA
	TGGAGTCAGT	GCTGAGGGCA	
	901		950
40	TTTGCTGCCA	GACCAGAGCA	CAAGTCCTCT
	GACAGCACGT	TCTTGGTACT	
	951		1000
	CATGTCTCAT	GGCATCCTAG	AGGGAATCTG
	CGGAACTGCG	CATAAAAAGA	
	1001		1050

12/31

```

AAAARCCGGA TGTGCTGCTT TATGACACCA TCTTCCAGAT ATTCAACAAC
1051                                     1100
CGCAACTGCC TCAGTCTAAA GGACAAACCC AAGGTCATCA TTGTCCAGGC
1101                                     1150
5 CTGCAGAGGT GAAAAACATG GGGAACTCTG GGTGAGAGAC TCTCCAGCAT
1151                                     1200
CCTTGGCAGT CATCTCTTCA CAGTCATCTG AGAACCTGGA GGCAGATTCT
1201                                     1250
GTTTGCAAGA TCCACGAGGA GAAGGACTTC ATTGCTTTCT GTTCTTCAAC
10 1251                                     1300
ACCACATAAC GTGTCCTGGA GAGACCGCAC AAGGGGCTCC ATCTTCATTA
1301                                     1350
CGGAACTCAT CACATGCTTC CAGAAATATT CTTGCTGCTG CCACCTAATG
1351                                     1400
15 GAAATATTTT GGAAGGTACA GAAATCATTT GAAGTTCCAC AGGCTAAAGC
1401                                     1450
CCAGATGCCC ACCATAGAAC GAGCAACCTT GACAAGAGAT TTCTACCTCT
1451         1464
TTCTTGCCAA TTGA
20

```

FIGUR 14

```

25          GCGCCGGTGATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGA
4921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4980
          CGCGGCCACTACGGCCGGTGTACGCAGGCCGCATCTCCTAGCTCTAGAGCTAGGGCGCT
c          A G D A G H D A S G V E D R D L D P A K -
          T7 Promoter
30          AATTAATACGACTCACTATAGGGGAATGTGAGCGGATAACAATCCCTCTAGACCACA
4981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5040
          TTAATFATGCTGAGTGATATCCCTTAACACTCGCCTATTGTTAAGGGGAGATCTGGTGT
c          L I R L T I G E L * A D N N S P L D H T -
          Shine-Dalgarno ProIL18 start
35          CCTTaggaggatataaacatATGGCTGCTGAACCACTAGAAAGACAATTGCATCAACTTTG
5041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5100
          GGAattcctcctatatattgtaTACCGACGACTGGTTCATCTTCTGTAAACGTAGTTGAAAC
40 c          L R R I * H M A A E P V E D N C I N F V -
          TGGCAATGAAATTTATTGACAATACGCTTTACTTTTATAGCTGAAGATGATGAAAACCTGG
5101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5160
          ACCGTTACTTTAAATAACTGTTATGCGAAATGAAATATCGACTTCTACTACTTTTGGACC
45 c          A M K F I D N T L Y F I A E D D E N L E -

```

13/31

*Start of mature IL18*

AATCAGATTACTTTGGCAAGCTTGAGAGCAAACCTATCGGTTCATCGTAATTTAAATGACC  
 5161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5220  
 TTAGTCTAATGAAACCGTTTGAACCTTCGTTTGGATAGCCAGTAaGCATTAATTTACTGG  
 5  
 c S D Y F G K L E S K L S V I R N L N D Q -  
 AGGTCCTATTTATCGACCAAGGAATCGTCCACTATTCGAGGACATGACAGACAGTGACT  
 5221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5280  
 10 TCCAGGATAAATAGCTGGTTCCTTAGCAGGTGATAAGCTCCTGTACTGTCTGCTACTGA  
 c V L F I D Q G N R P L F E D M T D S D C -  
 GCCGAGACAATGCGCCGGAACCATTTTCATTATATCTATGTACAAGGATTCACGCCGC  
 15 5281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5340  
 CGGCTCTGTTACGCGGCGCTTGGTAaAAGTAATATAGATACATGTTCCCTAAGAGTCGGCG  
 c R D N A P R T I F I I S M Y K D S Q P R -  
 20 GCGGAATGGCCGTAACCTATTTCTGTCAAATGTGAAAAGATATCCACGCTGTGCTGTGAGA  
 5341 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5400  
 CGCCTTACCGGCATTGATAAAGACAGTTTACACTTTTCTATAGGTGCGACAGCACACTCT  
 c G M A V T I S V K C E K I S T L S C E N -  
 25 ACAAGATLATALAGTTTCAAAGAGATGAATCCGCCGATAATATCAAGGACACGAAGTCTG  
 5401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5460  
 TGTTCTAaTAaTCAAAGTTTCTCTACTTAGCGGCCTATTATAGTTCCTGTGCTTCAGAC  
 30 c K I I S F K E M N P P D N I K D T K S D -  
 ATATCATATTTTCCAGCGCAGCGTCCCGGGCACGATAACAAGATGCAATTTGAATCAT  
 5461 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5520  
 TATAGTATAAAAAGGTCCGCTCGCACGGCCCCGTGCTATGTTCTACGTTAAACTTAGTA  
 35 c I I F F Q R S V P G H D N K M Q F E S S -  
 CCAGCTATGAAGGGTACTTTCTTGCATGCGAGAAGGAACGCGATCTCTTTAAACTTATTT  
 5521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5580  
 40 GGTGATACCTCCCATGAAAGAACGTACGCTCTTCTTGGCTAGAGAAATTTGAATAAA  
 c S Y E G Y F L A C E K E R D L F K L I L -  
 TAAAGAAAGAGGACGAGCTAGGCGATCGCAGCATLGTTCACCTGTCCAAAATGAAGACT  
 45 5581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5640  
 ATTTCTTTCTCTGCTCGATCCGCTAGCGTCGTAaTACAAGTGACAGGTTTTACTTCTGA  
 c K K E D E L G D R S I M F T V Q N E D \* -  
 50 *Defective Shine-Dalgarno Start Caspase 5*  
 AGTggaggatataatACCAgGaatasaataaaatccatgGgccatcatcatcatcatcatg

14/31

5641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5700  
 TCacctcctatattATGGTcCctatttttaggtacCcggtagtagtagtagtac

5 c           W R I \* Y Q E \* I K S M G H H H H H H G -  
 5  
 gcATACTCAAACCTTGTCCCTCGTGAAGAATTCCTGAGACTGTGTAAAAAAATCATGATG  
 5701 -----+-----+-----+-----+-----+ 5760  
 cgTATGAGTTTGAACAGGAGCACTTCTTAAGGACTCTGACACATTTTTTTTAGTACTAC

10 c           I L K L C P R E E F L R L C K K N H D E -  
 10  
 AGATCTATCCAATAAAAAAGAGAGAGGACCGCAGACGCCCTGGCTCTCATCATATGCAATA  
 5761 -----+-----+-----+-----+-----+ 5820  
 TCTAGATAGGTTATTTTTCTCTCTCCTGGCGTCTGCGGACCGAGAGTAGTATACGTTAT

15 c           I Y P I K K R E D R R R L A L I I C N T -  
 15  
 CAAAGTTTGATCACCTGCCTGCAAGGAATGGGGCTCACTATGACATCGTGGGGATGAAAA  
 5821 -----+-----+-----+-----+-----+ 5880  
 GTTTCAAACTAGTGGACGGACGTTCCCTACCCCGAGTGATACTGTAGCACCCCTACTTTT

20 c           K F D H L P A R N G A H Y D I V G M K R -  
 20  
 GGCTGCTTCAAGGCCTGGGCTACACTGTGGTTGACGAAAAGAACTCACAGCCAGGGATA  
 5881 -----+-----+-----+-----+-----+ 5940  
 CCGACGAAGTCCGGACCCGATGTGACACCAACTGCTTTTCTTAGAGTGTGGTCCCTAT

25 c           L L Q G L G Y T V V D E K N L T A R D M -  
 25  
 TGGAGTCAGTGCTGAGGGCATTTGCTGCCAGACCAGAGCACAAAGTCCTCTGACAGCACGT  
 5941 -----+-----+-----+-----+-----+ 6000  
 ACCTCAGTCACGACTCCCGTAAACGACGGTCTGGTCTCGTGTTCAGGAGACTGTCTGTCA

30 c           E S V L R A F A A R P E H K S S D S T F -  
 30  
 TCTTGGTACTCATGTCTCATGGCATCCTAGAGGGAATCTGCCGAACTGCCATAAAAAGA  
 6001 -----+-----+-----+-----+-----+ 6060  
 AGAACCATGAGTACAGAGTACCGTAGGATCTCCCTTAGACGCCCTGACGGTATTTTTCT

35 c           L V L M S H G I L E G I C G T A H K K K -  
 35  
 AAAAACCGGATGTGCTGCTTTATGACACCATCTTCCAGATATTCAACAACCGCAACTGCC  
 6061 -----+-----+-----+-----+-----+ 6120  
 TTTTTGGCCTACACGACGAAATCTGTGGTAGAAGGTCTATAAGTTGTTGGCGTTGACGG

40 c           K P D V L L Y D T I F Q I F N N R N C L -  
 40  
 TCAGTCTAAAGGACAAACCAAGGTCATCATTTGTCAGGCCCTGCAGAGGTGAAAAACATG  
 6121 -----+-----+-----+-----+-----+ 6180  
 AGTCAGATTTCTGTTTGGGTTCCAGTAGTAACAGGTCCGGACGCTCCACTTTTTGTAC

45  
 50





17/31

```

AAGGCATTC ACCTGATCAA CAAAGATTGA TCTTTGCCGG TAAGCAGCTC
151 200
GAAGACGGTA GAACGCTGTC TGATTACAAC ATTCAGAAGG AGTCGACCTT
201 250
5 ACATCTTGTC TTAAGACTAA GAGGAGGGTA CTTTGGCAAG CTTGAGAGCA
251 300
AACTATCGGT CATTCGTAAT TTAAATGACC AGGTCCTATT TATCGACCAA
301 350
GGGAATCGTC CACTATTGCA GGACATGACA GACAGTGACT GCCGAGACAA
10 351 400
TGCGCCGCGA ACCATTTTCA TTATATCTAT GTACAAGGAT TCTCAGCCGC
401 450
GCGGAATGGC CGTAACTATT TCTGTCAAAT GTGAAAAGAT ATCCACGCTG
451 500
15 TCGTGTGAGA ACAAGATTAT TAGTTTCAAA GAGATGAATC CGCCGGATAA
501 550
TATCAAGGAC ACGAAGTCTG ATATCATATT TTTCCAGCGC AGCGTGCCGG
551 600
GGCAGATAA CAAGATGCAA TTTGAATCAT CCAGCTATGA AGGGTACTTT
20 601 650
CTTGCATGCG AGAAGGAACG CGATCTCTTT AAACCTATTT TAAAGAAAGA
651 700
GGACGAGCTA GGCGATCGCA GCATTATGTT CACTGTCCAA AATGAAGACT
701
25 AG

```

## FIGURE 18

```

30 SEQ ID NO:12
1 50
AGATCTCGAT CCCGCGAAAT TAATACGACT CACTATAGGG GAATTGTGAG
51 100
CGGATAACAA TTCCCCTCTA GACCACACCT TAAGGAGGAT ATAACATATG
35 101 150
CAGATCTTCG TCAAGACGTT AACCGGTAAA ACCATAACTC TAGAAGTTGA
151 200
ATCTTCCGAT ACCATCGACA ACGTTAAGTC GAAAATTCAA GACAAGGAAG
201 250
40 GCATTCCACC TGATCAACAA AGATTGATCT TTGCCGGTAA GCAGCTCGAG
251 300
GACGGTAGAA CGCTGTCTGA TTACAACATT CAGAAGGAGT CGACCTTACA
301 350

```

18/31

TCTTGTCCTA AGACTAAGAG GAGGGTACTT TGGCAAGCTT GAGAGCAAAC  
 351 400  
 TATCGGTCAT TCGTAATTTA AATGACCAGG TCCTATTTAT CGACCAAGGG  
 401 450  
 5 AATCGTCCAC TATTCGAGGA CATGACAGAC AGTGAAGTCC GAGACAATGC  
 451 500  
 GCCGCGAACC ATTTTCATTA TATCTATGTA CAAGGATTCT CAGCCGCGCG  
 501 550  
 GAATGGCCGT AACTATTTCT GTCAAATGTG AAAAGATATC CACGCTGTCC  
 10 551 600  
 TGTGAGAACA AGATTATTAG TTTCAAAGAG ATGAATCCGC CGGATAATAT  
 601 650  
 CAAGGACACG AAGTCTGATA TCATATTTTT CCAGCGCAGC GTGCCGGGGC  
 651 700  
 15 ACGATAACAA GATGCAATTT GAATCATCCA GCTATGAAGG GTACTTTCTT  
 701 750  
 GCATGCGAGA AGGAACGCGA TCTCTTTAAA CTTATTTTAA AGAAAGAGGA  
 751 800  
 CGAGCTAGGC GATCGCAGCA TTATGTTTAC TGTCCAAAAT GAAGACTAGT  
 20 801 850  
 GGAGGATATA ATACCAGGAA TAAATAAAAT CCATGGGCCA TCATCATCAT  
 851 900  
 CATCATGGCA TGGATGAAAG CAAGATAAAC AGTTTATTAC AATTTTTATT  
 901 950  
 25 TGGTTCCTCGA CAGGATTTTT TGAGAAATTT TAAACTTGG AGTAACAACA  
 951 1000  
 ATAACAATCT ATCGATTTAT TTATTAATTT TTGGCATAGT AGTATTTTTT  
 1001 1050  
 TATAAAAAAC CAGACCATCT AAACACATT GTTGAGAGCG TTAGTGAAAT  
 30 1051 1100  
 GACAACAAAC TTCAGAAATA ATAATAGCCT TAGCCGTTGG TTGCCAGAA  
 1101 1150  
 GTAAGTTTAC CCACTTAGAC GAAGAGATCT TGAAAAGAGG TGGTTTCATT  
 1151 1200  
 35 GCTGGTTTAG TTAATGATGG TAACACTTGT TTTATGAACT CTGTTTTGCA  
 1201 1250  
 ATCATTGGCA TCATCCAGAG AATTAATGGA GTTCTTGGAC AATAATGTCA  
 1251 1300  
 TAAGGACCTA TGAGGAGATA GAACAAAATG AACACAATGA AGAAGGAAAC  
 40 1301 1350  
 GGGCAAGAAT CTGCTCAAGA TGAAGCCACT CATAAGAAA AACTTCGTAA  
 1351 1400  
 GGGTGGCAAA GTTTATGGTA AGCATAAGAA GAAATGAAT AGGAAGTCAA

19/31

1401 \* 1450  
 GTTCGAAAGA AGACGAAGAA AAGAGCCAGG AGCCAGATAT CACTTTCAGT  
 1451 1500  
 5 GTCGCCTTAA GGGATCTACT TTCTGCCTTA AATGCGAAGT APTATCGGGA  
 1501 1550  
 TAAACCCTAT TTCAAAACCA ATAGTTTATT GAAAGCAATG TCCAAATCTC  
 1551 1600  
 CAAGAAAAAA TATTCTTCTT GGCTACGACC AAGAGGACGC GCAAGAATTC  
 1601 1650  
 10 TTCCAGAACA TACTAGCCGA GTTGAAAAGT AACGTAAAT CATTGAATAC  
 1651 1700  
 TGA AAAACTA GATACCACTC CAGTTGCGAA ATCAGAATTA CCCGATGATG  
 1701 1750  
 CTTTAGTAGG TCAACTTAAC CTTGGTGAAG TTGGCACTGT TTACATTCCA  
 1751 1800  
 15 ACTGAACAGA TTGATCCTAA CTCTATACTA CATGACAAGT CCATTCAAAA  
 1801 1850  
 TTTACACCTT TTCAAACTAA TGACTCCTTT AGATGGTATC ACGGCAGAAA  
 1851 1900  
 20 GAATTGGFTG TTTACAGTGT GGTGAGAACG GTGGCATAAG ATATTCGGTA  
 1901 1950  
 TTTTCGGGAT TAAGCTTAAA TTTACCGAAC GAGAATATTG GTTCCACTTT  
 1951 2000  
 AAAATTATCT CAGTTATTGA GCGACTGGAG TAAACCTGAA ATCATCGAAG  
 2001 2050  
 25 TCGTAGAATG TAACCGTTGT GCCCTCACAG CAGCGCACTC TCATTTATTT  
 2051 2100  
 GGTCACTTGA AAGAATTTGA AAAAAACCT GAGGGTTCGA TCCCAGAAAA  
 2101 2150  
 30 GCCAATTAAC GCTGTAAAAG ATAGGGTCCA TCAAATCGAA GAAGTTCTTG  
 2151 2200  
 CCAAACCAGT TATTGACGAT GAAGATTATA AGAAGTTGCA TACAGCAAT  
 2201 2250  
 ATGGTACGTA AATGCTCTAA ATCTAAGCAG ATTTTAATAT CAAGACCTCC  
 2251 2300  
 35 ACCATTATTA TCCATTCATA TCAACAGATC CGTATTTGAT CCAAGAACGT  
 2301 2350  
 ACATGATTAG AAAAAATAAC TCGAAAGTAT TGTTTAAGTC AACGTTGAAT  
 2351 2400  
 40 CTTGCCCTT GGTGTTGTGA TATTAATGAA ATCAATTTGG ATGCTCGTTT  
 2401 2450  
 GCCAATGTCA AAAAAGGAAA AAGCTGCGCA ACAAGATTCA AGTGAAGATG  
 2451 2500

20/31

AAAACAMTGG CGGTGAATAC TATACGAAAT TACATGAACG CTTCGAGCAG  
 2501 2550  
 GAATTTGAAG ACAGCGAGGA AGAAAAAGAA TACGATGACG CAGAGGGGAA  
 2551 2600  
 5 CTATGCGTCT CATTACAATC ATACCAAGGA TATCAGTAAC TATGATCCCC  
 2601 2650  
 TAAACGGTGA AGTCGATGGC GTGACATCCG ATGATGAAGA TGAGTACATT  
 2651 2700  
 GAAGAAACCG ATGCTTTAGG GAATACAATC AAAAAAAGGA TCATAGAACA  
 10 2701 2750  
 TTCTGATGTT GAAAACGAGA ATGTAAAAGA TAATGAAGAA CTGCAAGAAA  
 2751 2800  
 TCGACAATGT GAGCCTTGAC GAACCAAAGA TCAATGTTGA AGATCAACTA  
 2801 2850  
 15 GAAACATCAT CTGATGAGGA AGATGTTATA CCAGCTCCAC CTATCAATTA  
 2851 2900  
 TGCTAGGTCA TTTTCCACAG TTCCAGCCAC TCCATTGACA TATTCATTGC  
 2901 2950  
 GCTCTGTTCAT TGTTCACTAC GGTACCCATA ATTATGGTCA TTACATTGCA  
 20 2951 3000  
 TTTAGAAAAT ACAGGGGTTG TTGGTGGAGA ATATCTGATG AGACTGTGTA  
 3001 3050  
 CGTTGTGGAC GAAGCTGAAG TCCTTTCAAC ACCCGGTGTA TTTATGTTAT  
 3051 3100  
 25 TTTACGAATA TGACTTTGAT GAAGAACTG GGAAGATGAA GGATGATTTG  
 3101 3150  
 GAAGCTATTC AGAGTAATAA TGAAGAAGAT GATGAAAAAG AGCAGGAGCA  
 3151 3200  
 AAAAGGAGTC CAGGAGCCAA AGGAAAAGCA AGAGCAAGGA GAAGGTGAAG  
 30 3201 3250  
 AGCAAGAGGA AGGTCAAGAG CAGATGAAGT TCGAGAGAAC AGAAGACCAT  
 3251 3300  
 AGAGATATTT CTGGTAAAGA TGTAACATA GCTCGAGCAC CACCACCACC  
 3301 3350  
 35 ACCACTGAGA TCCGGCTGCT AACAAAGCCC GAAAGGAAGC TGAGTTGGCT  
 3351 3400  
 GCTGCCACCG CTGAGCAATA ACTAGCATAA CCCCTTGGGG CCTCTAAACG  
 3401 3419  
 GGTCTTGAGG GGTMTTTTG





23/31

Defective Shine-Dalgarno Start of Upb-1

5744 TGTC AAAATGAAGACTAGTggaggatataaTACCAGC aatagg taaaatccatgggcca 5803

5 ACAGGTTTACTTCTGATCACctcctatatattATGGTcCttatttattttaggtaccgggt

5 b V Q N E D \* M G H -

5804 tcatcatcatcatcatcatggcATGGATGAAAGCAAGATAAACAGTTTATTACAATTTTATT 5863

10 agtagtagtagtagtagtaccgTACCTACTTTCGTTCTATTGTCAAATAATGTTAAAAATAA

b H H H H H G M D E S K I N S L L Q F L F -

5864 TGGTCCCGACAGGATTTTTTGAGAAATTTTAAAACCTGGAGTAACAACATAACAATCT 5923

15 ACCAAGGGCTGTCCATAAAAACCTTTTAAAATTTTGAACCTCATGTTGTTATTGTTAGA

b G S R Q D F L R N F K T W S N N N N N L -

5924 ATCGATTATTATTATTAATTTTTGGCATAGTAGTATTTTTTATAAAAAACCAGACCATCT 5983

20 TAGCTAAATAAATAATTA AAAACCGTATCATCAAAAAAATATTTTTTGGTCTGGTAGA

b S I Y L L I F G I V V P F Y K K P D H L -

25 AAACTACATTGTTGAGAGCGTTAGTGAATGACAACAACTTCAGAAATAATAATAGCCT 6043

5984 TTTGATGTAACAACCTCTCGCAATCACTTTACTGTTGTTGAAGTCTTTATTATTATCGGA

30 b N Y I V E S V S E M T T N F R N N N S L -

6044 TAGCCGTTGGTTGCCAGAAAGTAAGTTTACCCACTTAGACGAAGAGATCTTGAAAAGAGG 6103

35 ATCGGCAACCAACGGGTCTTCATTCAAATGGGTGAATCTGCTTCTCTAGAACTTTTCTCC

b S R W L P R S K F T H L D E E I L K R G -

6104 TGGTTTCATTGCTGGTTAGTTAATGATGGTAACACTTGTTTTATGAACTCTGTTTGCA 6163

40 ACCAAAGTAACGACCAAAATCAANTACTACCATTGTGAACAAAATACTTGAGACAAAACGT

b G F I A G L V N D G N T C F M N S V L Q -







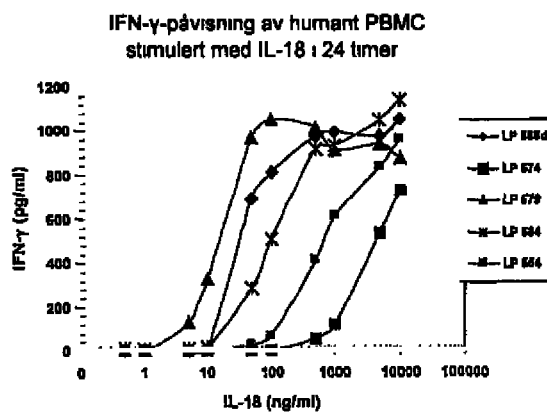






30/31

FIGUR 21



5

### Beskrivelse av ulike humane/murine IL-18-prøver (ulike produksjonsserier/konstruksjoner)

**LP555d (standard) E COLI ICE-SPALTET (*IN VITRO*)**

LP554 E coli murin IL-18 Ice-spaltet (*IN VITRO*)

LP559 E coli-uttrykt modent IL-18 inneholdende N-terminalt metronin

LP574 E coli-uttrykt modent IL-18 inneholdende N-terminalt metronin

LP579 Pichia uttrykt, sekret, modent IL-18

LP584 E coli IL-18/ICE bisitronisk ko-uttrykt (*IN VIVO*)

LP594 E coli ICE-spaltet (*IN VITRO*)

LP613 E coli-caspase-4-spaltet (*IN VITRO*)

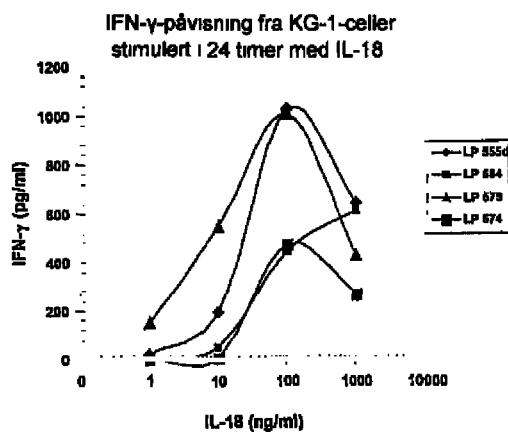
LP614 E coli ICE ko-uttrykt (*IN VITRO*)

LP623 caspase-4 ko-uttrykt (*IN VIVO*)

10

31/31

Figure 22



5

### Beskrivelse av ulike humane/murine IL-18-prøver (ulike produksjonsserier/konstruksjoner)

- LP555d (standard) E COLI ICE-SPALTEI (*IN VITRO*)
- LP554 E coli murin IL-18 Ice-spaltet (*IN VITRO*)
- LP559 E coli-uttrykt modent IL-18 inneholdende N-terminalt metonin
- LP574 E coli-uttrykt modent IL-18 inneholdende N-terminalt metonin
- LP579 Pichia uttrykt, sekret, modent IL-18
- LP584 E coli IL-18/ICE bisstronisk ko-uttrykt (*IN VIVO*)
- LP594 E coli ICE-spaltet (*IN VITRO*)
- LP613 E coli-caspase-4-spaltet (*IN VITRO*)
- LP614 E coli ICE ko-uttrykt (*IN VITRO*)
- LP623 caspase-4 ko-uttrykt (*IN VIVO*)

10

15