

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **11.06.2001**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **15.06.2000 10.08.2000
20.01.2001**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/211832 2000/224128
2001/264923**

(33) Země priority: **US US US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.05.2003**
(Věstník č. 5/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/US01/18804**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/098455**

Část popisu přihlášky se sekvenčním protokolem je zveřejněna
odděleně v počítačově čitelné formě

(21) Číslo dokumentu:

2002 -4085

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 P 21/00

C 12 N 15/00

(71) Přihlašovatel:

SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION,
Philadelphia, PA, US;

(72) Původce:

Johanson Kyung O., King of Prussia, PA, US;
Kirkpatrick Robert B., King of Prussia, PA, US;
Shatzman Allan R., King of Prussia, PA, US;
Ho Yen Sen, Berwyn, PA, US;
McDevitt Patrick, King of Prussia, PA, US;

(74) Zástupce:

Zelený Pavel JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob přípravy fyziologicky aktivního IL-18
polypeptidu**

(57) Anotace:

Způsob produkce fyziologicky aktivního polypeptidu, který
zahrnuje kontaktování prekursoru polypeptidu s aktivačním
enzymem nebo koexpresi polypeptidu s aktivační proteasou.

CZ 2002 - 4085 A3

21.02.03

PV2002-4085

13587

ZPŮSOB PŘÍPRAVY FYZIOLOGICKY AKTIVNÍHO IL-18 POLYPEPTIDU

Oblast techniky

Tento vynález se týká způsobu přípravy fyziologicky aktivního polypeptidu, zejména způsobu přípravy aktivního lidského IL-18.

Dosavadní stav techniky

IL-18, rovněž známý jako interferon-gamma-indukující faktor, je v současnosti nově nalezený cytokin. Aktivní IL-18 obsahuje 157 aminokyselinových zbytků. Má silné biologické aktivity včetně indukce tvorby interferonu gamma T-buňkami a splenocyty, posílení zabíjecí aktivity buněk NK a usnadnění diferenciací nativních T-buněk CD4⁺ na buňky Th1. Navíc lidský IL-18 usnadňuje tvorbu GM-CSF a snižuje tvorbu IL-10. Ukázalo se, že IL-18 má vyšší schopnosti indukovat interferon gamma, než má IL-12 a zdá se, že mají rozdílné receptory a využívají rozdílné cesty přenosu signálu.

IL-18, jeho kódující nukleotidová sekvence a jisté fyzikálně chemické vlastnosti čištěného proteinu jsou známy (Ushio S. a kol., J. Immunology, 156, 4274 až 4279 (1996), Dinarello C. A. a kol., J. Leukocyte Biology, 63, 658 až 664 (1998)).

Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kayaku Kenkyujoŭ ("Hayashibara") US patent č. 5 912 324, který odpovídá EP 0 692 536 publikovanému 17. ledna 1996, popisuje myší protein, který indukuje tvorbu IFN-gamma imunokompetentními buňkami a tento protein je dále charakterizován jako protein s určitými fyzikálně chemickými vlastnostmi a definovanou částečnou aminokyselinovou

sekvencí. Popisuje rovněž protein, který má aminokyselinovou sekvenci se 157 zbytky, její dva fragmenty, DNA (471 bp - párů bazí), která protein kóduje, hybridomy, způsoby čištění proteinu a způsoby detekce proteinu.

Hayashibarův US patent č. 6 214 584, který odpovídá EP 0 712 931, publikovanému 22. května 1996, popisuje lidský protein ze 157 aminokyselinových zbytků a jeho homology, DNA, která tento protein kóduje, transformanty, způsoby přípravy tohoto proteinu, monoklonální protilátky proti tomuto proteinu, hybridomy, způsoby čištění proteinu, způsoby detekce proteinu a způsoby léčení a/nebo prevence maligních tumorů, virových chorob, bakteriálních infekčních chorob a imunitních chorob.

Dokument Incyte Pharmaceuticals, Inc., WO 97/24441, publikovaný 10. června 1997, popisuje protein se 193 aminokyselinovými zbytky, který odpovídá prekursoru IL-18 a příslušnou kódující DNA.

V lidských buňkách mohou být polypeptidy, tvořené exprimací genů, zpracovávány intracelulárními enzymy, přičemž jsou částečně tráveny a získávají cukerné řetězce. Polypeptidy, které lze s úspěchem zahrnout do farmaceutických prostředků, mohou být takové polypeptidy, které se připraví podobně jako v lidských buňkách. Je známo, že většina cytokinů se obvykle tvoří jako prekursory bez biologické aktivity a ty jsou potom zpracovány intracelulárními enzymy tak, že jsou konvertovány na aktivní polypeptidy.

Polypeptid IL-18 obvykle existuje v lidských buňkách ve formě prekursoru o 139 aminokyselinových zbytcích bez jakékoli biologické aktivity. Prekursor IL-18 je rovněž označován jako Pro-IL-18. Jeden způsob produkce

aktivního IL-18 z jeho prekursoru popisuje Hayashibaraův US patent č. 5 879 942, který odpovídá EP 0 819 757, publikovanému 21. ledna 1998. Patent popisuje enzym nebo protein, který konvertuje prekursor IL-18 na aktivní IL-18.

Jiný způsob produkce aktivního IL-18 z jeho prekursoru popisuje Hayashibaraův US patent č. 5 891 663, který odpovídá EP 0 821 005, publikovanému 28. ledna 1998. Patent popisuje kontaktování prekursoru IL-18 s interleukin-1-beta-konvertujícím enzymem ("ICE"). Poznátky těchto patentů a odkazy jsou zde zahrnuty odkazem.

Úloha ICE jako mediátoru apoptózy a zánětu je široce studována v literatuře. Je rovněž známo, že ICE může zpracovávat jak interleukin-1, tak interleukin-18 na aktivní formy (Thornberry N. A. a kol., Nature, 356, 768 až 774 (1992), Ghayur T. a kol., Nature, 386, 619 až 623 (1997)).

Podstata vynálezu

Tento vynález poskytuje způsoby aktivace in vitro prekursoru lidského IL-18 (rovněž známého jako Pro-IL-18) aktivujícím enzymem, které zahrnují kontaktování prekursoru lidského IL-18 s aktivujícím enzymem, jako je kaspasa 4 nebo kaspasa 5. Specifičtěji, tento vynález poskytuje způsob, ve kterém kaspasa 4 a kaspasa 5 působí na prekursor IL-18 tak, že štěpí specifické místo, aby se vytvořil aktivní polypeptid, který indukuje tvorbu IFN-gamma v imunokompetentních buňkách.

Tento vynález dále poskytuje způsoby aktivace in vivo prekursoru lidského IL-18, které zahrnují ko-expresi proteinu s aktivující proteasou. Specifičtěji, tento vynález poskytuje způsoby aktivace in vivo IL-18 za použití proteas, jako je kaspasa 4, rovněž známá jako ICE_{RELII}, kaspasa 5,

rovněž známá jako ICE_{REL}III a proteasa specifická vůči ubikvitinu, které působí na prekursor polypeptidu IL-18 tak, že ho konvertuje na aktivní polypeptid, který indukuje tvorbu IFN-gamma.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 ukazuje aminokyselinovou sekvenci lidského prekursoru IL-18 (SEQ ID NO:1).

Obr. 2 ukazuje sekvenci nukleových kyselin, kódující lidský IL-18 s celou délkou řetězce (SEQ ID NO:2).

Obr. 3 ukazuje aminokyselinovou sekvenci lidského aktivního IL-18 (SEQ ID NO:3).

Obr. 4 ukazuje aminokyselinovou sekvenci N-koncově zkrácené kaspasy 4 se 6-his smyčkou (SEQ ID NO:4).

Obr. 5 ukazuje sekvenci nukleových kyselin, kódující aminokyselinovou sekvenci N-koncově zkrácené kaspasy 4 se 6-his smyčkou (SEQ ID NO:5).

Obr. 6 ukazuje aminokyselinovou sekvenci N-koncově zkrácené kaspasy 5 se 6-his smyčkou (SEQ ID NO:4).

Obr. 7 ukazuje sekvenci nukleových kyselin, kódující aminokyselinovou sekvenci N-koncově zkrácené kaspasy 5 se 6-his smyčkou (SEQ ID NO:7).

Obr. 8 je schematický diagram bicistronické expresní kazety, obsažené v rámci pET28-Pro-IL-18/kaspasy 4 pro ko-expresi Pro-IL-18 a zkrácené kaspasy 4 v E. coli.

Obr. 9 ukazuje sekvenci expresní kazety

Pro-IL-18/kaspasy 4 v rámci pET28 (SEQ ID NO:8).

Obr. 10 ukazuje anotovanou sekvenci expresní kazety Pro-IL-18/kaspasy 4. Číslování odpovídá pozicím v rámci vektoru pET28a.

Obr. 11 ukazuje indukci Pro-IL-18/kaspasy 4.

Obr. 12 je schematický diagram bicistronické expresní kazety, obsažené v rámci pET28-Pro-IL-18/zkrácené kaspasy 5 pro ko-expresi Pro-IL-18 a kaspasy 5 v E. coli.

Obr. 13 ukazuje sekvenci expresní kazety Pro-IL-18/kaspasy 5 v rámci pET28 (SEQ ID NO:9).

Obr. 14 ukazuje anotovanou sekvenci expresní kazety Pro-IL-18/zkrácené kaspasy 5 s vyznačením znaků regulatorní sekvence a translace Pro-IL-18 a zkrácené kaspasy 5. Číslování odpovídá pozicím v rámci vektoru pET28a.

Obr. 15 ukazuje indukci Pro-IL-18/kaspasy 5.

Obr. 16 ukazuje aminokyselinovou sekvenci Ub-IL-18 (SEQ ID NO:10).

Obr. 17 ukazuje sekvenci nukleových kyselin, kódující aminokyselinovou sekvenci Ub-IL-18 (SEQ ID NO:11).

Obr. 18 ukazuje sekvenci nukleových kyselin expresní kazety Ub-IL-18/Ubp-1 v rámci vektoru pET28 (SEQ ID NO:12).

Obr. 19 ukazuje anotovanou sekvenci Ub-IL-18/Ubp-1 v rámci vektoru pET28. Číslování odpovídá pozicím v rámci pET28.

Obr. 20 ukazuje expresi a zpracování Ub-IL-18 pomocí Ubp-1.

Obr. 21 ukazuje zkoušku aktivity za použití buněk KG-1 (lidské myelomonocytární buněčné linie) pro monitorování tvorby IFN-gamma (IL-18 exprimovaná různými způsoby, jak je označeno).

Obr. 22 ukazuje zkoušku aktivity za použití čištěných lidských PBMCs, aby se monitorovala tvorba IFN-gamma (IL-18 exprimovaná různými způsoby, jak je označeno).

Podrobný popis vynálezu

Kaspasa 4 a 5 jsou členy rodiny cysteinových proteas, která zahrnuje interleukin-1-beta-konvertující enzym (ICE) a tyto proteasy výhodně štěpí substráty, obsahující motiv proteasové aktivace, zahrnující aminokyselinovou sekvenci XEYD, ve které je X zvoleno ze skupiny aminokyselin, sestávající z W, L, F, Y, I, V, D nebo E, E je glutamová kyselina, Y je zvoleno ze skupiny aminokyselin, sestávající z H, I, A, T, S, P nebo E a D je asparagová kyselina (Munday N. A. a kol., J. Biol. Chemistry, 270, 15870 až 15876 (1995), Talanian R. V. a kol., J. Biol. Chemistry, 272, 9677 až 9682 (1997), Thornberry N. A. a kol., J. Biol. Chemistry, 272, 17907 až 17911 (1997)). Předpokládá se, že rozpoznání substrátu kaspasou 5 je v zásadě stejné jako u ICE a kaspasy 4 a liší se od ostatních členů kaspas (Talanian R. V. a kol., J. Biol. Chemistry, 272, 9677 až 9682 (1997), Thornberry N. A. a kol., J. Biol. Chemistry, 272, 17907 až 17911 (1997)). Kaspasa 4 je popsána v EP-B-0 754 234. Kaspasa 5 je popsána v US patentech 5 552 536 a 5 760 180.

Proteasy specifické na ubiquitin jsou rodinou enzymů, nezávislých na ATP, které mohou přesně štěpit vývojově

zachovaný ubikvitinový peptid se 76 aminokyselinami od N-konce proteinů, ke kterým je fuzován. Tyto proteasy specificky štěpí peptidovou vazbu mezi aminokyselinovým zbytkem na karboxylovém konci ubikvitinového proteinu a alfa-aminoskupinou jakéhokoli neubikvitinového proteinu, se kterým je ubikvitin spojen. Proteasy specifické vůči ubikvitinu ze *Saccharomyces cerevisiae*, Ubp-1, Ubp-2 a Ubp-3 jsou například známy a mohou být rekombinantně exprimovány, aby katalyzovaly jak *in vivo*, tak *in vitro* reakce deubikvitinace, které jsou zacíleny na ubikvitinové fuzní proteiny (Baker R. T. a kol., *J. Biol. Chem.*, 267, 23364 až 23375 (1992), Baker R. T. a kol., *J. Biol. Chem.*, 269, 25381 až 25386 (1994)). Specifita proteas specifických vůči ubikvitinu ze *Saccharomyces cerevisiae* umožňuje přesné odstranění ubikvitinu z jakéhokoli peptidu s výjimkou těch peptidů, které začínají prolinem. Proteasy specifické vůči ubikvitinu z jiných druhů, jako je myší Unp a její lidský homolog Unph jsou schopny účinného štěpení dokonce i před prolinem (Gilchrist C. A. a kol., *J. Biol. Chem.*, 272, 32280 až 32285 (1997)). Takto lze prakticky připravit jakýkoli požadovaný N-konec prostřednictvím odstranění přesně fuzovaného ubikvitinového peptidu, pokud se kombinuje *in vitro* nebo je koexprimován s proteasou specifickou vůči ubikvitinu. Proteasy specifické vůči ubikvitinu jsou popsány v US patentech 5 212 058, 5 683 904, 5 391 490 a 5 494 818.

Jakoukoli přírodní nebo uměle produkovanou kaspasu 4, kaspasu 5 nebo ubikvitinovou proteasu lze použít v tomto vynálezu, pokud tvoří aktivní polypeptidy, které indukují tvorbu IFN-gamma v imunokompetentních buňkách, bez ohledu na její strukturu, zdroj nebo původ.

V lidských buňkách mohou být polypeptidy, tvořené expresí genů, zpracovány intracelulárními enzymy. Intracelulární enzymy štěpí prekursory proteinů, jako je

Pro-IL-18, na jejich aktivní formy. Aby mohly být polypeptidy s úspěchem začleněny do farmaceutických prostředků, měly by se zpracovat podobně, jako se zpracovávají v lidských buňkách. Polypeptidy obvykle existují v lidských buňkách ve formě prekursoru a nemají žádnou biologickou aktivitu. Je známo, že mnoho cytokinů, včetně polypeptidu IL-18, je obvykle tvořeno jako prekursory bez jakékoli biologické aktivity a potom jsou zpracovány intracelulárními enzymy tak, že jsou konvertovány na aktivní polypeptidy.

Prekursor IL-18, jak se označuje v tomto patentu, například v buňkách, které vrozeně tvoří daný polypeptid, v savcích hostitelských buňkách a v bakteriálním systému, jako je *E. coli*, transformovaném zavedením DNA, například DNA s nukleotidovou sekvencí v SEQ ID NO:2, která obsahuje region, který kóduje polypeptid. Za použití takových savcích a bakteriálních hostitelských buněk může být prekursor IL-18 koexprimován s proteasami, aby se vytvořil aktivní IL-18.

Štěpení in vitro

Tento vynález poskytuje způsoby aktivace in vitro prekursoru polypeptidu, jako je prekursor IL-18 zahrnující kontaktování prekursoru polypeptidu s aktivujícím enzymem.

Ve výhodném ztělesnění tento vynález poskytuje způsob aktivace in vitro prekursoru lidského IL-18, který zahrnuje kontaktování prekursoru lidského IL-18 s kaspasou 4 nebo kaspasou 5.

Ve výhodném ztělesnění se prekursor IL-18 aktivuje in vitro štěpením s aktivujícím enzymem, který rozpozná specifický motiv proteasové aktivace, zahrnující aminokyselinovou sekvenci XEYD, ve které je X zvoleno ze

skupiny aminokyselin, sestávající z W, L, F, Y, I, V, D nebo E a Y je zvoleno ze skupiny aminokyselin, sestávající z H, I, A, T, S, P nebo E.

V dalším výhodném ztělesnění se prekursor IL-18 aktivuje in vitro štěpením peptidové vazby mezi asparagovou kyselinou 36 a tyrosinem 37 v SEQ ID NO:1 pomocí kaspasy 4 nebo kaspasy 5, aby se tvořil aktivní polypeptid, který indukuje tvorbu IFN-gamma v imunokompetentních buňkách.

Obecně lze kaspasu 4 nebo kaspasu 5 získat z buněk, které je vrozeně tvoří a z transformantů, získaných použitím způsobu rekombinantní DNA. Příklady takových buněk jsou ty buňky, které se získají ze savčích a lidských buněk, jako jsou epiteliální buňky, endoteliální buňky, intersticiální buňky, chrupavkové buňky, monocyty, granulocyty, lymfocyty a jejich založené buněčné linie. Příklady transformantů zahrnují transformované mikroorganismy a zvířecí buňky, získané zavedením DNA kódující kaspasu 5 do mikroorganismů a zvířecích buněk. Kaspasa 4 nebo kaspasa 5 se připraví kultivací těchto transformantů v obvyklém kultivačním mediu, které se používá v této oblasti, buď jejich ošetřením ultrazvukem ve formě intaktních kultur nebo po jejich separaci z kultury anebo louhováním transformantů v hypotonických rozpouštědlech, po čemž se odpad zbylých buněk nebo směsi, obsahující supernatanty kultury a buněčný odpad, vystaví působení následujících obvyklých způsobů, v této oblasti používaných pro čištění enzymů: vysolení, dialýze, filtraci, zahuštění, sepační sedimentaci, iontové výměnné chromatografii, gelové filtrační chromatografii, adsorpční chromatografii, isoelektrické chromatografii, hydrofobní chromatografii, chromatografii na reversní fázi, afinitní chromatografii, gelové elektroforéze a elektrofokingu. Lze použít dva nebo více těchto způsobů čištění v kombinaci. DNA kódující kaspasu 4 (obr. 5) (SEQ ID NO:5) a kaspasu 5 (obr.

7) (SEQ ID NO:7) a transformanty, které produkují kaspasu 4 a kaspasu 5 jsou známy v oboru. Například mohou být tyto enzymy produkovány v aktivní formě v *E. coli* expresí peptidů, zkrácených na N-konci, kterým chybí pro region, jak popisuje Munday N. A. a kol., *J. Biol. Chem.*, 26, 15870 až 15876 (1996).

Buňky, které tvoří prekursorový polypeptid, jako je Pro-IL-18, vrozeně nebo ty buňky, které byly transformovány, aby produkovaly prekursor, se kultivují v nutričním kultivačním mediu. Výhodná kultivační media zahrnují kultivační media dobře známá v oboru, jako je medium Luria-Bertaniovo nebo jiné bohaté kultivační medium pro kultivaci *E. coli*, zahrnující trypton a kvasnicový extrakt.

Kaspasa 4 nebo kaspasa 5, získaná za použití způsobu, popsaného výše, může současně existovat ve výsledných kulturách nebo se může přidat do vznikajících směsí nebo buněčné debris po rozbití proliferujících buněk, separovaných nebo neseparovaných od kultur. Požadované množství kaspasy 4 nebo kaspasy 5 je menší, než je ekvimolární s množstvím prekursoru. Kaspasa 4 nebo kaspasa 5 se uvede do kontaktu s prekursorem při teplotě a pH, které umožňují, aby kaspasa 4 nebo kaspasa 5 působila na prekursor, obvykle může kaspasa 4 nebo kaspasa 5 reagovat s prekursorem, až se vytvoří požadované množství aktivního polypeptidu z prekursoru při teplotách asi 4 až 40 °C a hodnotách pH asi 6 až 9. Výhodná teplota je asi 25 °C a výhodné pH je asi 7,2. Takto lze získat reakční směsi, které obsahují aktivní polypeptid.

Aktivitu kaspasy 4 nebo kaspasy 5 lze zkoušet a vyjadřovat pomocí jednotek aktivity podle μg zreagovaného polypeptidu, vytvořeného na μg kaspasy 4 nebo kaspasy 5 za minutu.

Koexprese in vivo

Tento vynález dále poskytuje způsoby aktivace prekursoru polypeptidu, jako je prekursor IL-18, in vivo, které zahrnují koexpresi proteinu s aktivující proteasou. Specifičtější tento vynález poskytuje způsoby aktivace IL-18, které zahrnují bicistronickou koexpresi polypeptidů, jako je IL-18 s proteasou, jako je kaspasa 4, rovněž známá jako ICE_{REL}II, kaspasa 5, rovněž známá jako ICE_{REL}III a ubikvitin.

Ve výhodném ztělesnění je lidská kaspasa 4, rovněž známá jako ICE_{REL}II koexprimována bicistronicky s lidským Pro-IL-18, aby se in vivo přeměnil Pro-IL-18 na aktivní IL-18.

V dalším výhodném ztělesnění je zkrácená lidská kaspasa 4 (SEQ ID NO:4) koexprimována bicistronicky s lidským Pro-IL-18, aby se in vivo přeměnil Pro-IL-18 (SEQ ID NO:1) na aktivní IL-18 (SEQ ID NO:3).

V dalším výhodném ztělesnění je lidská kaspasa 5, rovněž známá jako ICE_{REL}III koexprimována bicistronicky s lidským Pro-IL-18, aby se in vivo přeměnil Pro-IL-18 na aktivní IL-18 (SEQ ID NO:3).

V dalším výhodném ztělesnění je ubikvitinová proteasa 1 (Ubp-1) koexprimována bicistronicky s Ubikvitin-IL-18 (Ubp-IL-18), aby se in vivo přeměnil Ub-IL-18 na aktivní IL-18.

V dalším výhodném ztělesnění je ubikvitinová proteasa 1 (Ubp-1) koexprimována bicistronicky s Ubikvitin-IL-18 (Ubp-IL-18), aby se in vivo přeměnil Ub-IL-18 (SEQ ID NO:9)

na aktivní IL-18 (SEQ ID NO:3).

V nejvýhodnějším ztělesnění je zkrácená lidská kaspasa 5 (SEQ ID NO:5) koexprimována bicistronicky s lidským Pro-IL-18, aby se in vivo přeměnil Pro-IL-18 (SEQ ID NO:1) na aktivní IL-18 (SEQ ID NO:3).

DNA, kódující kaspasu 4 nebo kaspasu 5 a DNA, kódující prekursor polypeptidu se obě zavádějí do vhodné bakteriální nebo savčí hostitelské buňky, aby jí transformovaly. V tomto případě působí kaspasa 4 nebo kaspasa 5, vytvořená expresí DNA, na prekursor polypeptidu, který se vytváří expresí DNA ve stejném transformantu, aby se vytvořil aktivní polypeptid (obr. 11 a 15). Výhodnými hostitelskými buňkami jsou epidermální, intersticiální, neuroblastové a hematopoetické buněčné linie, odvozené z lidských, opičích, myších a křeččích buněk a používané obvykle jako hostitelské buňky, jako jsou 3T3 buňky, včetně buněk 3T3-Swiss albino (ATCC CCL 92), buněk C1271 (ATCC CRL 1616), buňky CHO, včetně buněk CHO-K1 (ATCC CCL 61), buněk CV-1 (ATCC CCL 70), buněk COS, včetně buněk COS-1 (ATCC CCL 1950), buněk HeLa (ATCC CCL 2), buněk MOP, včetně buněk MOP-8 (ATCC CRL 1709) a jejich mutantů. Velmi výhodnými hostitelskými buňkami jsou E. coli. Nejvýhodnějším způsobem zavedení DNA, kódující kaspasu 4 nebo 5 a DNA, kódující prekursor polypeptidu do E. coli je chemická transformace s chloridem rubidia, která je dobře známá v oboru. Způsoby zavedení DNA, kódující kaspasu 4 nebo kaspasu 5 a DNA, kódující prekursor polypeptidu do savčích hostitelských buněk zahrnují běžný DEAE-dextranový způsob, způsob kyseliny fosforečné a vápníku, elektroporaci, lipofekci, mikroinjekci a způsoby virové infekce, které využívají retrovirus, adenovirus, herpesvirus a virus vakcinie. V tomto případě lze použít vektory, jako je pCD, pCDL-SRalfa, pKY4, pCDM8, pCEV4, pME18S a pSV2-gpt, včetně vhodných promotorů, enhancerů, výchozích bodů replikace,

míst terminace, spojovacích sekvencí, polyadenylačních sekvencí a/nebo markerů pro selekci ve standardních způsobech, které jsou popsány Ausubelem F. M. a kol., Current Protocols in Molecular Biology, New York, Greene Publishing Assoc. a Wiley Interscience (1994). Klony, u nichž se pomocí imunologické detekce zjistilo, že produkují aktivovaný polypeptid, se selektují zvolením vhodného klonu z transformantů po kultivaci v nutričním kultivačním mediu. Kultury obsahující aktivní polypeptid lze získat kultivací klonovaných transformantů s běžnou nutriční kulturou, která se používá v této oblasti. Jak buňky, které vrozeně vytvářejí prekursor polypeptidu tak další buňky, které byly transformovány, aby vytvářely tento polypeptid, mohou vytvářet prekursor spolu s aktivujícími enzymy, které aktivují polypeptid, jako je kaspasa 4, kaspasa 5 a ubikvitin. Způsoby rekombinantní DNA, využívající savčí hostitelské buňky, jsou popsány podrobně Glutzmanem, Cell, 23, 175 (1981) a Mullinganem, PNAS, 72, 2072 (1981). Způsoby rekombinantní DNA, využívající bakteriální hostitelské buňky, jsou popsány v Protein Expression: A Practical Approach, Higgins S. J. a Hames B. D. (vyd.), New York, Oxford University Press (1999).

Zatímco reakční směsi a kultury, obsahující aktivní IL-18 polypeptid lze použít intaktní jako induktory IFN-gamma, ve výhodném ztělesnění se buňky v kulturách poškozují ultrazvukem, buněčnými lyzujícími enzymy a/nebo surfaktanty, po čemž následuje separace polypeptidu ze vzniklých buněk a buněčné debris pomocí filtrace, centrifugace atd., po čemž následují standardní průmyslové procesy, které jsou popsány v Protein Purification: Principles and Practice, Cantor C. R. (vyd.), New York, Springer-Verlag (1993). Polypeptid, zbavený buněk a buněčné debris, lze čistit běžnými způsoby čištění, které se používají k čištění biologicky aktivních látek v této

oblasti, například vysolením, dialýzou, filtrací, zahuštěním, separační sedimentací, iontově výměnnou chromatografií, gelovou filtrační chromatografií, adsorpční chromatografií, isoelektrickou chromatografií, hydrofobní chromatografií, chromatografií na reversní fázi, afinitní chromatografií, gelovou elektroforézou a elektrofoking. Je-li to zapotřebí, lze použít dva nebo více těchto způsobů čištění v kombinaci. Výsledný čištěný polypeptid lze zahustit a lyofilizovat na kapalný nebo pevný produkt s ohledem na jeho konečné použití.

Bicistronické expresní kazety podle tohoto vynálezu jsou univerzálními vektory, které lze použít pro získání prakticky jakéhokoli peptidu, který obsahuje vhodná místa pro rozpoznání štěpení kaspasou 4/ kaspasou 5 nebo ubikvitinem, jak bylo dříve popsáno (Tobias J. W. a kol., *Journal of Biological Chemistry*, 266(18), 12021 až 12028 (1991), Talanian R. V. a kol., *Journal of Biological Chemistry*, 272(15), 9677 až 9682 (1997)). Bicistronická exprese poskytuje výhody oproti koexpresním strategiím, protože oba geny se vážou ke stejné transkripční jednotce, což zajišťuje stálou expresi obou genů v průběhu doby. To je v protikladu k duálním plasmidovým systémům, kde jeden plasmid může v průběhu doby zaniknout, nebo k jednoduchým plasmidovým systémům duálních promotorů, kde se exprese může lišit u každého promotoru od jednoho pokusu k druhému. Zejména jsou bicistronické expresní systémy, které jsou zde popsány, ideálně vhodné pro in vivo aktivaci enzymů, cytokinů, růstových faktorů a dalších proteolyticky aktivovatelných proteinů, což umožňuje širokou škálu tvorby takových proteinů buňkami v jednom kroku a eliminuje nutnost odděleného kroku aktivace in vitro.

Aktivující proteasy, kaspasa 4 (Ala105 až Asn377) nebo kaspasa 5 (Ile146 až Asn418) se subklonují jako N-koncové

6-His fuze, které následují ihned po sekvenci Pro-IL-18, aby se dosáhlo transkripční fuze obou genů. T7 koncová sekvence je umístěna od konce sekvence kaspasy 4 pro translační zakončení bicistronické transkripční jednotky. Malý intergenní region včetně defektní Shine-Dalgarnovy sekvence se rovněž přidá, aby se umožnila pouze minimální iniciace translace od sekvence kaspasy 4 (obr. 10 a 14). další regulatorní regiony zahrnují 25 párů bazí lac operátorové sekvence umístěné ihned od konce promotorového regionu se 17 bazemi, který je vázán lac represorem, kódovaným kopií lac-I genu umístěné na plasmidu, což snižuje bazální transkripci v nepřítomnosti T7 RNA polymerasy. Vzniklé plasmidy, označované jako ProIL18/kasp4 a ProIL18/kasp5 se potom odděleně transfektují do kmenu E. coli BL21 (DE3), který obsahuje induktabilní chromozomální kopii genu T7 polymerasy.

Transkripce bicistronické kazety je podřízena promotoru T7, který je kontrolován fágovým T7 RNA polymerasovým proteinem, kódovaným lysogenickou kopií T7 RNA polymerasového genu. Tato chromosomální kopie T7 polymerasy je sama pod kontrolou lacUV5 promotoru, indukovatelného přidáním isopropyl-1-thio- β -D-galaktopyranosidu. Indukce vede ke koordinaci transkripce a translace Pro-IL-18 a His-kaspasy-4 nebo His-kaspasy-5. Kaspasa 4 nebo kaspasa 5, která je po translaci ve stavu vzniku, se samozpracovává na aktivní formu, která iniciuje proteolytickou aktivaci Pro-IL-18. Jak prekursor IL-18 po translaci, tak i posttranslačně aktivovaný IL-18 je převážně rozpustný uvnitř E. coli. Konečný aktivní IL-18, obsahující N-koncový tyrosin se čistí po indukci přímo z lyzátů bakteriálních buněk běžnými chromatografickými zúsoby. Štěpení na zralý IL-18 kaspasou 4 je úplné za 4 hodiny při 37 °C nebo za 18 hodin při 29 °C (obr. 11) a štěpení na zralý IL-18 kaspasou 5 je úplné za 18 hodiny při 29 °C (obr. 15).

V nejvýhodnějším ztělesnění používá tento vynález zkrácenou kaspasu 4, jak ji ukazuje obr. 4 (SEQ ID NO:4 a SEQ ID NO:5) nebo zkrácenou kaspasu 5, jak ji ukazuje obr. 5 (SEQ ID NO:6 a SEQ ID NO:7). Zkrácení kaspasy 4 a kaspasy 5 je popsáno Mundayem N. A. a kol., J. Biol. Chemistry, 270, 15870 až 15876 (1995).

Tento vynález dále poskytuje způsob tvorby aktivního polypeptidu koexpresí proteasy specifické vůči ubikvitinu s fuzním N-koncovým ubikvitin IL-18 (prekursor), který se přemění na aktivní IL-18 aktivitou C-koncové hydrolasy ubikvitinu. Protein ubikvitin se 76 aminokyselinami obsahující původní N-koncový tyrosin se fuzuje s původním N-koncem lidského IL-18 a koexprimuje s proteasou specifickou vůči ubikvitinu v E. coli například tak, jak ukazují sekvence SEQ ID NO:10 a SEQ ID NO:11. Ubikvitin je vysoce zachovaný protein se 76 aminokyselinovými zbytky, který se nachází v eukaryotických buňkách, které značí proteiny k degradaci (Baker R. T., Current Opinion in Biotechnology, 7(5), 541 až 546 (1996)). Ubikvitin se specificky štěpí od proteinů působením proteas specifických vůči ubikvitinu, které jsou endogenně exprimovány v eukaryotických buňkách, ale které nejsou přítomny u bakterií. Koexprese proteinů fuzovaných s ubikvitinem s proteasou specifickou vůči ubikvitinu v E. coli rovněž vede k účinnému odstranění ubikvitinu (Baker R. T. a kol., Journal of Biological Chemistry, 267(32), 23364 až 23375 (1992)) (obr. 20). Navíc je většina z těchto deubikvitinujících enzymů schopna štěpení před prakticky každou aminokyselinou s výjimkou prolinu. Tak je možné štěpení ubikvitinu z původního IL-18 bez ohledu na přítomnost velkého aromatického tyrosinového zbytku v poloze P1'.

Koexprese ubikvitin-IL-18 (Ub-IL-18) a ubikvitinové proteasy 1 (Ubp-1) (Tobias J. W. a kol., Journal of Biological Chemistry, 266(18), 12021 až 12028 (1991)) se uskutečňuje prostřednictvím bicistronické exprese obou genů za kontroly induktabilního T7 promotoru. Konečný IL-18 se exprimuje jako N-koncový fuzní protein s vývojově zachovaným 76-ti aminokyselinovým peptidem ubikvitinem. Ub-IL-18 cDNA se subklonuje za kontroly T7 RNA polymerasového promotoru v rámci vektoru pET28a. Následně se cDNA, kódující proteasu specifickou vůči ubikvitinu, která má plnou délku řetězce, subklonuje od konce před T7 terminátorovou sekvencí (obr. 19). Jak cDNA Ub-IL-18, tak cDNA proteasy specifické vůči ubikvitinu se transkribují do jednoduchého mRNA transkriptu, ze kterého dojde k translaci odděleně proteinů Ub-IL-18 a proteasy, specifické vůči ubikvitinu.

Jak je popsáno výše, aktivní lidský polypeptid IL-18, získaný uvedenými způsoby, vykazuje aktivitu indukující produkci IFN-gamma jako užitečné biologicky aktivní látky, stimuluje produkci IFNg u buněk KG-1 (lidské myelomonocytární buněčné linie) (obr. 21) a čištěných lidských PBMCs (obr. 22).

Všechny publikace a patenty jsou zde zahrnuty odkazem. Následující příklady dále vysvětlují tento vynález, ale neomezují jeho rozsah.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Příprava prekursoru IL-18 (pro-IL-18)

Lidský prekursor IL-18 se exprimuje jako N-koncový

fuzní protein se smyčkou s šesti histidiny v *E. coli*.
 Expresní plasmid, ProEx-hIL18 je odvozen od vektoru
 pPROEX-1 (Life Technologies), obsahujícího Trc promotor
 a IacIq pro induktabilní expresi s isopropyl-1-thio-beta-D-
 galaktopyranosid (IPTG). Aby se vytvořil rekombinantní
 expresní vektor, fragment DNA obsahující úplný gen
 prekursoru kaspasy 5 se amplifikuje pomocí PCR z klonu cDNA,
 zakončeného 5' Nde a 3' Bam HI restričními endonukleasovými
 místy. Amplifikovaný produkt se subklonuje mezi tyto dvě
 restriční místa na pPROEX, čímž vznikne v rámci N-konce
 fuze s šestihistidinovou kódující sekvencí přítomnou ve
 vektoru.

Výsledný plasmid se exprimuje v DH10B hostitelských
 buňkách po indukci 1mM IPTG po dobu 5 hodin při teplotě 37
 °C. Rekombinantní protein se zachytí z buněčných pelet,
 které se získají po centrifugaci indukovaných kultur.

Příklad 2

Čištění pro-IL-18

1,5 kg buněk *E. coli*, které exprimují pro-IL-18, jak
 je popsáno v příkladu 1, se suspenduje v 3,6 l lýzového
 pufru C (50 mM Tris HCl, 10 mM BME, 0,5 M NaCl, 5%
 glycerol, 1 µg na ml pepstatinu A, 1 µg na ml leupepsinu,
 0,4 mM AEBSF), lyzuje dvěma průchody přes Microfluidics při
 82,74 MPa, centrifuguje při 28000 xg a shromáždí se 3,7 l
 supernatantu. Do supernatantu se přidá 600 ml NiNTA agarosy,
 předem vyvážené puftrem, obsahujícím 5 mM imidazolu (pufr D)
 a suspenze se inkubuje po dobu 1 hodiny, aby se zachytil
 pro-IL-18. Suspenze se centrifuguje při nízkých otáčkách (50
 otáček za sekundu), supernatant se slije a suspenze se
 natáhne do sloupce. Sloupec se promyje puftrem D a pro-IL-18
 se eluuje 300mM imidazolem v pufru C. Eluát se dialyzuje

pufrem E (25 mM HEPES, 10 mM BME, pH 8,0) a natáhne do sloupce DEAE ToyoPearl 650M, předem vyváženého stejným pufrem. Sloupec se eluuje lineárním gradientem 0 až 0,5M chloridem sodným v pufru E. Eluát obsahuje 650 mg pro-IL-18 s více než 90% čistotou.

Příklad 3

Příprava kaspasy 4

Lidská kaspasa 4 je rovněž exprimována jako fuzní protein s šestihistidinovou smyčkou na N-konci v *E. coli*. Expresní plasmid, pET16b-kaspasa-4, se odvodí od vektoru pET16b (Novagen), který obsahuje fágový T7 promotor. Rekombinantní vektor se konstruuje PCR amplifikací aktivní domény kaspasy 4 (aminokyseliny Ile146 až Asn418) zahrnutím kódující sekvence pro šest histidinů na N-konci a zakončením Nco I a Xho I restrikčními endonukleasovými místy. Výsledný produkt PCR se potom subklonuje mezi tato dvě restrikční místa, aby se vytvořil fuzní vektor kaspasy 4 se šesti histidiny na N-konci.

Výsledný plasmid se transformuje do lysogenního kmenu *E. coli* BL21 DE3, obsahujícího chromozomální kopii T7 RNA polymerasy za kontroly promotoru lacUV5, což umožňuje induktabilní expresi kaspasy 4 po indukci 1mM IPTG. Aktivní protein se čistí z buněčných pelet izolovaných po indukci při teplotě 37 °C po dobu 3 h.

Příklad 4

Čištění kaspasy 4

Když jsou lyzovány buňky *E. coli* exprimující lidskou kaspasu 4 se šestihistidinovou smyčkou na N-konci, popsanou

v příkladu 2, lze detekovat aktivitu kaspasy 4 v lyzáto­vém supernatantu. Potom, co se protein zachytí ze supernatantu na NiNTA agarosových kuličkách, získá se znovu jak p10, tak p20. To ukazuje, že proteasová doména kaspasy 4 je aktivována v buněčné kultuře prostřednictvím samoštěpení na spojení p10 a p20 a zůstává jako rozpustný nekovalentní heterodimer. Se znalostí této informace lze heterodimer p10/p20 se smyčkou se šesti histidiny čistit. Vlastní proces se uskutečňuje při teplotě 4 °C, aby se zabránilo jakémukoli dalšímu poškození molekuly.

Asi 400 g vlhkých buněčných pelet *E. coli* se suspenduje v 1,6 l lýzového pufru obsahujícího 25 mM HEPES, 0,1% CHAPS, 500 mM NaCl, 10 mM beta-merkapt ethanolu (BME) při pH 7,4 a 10% glycerol (pufr A) a lýzuje dvěma průchody přes Microfluidics při 82,74 MPa. Lyzát se centrifuguje při 30000 xg po dobu jedné hodiny a dostane se 1,7 l lyzáto­vého supernatantu. Do lyzáto­vého supernatantu se přidá 150 ml NiNTA agarosy, která byla předem vyvážena lyzáto­vým pufrem obsahujícím 5mM imidazol, pH suspenze se upraví na hodnotu 8,0 pomocí 2N hydroxidu sodného a kaspasa 4 se absorbuje várkovým způsobem po dobu 1 h. NiNTA agarosa se vloží do sloupce, promyje 5mM a 25mM imidazolem v pufru A sekvenčně, aby se odstranily nečistoty a kaspasa 4 se eluuje 300mM imidazolem v pufru A. Protein se dialyzuje proti pufru B (25 mM HEPES, 0,1 % CHAPS, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 10 mM BME, pH 8,0) a natáhne do sloupce DEAE ToyoPearl 650M, předem vyváženého stejným pufrem. Kaspasa 4 se eluuje ze sloupce 100mM chloridu sodného ve stejném pufru. Frakce vykazující nejvyšší specifickou aktivitu kaspasy 4 za použití fluorescenčního peptidového substrátu LEED-AMC se shromáždí.

Příklad 5

Aktivace a příprava polypeptidu in vitro

Pro-IL-18 čištěný, jak je popsáno v příkladu 2, se inkubuje s kaspasou 4 v poměru hmotností 1:500 po dobu 3 h při teplotě místnosti. Štěpná reakce prodomény se uskuteční z více než 90 % podle analýzy SDS-PAGE. Do reakční směsi se přidá 140 ml NiNTA agarosy v pufru D, inkubuje po dobu 1 h a vylije na nálevku se skleněným sintrem, aby se získal zpět nenavázaný materiál obsahující převážně zralý IL-18. Malá množství zbylého pro-IL-18, prodomény, kaspasy 4 a jiné nečistoty se vážou na NiNTA agarosu. Nenavázaný roztok se adjustuje do 25mM DTT, inkubuje po dobu 1 h, aby se dokončila redukční reakce, pH roztoku se upraví na hodnotu 6,0 přidáním 2M kyseliny fosforečné a zahustí na objem 86 ml zapoužití membrány YM10. Zahuštěný vzorek se natáhne na sloupec Superdex 75 předem vyvážený 10mM fosforečnanem sodným o pH 6,0 obsahujícím 0,1M chlorid sodný. Spojené frakce obsahují 560 mg zralého IL-18.

Příklad 6

Aktivace a příprava polypeptidu in vivo

Aktivace IL-18 lze rovněž dosáhnout in vivo pomocí současné exprese lidského prekursoru IL-18 a kaspasy 4. Pro-IL-18 je koexprimován bicistronicky v *E. coli* z jednoduchého transkriptu s lidskou kaspasou 4 v rámci expresního plasmidu pET28-pro-IL-18/kasp4 (obr. 5 a 6). Lidský gen pro-IL-18 se subklonuje do pET28a (Novagen) za kontroly T7 promotoru včetně účinné Shine-Dalgarnovy sekvence pro optimální iniciaci translace od pro-IL-18 sekvence (obr. 18). Gen kaspasy 4 (Ile146 až Asn418) se subklonuje okamžitě za sekvenci pro-IL-18 včetně účinné Shine-Dalgarnovy sekvence, což zajišťuje minimální iniciaci translace ze sekvence kaspasy 4. T7 terminační sekvence se

začlení pro ukončení translace za bicistronickou transkripční jednotku. Výsledný konstrukt se potom podrobí transfekci do BL21(DE3) hostitele, obsahujícího induktabilní chromozomální kopii T7 polymerasového genu. Indukce tohoto konstruktu v tomto hostiteli pomocí 1mM IPTG má za následek koordinaci transkripce a translace pro-IL-18 a pro-kaspasy 4. Translací nově vznikající pro-kaspasy 4 je sama přeměňována na aktivní enzym, který iniciuje proteolytickou aktivaci pro-IL-18. Obr. 8 ukazuje dobu aktivace během 18 hodin při teplotě 29 °C po indukci 1mM IPTG (0 až 18 h).

Příklad 7

Aktivace kaspasy 4 in vivo

Aktivaci kaspasy 4 in vivo popsal Munday N. A. a kol., J. Biol. Chemistry, 270, 15870 až 15876 (1995). Exprese zkrácené formy kaspasy 4, která začíná na Ala59, které chybí proregion v E. coli vede samoaktivaci štěpením mezi podjednotkami P10 a P20, které se soustřeďují do aktivního enzymového heterodimeru. Prodleva v aktivaci kaspasy 4 se odrazí v translaci prodlevy ve štěpení a aktivaci pro-IL-18 na zralý IL-18 (obr. 9). To umožňuje nahromadění stabilnějšího pro-IL-18 před štěpením na zralý IL-18, který je méně stabilní v buňkách.

Příklad 8

Čištění lidského IL-18 koexprimovaného s kaspasou 4

66 g buněk E. coli exprimujících IL-18, jak je popsáno v příkladu 6, se suspenduje ve 130 ml 0,1M HEPES, pH 7,5, obsahujícího 1mM EDTA a 10mM DTT (vlastní proces se uskuteční při teplotě 4 °C a v přítomnosti 10mM DTT s výjimkou posledního kroku, aby se zachoval volný SH) a

lyzuje při 103,425 MPa dvěma průchody přes Microfluidics. 230 ml lyzátu se centrifuguje při 34000 xg po dobu 30min. 200 ml supernatantu se zředí na 1 l 25mM HEPESem, pH 7,0 a nechá protéci dvěma sloupci seřazenými za sebou, ToyoPearl SP 650M a ToyoPearl DEAE 650M. Většina nečistot vzniklých z buněk *E. coli* se naváže na sloupce. Materiál, který protekl sloupci, se upraví na hodnotu pH 9,5 pomocí 25mM bistrispropan HCl, zředí na 2 l a natahne na sloupec Source 15Q předem vyvážený 25mM bistrispropan HCl, pH 9,5. Sloupec se eluuje lineárním gradientem 0 až 0,5M chloridem sodným ve stejném pufru. Frakce obsahující IL-18 se identifikují za použití Vydac C4 RP-HPLC a shromáždí se 250 ml. Eluát se zahustí na objem 50 ml za použití membrány YM10 a natáhne na sloupec Supradex 75 předem vyvážený 10mM NaPO₄ pH 6,0 obsahujícím 1mM EDTA a 0,15M chlorid sodný (žádný DTT pro použití in vivo).

Příklad 9

Příprava zkrácené kaspasy 5

Lidská zkrácená kaspasa 5 je rovněž exprimována jako fuzní protein s šestihistidinovou smyčkou na N-konci v *E. coli*. Expresní plasmid, pET16b-zkrácená kaspasa 5, se odvodí od vektoru pET16b (Novagen), který obsahuje fágový T7 promotor. Rekombinantní vektor se konstruuje PCR amplifikací aktivní domény zkrácené kaspasy 5 (aminokyseliny Ile146 až Asn418) zahrnutím kódující sekvence pro šest histidinů na N-konci a zakončením Nco I a Xho I restrikčními endonukleasovými místy. Výsledný produkt PCR se potom subklonuje mezi tato dvě restrikční místa, aby se vytvořil fuzní vektor zkrácené kaspasy 5 se šesti histidiny na N-konci.

Výsledný plasmid se transformuje do lysogenního kmenu *E. coli* BL21 DE3, obsahujícího chromozomální kopii T7 RNA

polymerasy za kontroly promotoru lacUV5, což umožňuje induktabilní expresi zkrácené kaspasy 5 po indukci 1mM IPTG. Aktivní protein se čistí z buněčných pelet izolovaných po indukci při teplotě 37 °C po dobu 3 h.

Příklad 10

Čištění zkrácené kaspasy 5

Když jsou lyzovány buňky *E. coli* exprimující lidskou zkrácenou kaspasu 5 se šestihistidinovou smyčkou na N-konci, popsanou v příkladu 9, lze detekovat aktivitu zkrácené kaspasy 5 v lyzáto­vém supernatantu. Potom, co se protein zachytí ze supernatantu na NiNTA agarosových kuličkách, získá se znovu jak p10, tak p20. To ukazuje, že proteasová doména zkrácené kaspasy 5 je aktivována v buněčné kultuře prostřednictvím samoštěpení na spojení p10 a p20 a zůstává jako rozpustný nekovalentní heterodimer. Se znalostí této informace lze heterodimer p10/p20 se smyčkou se šesti histidiny čistit. Vlastní proces se uskutečňuje při teplotě 4 °C, aby se zabránilo jakémukoli dalšímu poškození molekuly.

Asi 400 g vlhkých buněčných pelet *E. coli* se suspenduje v 1,6 l lýzového pufru obsahujícího 25 mM HEPES, 0,1% CHAPS, 500 mM NaCl, 10 mM beta-merkapt ethanolu (BME) při pH 7,4 a 10% glycerol (pufr A) a lýzuje dvěma průchody přes Microfluidics při 82,74 MPa. Lyzát se centrifuguje při 30000 xg po dobu jedné hodiny a dostane se 1,7 l lyzáto­vého supernatantu. Do lyzáto­vého supernatantu se přidá 150 ml NiNTA agarosy, která byla předem vyvážena lyzáto­vým pufrem obsahujícím 5mM imidazol, pH suspenze se upraví na hodnotu 8,0 pomocí 2N hydroxidu sodného a kaspasa 5 se absorbuje várkovým způsobem po dobu 1 h. NiNTA agarosa se vloží do sloupce, promyje 5mM a 25mM imidazolem v pufru A sekvenčně,

aby se odstranily nečistoty a kaspasa 5 se eluuje 300mM imidazolem v pufru A. Protein se dialyzuje proti pufru B (25 mM HEPES, 0,1% CHAPS, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 10 mM BME, pH 8,0) a natáhne do sloupce DEAE ToyoPearl 650M, předem vyváženého stejným pufrům. Zkrácená kaspasa 5 se eluuje ze sloupce 100 mM chloridu sodného ve stejném pufru. Frakce vykazující nejvyšší specifickou aktivitu zkrácené kaspasy 5 za použití fluorescenčního peptidového substrátu LEED-AMC se shromáždí.

Příklad 11

Aktivace a příprava polypeptidu in vitro

Pro-IL-18 připravený a čištěný, jak je popsáno v příkladech 1 a 2, se inkubuje se zkrácenou kaspasou 5 v poměru hmotností 1:500 po dobu 3 h při teplotě místnosti. Štěpná reakce prodomény se uskuteční z více než 90 % podle analýzy SDS-PAGE. Do reakční směsi se přidá 140 ml NiNTA agarosy v pufru D, inkubuje po dobu 1 h a vylije na nálevku se skleněným sintrem, aby se získal zpět nenavázaný materiál obsahující převážně zralý IL-18. Malá množství zbylého pro-IL-18, prodomény, zkrácené kaspasy 5 a jiné nečistoty se vážou na NiNTA agarosu. Nenavázaný roztok se adjustuje do 25mM DTT, inkubuje po dobu 1 h, aby se dokončila redukční reakce, pH roztoku se upraví na hodnotu 6,0 přidáním 2M kyseliny fosforečné a zahustí na objem 86 ml za použití membrány YM10. Zahuštěný vzorek se natáhne na sloupec Superdex 75 předem vyvážený 10mM fosforečnanem sodným o pH 6,0 obsahujícím 0,1M chlorid sodný. Spojené frakce obsahují 560 mg zralého IL-18.

Příklad 12

Aktivace a příprava polypeptidu in vivo

Aktivace IL-18 lze rovněž dosáhnout in vivo pomocí současné exprese lidského prekursoru IL-18 a zkrácené kaspasy 5. Pro-IL-18 je koexprimován bicistronicky v E. coli z jednoduchého transkriptu s lidskou zkrácenou kaspasou 5 v rámci expresního plasmidu pET28-pro-IL-18/kasp5 (obr.9). Lidský gen pro-IL-18 se subklonuje do pET28a (Novagen) za kontroly T7 promotoru včetně účinné Shine-Dalgarnovy sekvence pro optimální iniciaci translace od pro-IL-18 sekvence (obr. 10). Gen zkrácené kaspasy 5 (Ile146 až Asn418) se subklonuje okamžitě za sekvenci pro-IL-18 včetně účinné Shine-Dalgarnovy sekvence, což zajišťuje minimální iniciaci translace ze sekvence zkrácené kaspasy 5. T7 terminační sekvence se začlení pro ukončení translace za bicistronickou transkripční jednotku. Výsledný konstrukt se potom podrobí transfekci do BL21(DE3) hostitele, obsahujícího induktabilní chromozomální kopii T7 polymerasového genu. Indukce tohoto konstruktu v tomto hostiteli pomocí 1mM IPTG má za následek koordinaci transkripce a translace pro-IL-18 a pro-kaspasy 5. Translací nově vznikající pro-kaspasy 5 je samovolně přeměňována na aktivní enzym, který iniciuje proteolytickou aktivaci pro-IL-18.

Příklad 13

Čištění lidského IL-18 koexprimovaného se zkrácenou kaspasou 5

66 g buněk E. coli exprimujících IL-18, jak je popsáno v příkladu 12, se suspenduje ve 130 ml 0,1M HEPES, pH 7,5, obsahujícího 1mM EDTA a 10mM DTT (vlastní proces se uskuteční při teplotě 4 °C a v přítomnosti 10mM DTT s výjimkou posledního kroku, aby se zachoval volný SH) a lýzuje při 103,425 MPa dvěma průchody přes Microfluidics. 230

ml lyzátu se centrifuguje při 34000 xg po dobu 30min. 200 ml supernatantu se zředí na 1 l 25mM HEPESem, pH 7,0 a nechá protéci dvěma sloupci seřazenými za sebou, ToyoPearl SP 650M a ToyoPearl DEAE 650M. Většina nečistot vzniklých z buněk E. coli se naváže na sloupce. Materiál, který protekl sloupci, se upraví na hodnotu pH 9,5 pomocí 25mM bistrispropan, zředí na 2 l a natahne na sloupec Source 15Q předem vyvážený 25mM bistrispropan HCl, pH 9,5. Sloupec se eluuje lineárním gradientem 0 až 0,5M chloridem sodným ve stejném pufru. Frakce obsahující IL-18 se identifikují za použití Vydac C4 RP-HPLC a shromáždí se 250 ml. Eluát se zahustí na objem 50 ml za použití membrány YM10 a natáhne na sloupec Supradex 75 předem vyvážený 10mM NaPO₄ pH 6,0 obsahujícím 1mM EDTA a 0,15M chlorid sodný (žádný DTT pro použití in vivo).

Příklad 14

Příprava ubikvitin/pro-IL-18/Ubp1

Sekvence kódující ubikvitin se 76 aminokyselinami se fuzuje v rámci s počátkem zralého lidského IL-18 přes tupou koncovou ligaci tak, že první tyrosinový kodón zralého IL-18 následuje okamžitě po kodónu glycinu 76 ubikvitinu. Fuzní gen se potom subklonuje do pET vektoru za kontroly T7 promotoru včetně účinné Shine-Dalgarnovy sekvence pro optimální iniciaci translace od sekvence genu ubikvitin-IL-18. Gen Ubp-1 s plnou délkou se subklonuje okamžitě za IL-18 včetně účinné Shine-Dalgarnovy sekvence pro minimální translaci Ubp-1. Obr. 11 ukazuje sekvenci UbIL-18/Ubp-1 expresní kazety v rámci pET28. Obr. 13 ukazuje anotovanou sekvenci UbIL-18/Ubp-1 expresní kazety v rámci pET28. Číslování odpovídá pozicím v rámci pET28.

Příklad 15

Aktivace a příprava IL-18 in vivo

Konstrukt z příkladu 14 se potom podrobí transfekci do BL21(DE3) hostitele. Indukce tohoto konstruktu v tomto hostiteli pomocí 1mM IPTG má za následek koordinaci transkripce a translace ubikvitin-IL-18 a Ubp-1. Enzymatické působení Ubp-1 vede k účinnému zpracování Ub-IL-18 na zralý aktivní IL-18, který lze potom přímo čistit z lyzátů *E. coli* běžnými způsoby. Obr. 16 ilustruje dobu exprese a zpracování při teplotách 30 °C a 37 °C po indukci 1mM IPTG. Šipka nahoře ukazuje část nezpracovaného Ub-IL-18 v linii 1. Šipka dole ukazuje zpracovanou část IL-18 v linii 3. (Detekce Western blot za použití antisera proti IL-18).

Příklad 16

Čištění lidského IL-18 koexprimovaného s ubikvitinem

66 g buněk *E. coli* exprimujících IL-18, jak je popsáno v příkladu 15, se suspenduje ve 130 ml 0,1M HEPES, pH 7,5, obsahujícího 1mM EDTA a 10mM DTT (vlastní proces se uskuteční při teplotě 4 °C a v přítomnosti 10mM DTT s výjimkou posledního kroku, aby se zachoval volný SH) a lýzuje při 103,425 MPa dvěma průchody přes Microfluidics. 230 ml lyzátu se centrifuguje při 34000 xg po dobu 30min. 200 ml supernatantu se zředí na 1 l 25mM HEPESem, pH 7,0 a nechá protéci dvěma sloupci seřazenými za sebou, ToyoPearl SP 650M a ToyoPearl DEAE 650M. Většina nečistot vzniklých z buněk *E. coli* se naváže na sloupce. Materiál, který protekl sloupci, se upraví na hodnotu pH 9,5 pomocí 25mM bistrispropan, zředí na 2 l a natahne na sloupec Source 15Q předem vyvážený 25mM bistrispropan HCl, pH 9,5. Sloupec se eluuje lineárním gradientem 0 až 0,5M chloridem sodným ve stejném pufru. Frakce obsahující IL-18 se identifikují za použití Vydac C4 RP-HPLC a shromáždí se 250 ml. Eluát se zahustí na objem 50

ml za použití membrány YM10 a natáhne na sloupec Supredex 75 předem vyvážený 10mM NaPO₄ pH 6,0 obsahujícím 1mM EDTA a 0,15M chlorid sodný (žádný DTT pro použití in vivo).

Zatímco je zde popsáno, co se v současné době považuje za výhodná ztělesnění tohoto vynálezu, je zřejmé, že lze uskutečnit řadu modifikací a patentové nároky zahrnují všechny takové modifikace, které spadají do rozsahu tohoto vynálezu.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob produkce aktivního polypeptidu z prekursoru polypeptidu, který má proteasový aktivační motiv, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje aminokyselinovou sekvenci XEYD, ve které je X zvoleno ze skupiny aminokyselin, sestávající z W, L, F, Y, I, V, D nebo E a Y je zvoleno ze skupiny aminokyselin, sestávající z H, I, A, T, S, P nebo E, zahrnující:

(i) kontaktování kaspasy 4 s prekursorem polypeptidu a

(ii) čištění aktivního polypeptidu.

2. Způsob produkce aktivního polypeptidu z prekursoru polypeptidu, který má proteasový aktivační motiv, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje aminokyselinovou sekvenci XEYD, ve které je X zvoleno ze skupiny aminokyselin, sestávající z W, L, F, Y, I, V, D nebo E a Y je zvoleno ze skupiny aminokyselin, sestávající z H, I, A, T, S, P nebo E, zahrnující:

(i) kontaktování kaspasy 5 s prekursorem polypeptidu a

(ii) čištění aktivního polypeptidu.

3. Způsob produkce aktivního polypeptidu IL-18 z prekursoru polypeptidu IL-18, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje:

(i) kontaktování kaspasy 4 s prekursorem polypeptidu IL-18 a

(ii) čištění aktivního polypeptidu.

4. Způsob produkce aktivního polypeptidu IL-18 z prekursoru polypeptidu IL-18, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje:

(i) kontaktování kaspasy 5 s prekursorem polypeptidu IL-18 a

(ii) čištění aktivního polypeptidu.

5. Způsob podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že prekursor polypeptidu IL-18 je lidský polypeptid IL-18.

6. Způsob podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že prekursor polypeptidu IL-18 je lidský polypeptid IL-18.

7. Způsob produkce aktivního lidského polypeptidu IL-18, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje:

(i) kontaktování kaspasy 4 s lidským prekursorem polypeptidu IL-18, aby se daný prekursor polypeptidu přeměnil na aktivní lidský polypeptid IL-18, uvedený prekursor polypeptidu IL-18 zahrnuje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její část, která má zachovány zbytky asparagové kyseliny 36 a tyrosinu 37 v aminokyselinové sekvenci SEQ ID NO:1 jako N-koncovou sekvenci a

(ii) čištění aktivního lidského polypeptidu IL-18.

8. Způsob produkce aktivního lidského polypeptidu IL-18, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje:

(i) kontaktování kaspasy 5 s lidským prekursorem

polypeptidu IL-18, aby se daný prekursor polypeptidu přeměnil na aktivní lidský polypeptid IL-18, uvedený prekursor polypeptidu IL-18 zahrnuje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1 nebo její část, která má zachovány zbytky asparagové kyseliny 36 a tyrosinu 37 v aminokyselinové sekvenci SEQ ID NO:1 jako N-koncovou sekvenci a

(ii) čištění aktivního lidského polypeptidu IL-18.

9. Způsob produkce aktivního lidského polypeptidu IL-18 podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že aktivní lidský polypeptid IL-18 je polypeptid, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:3.

10. Způsob produkce aktivního lidského polypeptidu IL-18 podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že aktivní lidský polypeptid IL-18 je polypeptid, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:3.

11. Způsob produkce aktivního polypeptidu z prekursoru polypeptidu, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje:

(i) bicistronickou koexpresi kaspasy 4 s prekursorem polypeptidu a

(ii) čištění aktivního polypeptidu.

12. Způsob produkce aktivního polypeptidu z prekursoru polypeptidu, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje:

(i) bicistronickou koexpresi kaspasy 5 s prekursorem polypeptidu a

(ii) čištění aktivního polypeptidu.

13. Způsob produkce aktivního polypeptidu IL-18 z prekursoru polypeptidu IL-18, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje:

(i) bicistronickou koexpresi ubikvitinasy s fuzním ubikvitin/IL-18 a

(ii) čištění aktivního polypeptidu IL-18.

14. Způsob produkce aktivního polypeptidu IL-18 z prekursoru polypeptidu, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje:

(i) bicistronickou koexpresi kaspasy 4 s prekursorem polypeptidu IL-18 a

(ii) čištění aktivního polypeptidu IL-18.

15. Způsob produkce aktivního polypeptidu IL-18 z prekursoru polypeptidu, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje:

(i) bicistronickou koexpresi kaspasy 5 s prekursorem polypeptidu IL-18 a

(ii) čištění aktivního polypeptidu IL-18.

16. Způsob podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, že prekursor polypeptidu IL-18 je lidský prekursor polypeptidu IL-18.

17. Způsob podle nároku 14, v y z n a č u j í c í s e

t í m, že prekursor polypeptidu IL-18 je lidský prekursor polypeptidu IL-18.

18. Způsob podle nároku 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, že prekursor polypeptidu IL-18 je lidský prekursor polypeptidu IL-18.

19. Způsob podle nároku 16, v y z n a č u j í c í s e t í m, že aktivní lidský polypeptid IL-18 je polypeptid, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:3.

20. Způsob podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, že aktivní lidský polypeptid IL-18 je polypeptid, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:3.

21. Způsob podle nároku 18, v y z n a č u j í c í s e t í m, že aktivní lidský polypeptid IL-18 je polypeptid, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:3.

22. Způsob produkce aktivního lidského polypeptidu IL-18 z prekursoru lidského polypeptidu IL-18, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje:

(i) bicistronickou koexpresi ubikvitinasy s ubikvitin/IL-18, který má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:10 a

(ii) čištění aktivního lidského polypeptidu IL-18.

23. Způsob produkce aktivního lidského polypeptidu IL-18 z prekursoru lidského polypeptidu IL-18, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje:

(i) bicistronickou koexpresi kaspasy 4, která má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:4, s prekursorem

lidského polypeptidu IL-18 a

(ii) čištění aktivního polypeptidu IL-18.

24. Způsob produkce aktivního lidského polypeptidu IL-18 z prekursoru lidského polypeptidu IL-18, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje:

(i) bicistronickou koexpresi kaspasy 5, která má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:6, s prekursorem lidského polypeptidu IL-18 a

(ii) čištění aktivního polypeptidu IL-18.

21.00.03

1/31

7/2002-4085

73584

Obr. 1

SEQ ID NO:1

1 MAAEPVEDNC INFVAMKFID NTLYFIAEDD ENLES DYFGK LESKLSVIRN
 5 51 LNDQVLFIDQ GNRPLFEDMT DSDCRDNAPR TIFIISMYKD SQPRGMAVTI
 101 SVKCEKISTL SCENKIISFK EMNPPDNIKD TKSDIIFFOR SVPGHDKMQ
 151 FESSSYEGYF LACEKERDLF KLILKKEDEL GDRSIMFTVQ NED

Obr. 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 CTTGAGAGCA AACTATCGGT CATtCGTAAT
 151 200
 TTAAATGACC AGGTCCTATT TATCGACCAA GGGAATCGTC CACTATTCTGA
 201 250
 20 GGACATGACA GACAGTGA CT GCGGAGACAA TGCGCCGCGA ACCATtTTCA
 251 300
 TTATATCTAT GTACAAGGAT TCTCAGCCGC GCGGAATGGC CGTAACTATT
 301 350
 TCTGTCAAAT GTGAAAAGAT ATCCACGCTG TCGTGTGAGA ACAAgATtAT
 25 351 400
 tAGTTTCAAA GAGATGAATC CGCCGGATAA TATCAAGGAC ACGAAGTCTG
 401 450
 ATATCATATT TTTCCAGCGC AGCGTGCCGG GGCACGATAA CAAGATGCAA
 451 500
 30 TTTGAATCAT CCAGCTATGA AGGGTACTTT CTTGCATGCG AGAAGGAACG
 501 550
 CGATCTCTTT AAAC TTATTT TAAAGAAAGA GGACGAGCTA GGCGATCGCA
 551 582
 GCATtATGTT CACTGTCCAA AATGAAGACT AG
 35

Obr. 3

SEQ ID NO:3

1 YFGKLESKLS VIRNLNDQVL FIDQGNRPLF EDMTSDCRD NAPRTIFIIS
 51 MYKDSQPRGM AVTISVKCEK ISTLSCENKI ISFKEMNPPD NIKDTKSDII
 40 101 FFQRSVPGHD NKMQFESSY EGYFLACEKE RDLFKLILKK EDELGDRSIM

21.02.03

2/31

151 FTVQONED

Obr. 4

SEQ ID NO:4

5 1 MGHHHHHHGA LKLCPHEEFL RLCKERAEEI YPIKERNNRT RLALIICNTE
51 FDHLPPRNGA DFDITGMKEL LEGLDYSVDV EENLTARDME SALRAFATRP
101 EHKSSDSTFL VLMSHGILEG ICGTVHDEKK PDVLLYDTIF QIFNNRNCLS
151 LKDKPKVIIV QACRGANRGE LWVRDSPTSL EVASSQSEN LEEDAVYKTH
201 VEKDFIAFCS STPHNVSWRD STMGSIFITQ LITCFQKYSW CCHLEEVFRK
10 252 VQQSFETPRA KAQMPTIERL SMTRYFYLFEP GN

Obr. 5

SEQ ID NO: 5

1 50
15 ATGGGCCATC ATCATCATCA TCATGGCGCC CTCAAGCTTT GTCCTCATGA 100
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 GGGCATTTGC TACCAGACCA 350
301 350
GAGCACAAAGT 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 600
551 600
CTTCACAGTC ATCTGAGAAC CTGGAGGAAG ATGCTGTTTA CAAGACCCAC
601 650
GTGGAGAAGG ACTTCATTGC TTTCTGCTCT TCAACGCCAC ACAACGTGTC
40 651 700
CTGGAGAGAC AGCACAATGG GCTCTATCTT CATCACACAA CTCATCATAT
701 750
GCTTCCAGAA ATATTCTTGG TGCTGCCACC TAGAGGAAGT ATTTCCGGAAG
751 800

21.02.03

3/31

GTACAGCAAT CATTTGAAAC TCCAAGGGCC AAAGCTCAA TGCCCACCAT
801 849
AGAACGACTG TCCATGACAA GATATTTCTA CCTCTTTCCT GGCAATTGA

5 Obr. 6

SEQ ID NO:6

1 MGHHHHHHGI LKLCPREEF LRLCKKNHDEI YPIKKREDRR RLALIICNTK
51 FDHLPARNGA HYDIVGMKRL LQGLGYTVVD EKNLTARDME SVLRAFAARP
101 EHKSSDSTFL VLMSHGILEG ICGTAHKKKK PDVLLYDTIF QIFNNRNCLS
10 151 LKDKPKVIIV QACRGEKHGE LWVRDSPASL AVISSQSEN LEADSVCKIH
201 EEKDFIAFCS STPHNVSWRD RTRGSIFITE LITCFQKYSC CCHLMEIFRK
251 VQKSFEVPQA KAQMPTIERA TLTRDFYLF GN

Obr. 7

15 SEQ ID NO:7

1 50
ATGGGCCATC ATCATCATCA TCATGGCATA CTCAAAC TTT GTCCTCGTGA
51 100
AGAATTCCTG AGACTGTGTA AAAAAAATCA TGATGAGATC TATCCAATAA
20 101 150
AAAAGAGAGA GGACCGCAGA CGCCTGGCTC TCATCATATG CAATACAAAG
151 200
TTTGATCACC TGCCTGCAAG 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
CCTAGAGGGA ATCTGCGGAA CTGCGCATAA AAAGAAAAA CCGGATGTGC
401 450
TGCTTTATGA CACCATCTTC CAGATATTCA ACAACCGCAA CTGCCTCAGT
451 500
35 CTAAAGGACA AACCCAAGGT CATCATTGTC CAGGCCTGCA GAGGTGAAAA
501 550
ACATGGGGAA CTCTGGGTCA GAGACTCTCC AGCATCCTTG GCAGTCATCT
551 600
CTTCACAGTC ATCTGAGAAC CTGGAGGCAG ATTCTGTTTG CAAGATCCAC
40 601 650
GAGGAGAAGG ACTTCATTGC TTTCTGTTCT TCAACACCAC ATAACGTGTC
651 700
CTGGAGAGAC CGCACAAGGG GCTCCATCTT CATTACGGAA CTCATCACAT

21.02.03

4/31

701 750
 GCTTCCAGAA ATATTCTTGC TGCTGCCACC TAATGGAAAT ATTTCCGAAG
 751 800
 GTACAGAAAT CATTTGAAGT TCCACAGGCT AAAGCCCAGA TGCCCACCAT
 5 801 849
 AGAACGAGCA ACCTTGACAA GAGATTCTA CCTCTTTCCT GGCAATTGA

Obr. 8

10 T7 → RBS Pro IL18 RBS Kasp4

Obr. 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 AGTGA CTGCC GAGACAATGC GCCGCGAACC ATtTTCATTA
 30 351 400
 TATCTATGTA CAAGGATTCT CAGCCGCGCG GAATGGCCGT AACTATTTCT
 401 450
 GTCAAATGTG AAAAGATATC CACGCTGTCTG 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

651 700
TtATGTTTAC TGTCCAAAAT GAAGACTAGT ggaggatata aTACCAGGaa
701 750
taaataaaaat ccatgGgcca tcatcatcat catcatggcG CCCTCAAGCT
5 751 800
TTGTCCTCAT GAAGAATTCC TGAGACTATG TAAAGAAAGA GCTGAAGAGA
801 850
TCTATCCAAT AAAGGAGAGA AACAACCGCA 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 AGCACATTCT 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 CTTCAACGCC
1351 1400
30 ACACAACGTG TCCTGGAGAG ACAGCACAAT GGGCTCTATC TTCATCACAC
1401 1450
AACTCATCAC ATGCTTCCAG AAATATTCTT GGTGCTGCCA CCTAGAGGAA
1451 1500
GTATTTTCGGA AGGTACAGCA ATCATTGAA ACTCCAAGGG CCAAAGCTCA
35 1501 1550
AATGCCCACC ATAGAACGAC TGTCCATGAC AAGATATTTT TACCTCTTTT
1551 1600
CTGGCAATTG AAAATGGATC CGAATTGAG CTCCGTCGAC AAGCTTGCGG
1601 1650
40 CCGCACTCGA GCACCACCAC CACCACCACT GAGATCCGGC TGCTAACAAA
1651 1700
GCCCCGAAAGG AAGCTGAGTT GGCTGCTGCC ACCGCTGAGC AATAACTAGC

1743

5 Obr. 10

T7 promotor

[illegible]

TCTAGAGCTAGGGCGCTTTAATTATGCTGAGTGATATCCCCTTAACACTCGCCTATTGTT

10

Shine-Dalgarno Začátek ProIL18

5024 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5083

AAGGGGAGATCTGGTGTGGAattcctcctatattgtaTACCGACGACTTGGTCATCTTCT

15

b.

M A A E P V E D -

5084 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5143

GTTAACGTAGTTGAAACACCGTTACTTTAAATAACTGTTATGCGAAATGAAATATCGACT

20

b

N C I N F V A M K F I D N T L Y F I A E -

Začátek zralého IL18

25

5144 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5203

TCTACTACTTTTGGACCTTAGTCTAATGAAACCGTTCGAACTCTCGTTTGATAGCCAGTA

9

D D E N L E S D Y F G K L E S K L S V I -

30

TCGTAATTTAAATGACCAGGTCCTATTTATCGACCAAGGGAATCGTCCACTATTCGAGGA

5204 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5263

aGCATTAAATTTACTGGTCCAGGATAAATAGCTGGTTCCTTAGCAGGTGATAAGCTCCT

b

R N L N D Q V L F I D Q G N R P L F E D -

35

CATGACAGACAGTGACTGCCGAGACAATGCGCCGCGAACCATTTCATTATATCTATGTA

5264 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5323

GTACTGTCTGTCACCTGACGGCTCTGTTACGCGGCGCTTGGTAaAAGTAATATAGATACAT

40

h

M T D S D C R D N A P R T I F I I S M Y .

CAAGGATTCTCAGCCGCGCGGAATGGCCGTAAC TATTTCTGTCAAATGTGAAAAGATATC

5324 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5383

ATTTCTTTCTCGACTTCTCTAGATAGGTTATTTCCCTCTCTTTGTTGGCGTGTGCGGACCG

b K E R A E E I Y P I K E R N N R T R L A -
5 TCTCATCATATGCAATACAGAGTTTGACCATCTGCCTCCGAGGAATGGAGCTGACTTTGA
5804 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5863
AGAGTAGTATACGTTATGTCTCAAACTGGTAGACGGAGGCTCCTTACCTCGACTGAAACT
b L I I C N T E F D H L P P R N G A D F D -
10 CATCACAGGGATGAAGGAGCTACTTGAGGGTCTGGACTATAGTGTAGATGTAGAAGAGAA
5864 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5923
GTAGTGTCCCTACTTCCTCGATGAACTCCCAGACCTGATATCACATCTACATCTTCTCTT
15 b I T G M K E L L E G L D Y S V D V E E N -
TCTGACAGCCAGGGATATGGAGTCAAGCGCTGAGGGCATTGCTACCAGACCAGAGCACAA
5924 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5983
AGACTGTGCGTCCCTATACCTCAGTCGCGACTCCCGTAAACGATGGTCTGGTCTCGTGT
20 b L T A R D M E S A L R A F A T R P E H K -
GTCTCTGACAGCACATTCTTGGTACTCATGTCTCATGGCATCCTGGAGGGAATCTGCGG
5984 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6043
25 CAGGAGACTGTGCTGTAAGAACCATGAGTACAGAGTACCGTAGGACCTCCCTTAGACGCC
b S S D S T F L V L M S H G I L E G I C G -
AACTGTGCATGATGAGAAAAACCAGATGTGCTGCTTTATGACACCATCTTCCAGATATT
6044 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6103
30 TTGACACGTACTACTCTTTTTTGGTCTACACGACGAAATACTGTGGTAGAAGGTCTATAA
b T V H D E K K P D V L L Y D T I F Q I F -
CAACAACCGCAACTGCCTCAGTCTGAAGGACAAACCAAGGTCATCATTTGCCAGGCCTG
6104 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6163
35 GTTGTGGCGTTGACGGAGTCAGACTTCCTGTTTGGGTTCCAGTAGTAACAGGTCCGGAC
b N N R N C L S L K D K P K V I I V Q A C -
40 CAGAGGTGCAAACCGTGGGGAAGTGTGGGTCAGAGACTCTCCAGCATCCTTGAAGTGGC
6164 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6223
GTCTCCACGTTTGGCACCCCTTGACACCCAGTCTCTGAGAGGTCGTAGGAACCTTCACCG

b R G A N R G E L W V R D S P A S L E V A -
CTCTTCACAGTCATCTGAGAACCTGGAGGAAGATGCTGTTTACAAGACCCACGTGGAGAA
5 6224 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6283
GAGAAGTGTGTCAGTAGACTCTTGACCTCCTTCTACGACAAATGTTCTGGGTGCACCTCTT

b S S Q S S E N L E E D A V Y K T H V E K -
GGACTTCATGCTTTCTGCTCTTCAACGCCACACAACGTGTCCTGGAGAGACAGCACAAT
10 6284 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6343
CCTGAAGTAACGAAAGACGAGAAGTTGCGGTGTGTTGCACAGGACCTCTCTGTCGTGTTA

b D F I A F C S S T P H N V S W R D S T M -
GGGCTCTATCTTCATCACACAACATCATCATGCTTCCAGAAATATTCTTGGTGTGCTCCA
15 6344 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6403
CCCGAGATAGAAGTAGTGTGTTGAGTAGTGTACGAAGGTCTTTATAAGAACCACGACGGT

20 b G S I F I T Q L I T C F Q K Y S W C C H -
CCTAGAGGAAGTATTTCCGAAGGTACAGCAATCATTGAAACTCCAAGGGCCAAAGCTCA
6404 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6463
GGATCTCCTTCATAAAGCCTTCCATGTCGTTAGTAAACTTTGAGGTTCCCGGTTTCGAGT

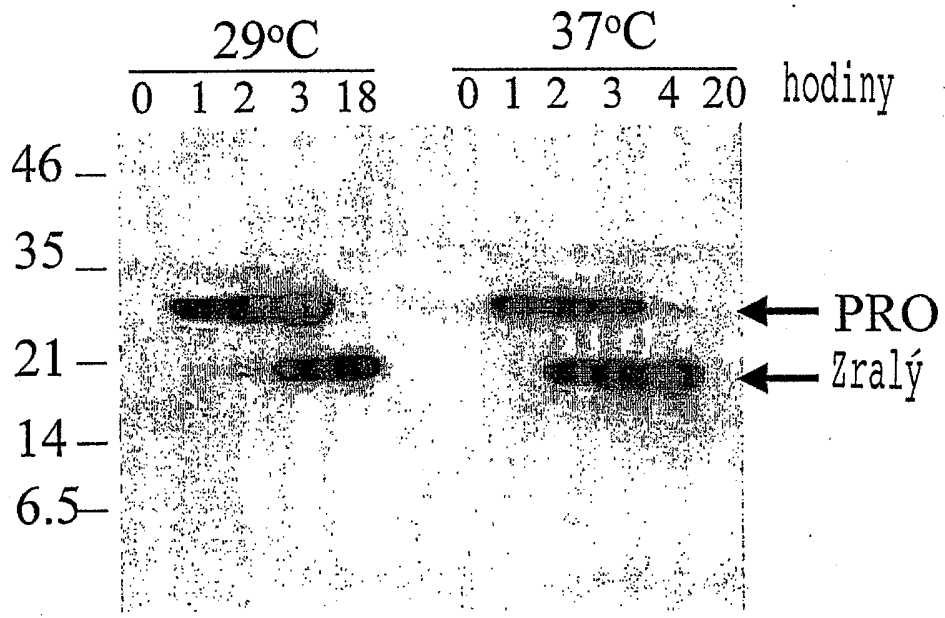
25 b L E E V F R K V Q Q S F E T P R A K A Q -
AATGCCCAACCATAGAACGACTGTCCATGACAAGATATTTCTACCTCTTTCCTGGCAATTG
6464 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6523
TTACGGGTGGTATCTTGCTGACAGGTACTGTTCTATAAAGATGGAGAAAGGACCGTTAAC

30 b M P T I E R L S M T R Y F Y L F P G N * -
AAAATGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCAC
35 6524 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6583
TTTTACCTAGGCTTAAGCTCGAGGCAGCTGTTTGAACGCCGGCGTGAGCTCGTGGTGGTG

b K W I R I R A P S T S L R P H S S T T T -
CACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCC
40 6584 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6643
GTGGTGGTGACTCTAGGCCGACGATTGTTTCGGGCTTTCCTTCGACTCAACCGACGACGG

b T T T E I R L L T K P E R K L S W L L P -
T7 Terminator
ACCGCTGAGCAATAA CTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTT
6644 -----+-----+-----+-----+-----+----- 6703
5 TGGCGACTCGTTATTGATCGTATTGGGGAACCCCGGAGATTGCCCAGAACTCCCCAAAA
b P L S N N * H N P L G P L N G S * G V F -
PTG
10 6704 --- 6706
AAC

Obr. 11
15



20 Obr. 12



Obr. 13

SEQ ID NO:9

1 50
ATGGCTGCTG AACCAGTAGA AGACAATTGC ATCAACTTTG TGGCAATGAA
5 51 100
ATTTATTGAC AATACGCTTT ACTTTATAGC TGAAGATGAT GAAAACCTGG
101 150
AATCAGATTA CTTTGGCAAG CTTGAGAGCA AACTATCGGT CATTCGTAAT
151 200
10 TTAATGACC AGGTCCTATT TATCGACCAA GGAATCGTC CACTATTCTGA
201 250
GGACATGACA GACAGTGAAT GCCGAGACAA TGCGCCGCGA ACCATTTTCA
251 300
TTATATCTAT GTACAAGGAT TCTCAGCCGC GCGGAATGGC CGTAACTATT
15 301 350
TCTGTCAAAT GTGAAAAGAT ATCCACGCTG TCGTGTGAGA ACAAGATTAT
351 400
TAGTTTCAAA GAGATGAATC CGCCGGATAA TATCAAGGAC ACGAAGTCTG
401 450
20 ATATCATATT TTTCCAGCGC AGCGTGCCGG GGCACGATAA CAAGATGCAA
451 500
TTTGAATCAT CCAGCTATGA AGGGTACTTT CTTGCATGCG AGAAGGAACG
501 550
CGATCTCTTT AAACCTATTT TAAAGAAAGA GGACGAGCTA GGCGATCGCA
25 551 600
IGCATTATGTT CACTGTCCAA AATGAAGACT AGTGGAGGAT ATAATACCAG
601 650
GAATAAATAA AATCCATGGG CCATCATCAT CATCATCATG GCATACTCAA
651 700
30 ACTTTGTCCT CGTGAAGAAT TCCTGAGACT GTGTAAAAAA AATCATGATG
701 750
AGATCTATCC AATAAAAAAG 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 CGGAAGTGGC CATAAAAAGA
1001 1050

21.00.03

12/31

AAAAACCGGA TGTGCTGCTT TATGACACCA TCTTCCAGAT ATTCAACAAC
1051 1100
CGCAACTGCC TCAGTCTAAA GGACAAACCC AAGGTCATCA TTGTCCAGGC
1101 1150
5 CTGCAGAGGT GAAAAACATG GGGAAGTCTG GGTCAGAGAC 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
CGGAATCAT CACATGCTTC CAGAAATATT CTTGCTGCTG CCACCTAATG
1351 1400
15 GAAATATTTT GGAAGGTACA GAAATCATTT GAAGTTCCAC AGGCTAAAGC
1401 1450
CCAGATGCCC ACCATAGAAC GAGCAACCTT GACAAGAGAT TTCTACCTCT
1451 1464
TTCCTGGCAA TTGA

20

Obr. 14

25 4921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4980
GCGCCGGTGTATGCCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCCGCGA
CGCGGCCACTACGGCCGGTGCTACGCAGGCCGCATCTCCTAGCTCTAGAGCTAGGGCGCT

30 4981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5040
c A G D A G H D A S G V E D R D L D P A K -
T7 promotor
AATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATCCCCCTCTAGACCACA
TTAATTATGCTGAGTGATATCCCCCTTAACACTCGCTATTGTTAAGGGGAGATCTGGTGT

35 5041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5100
c L I R L T I G E L * A D N N S P L D H T -
Shine-Dalgarno Začátek ProIL18
CCTTaaggaggatataacatATGGCTGCTGAACCAGTAGAAGACAATTGCATCAACTTTG
GGAattcctcctatatattgtaTACCGACGACTTGGTCATCTTCTGTTAACGTAGTTGAAAC

40 5101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5160
c L R R I * H M A A E P V E D N C I N F V -
TGGCAATGAAATTTATTGACAATACGCTTTACTTTATAGCTGAAGATGATGAAAACCTGG
ACCGTTACTTTAAATAACTGTTATGCGAAATGAAATATCGACTTCTACTACTTTTGGACC

45 c A M K F I D N T L Y F I A E D D E N L E -

210003

13/31

Začátek zralého IL18

AATCAGATTACTTTGGCAAGCTTGAGAGCAAACCTATCGGTCATTCGTAATTTAAATGACC
 5161 -----+-----+-----+-----+-----+ 5220
 TTAGTCTAATGAAACCGTTCGAACCTCTCGTTTGATAGCCAGTAAGCATTAAATTTACTGG
 5
 c S D Y F G K L E S K L S V I R N L N D Q -
 AGGTCCTATTTATCGACCAAGGGAATCGTCCACTATTCGAGGACATGACAGACAGTGA
 5221 -----+-----+-----+-----+-----+ 5280
 10 TCCAGGATAAATAGCTGGTCCCTTAGCAGGTGATAAGCTCCTGTACTGTCTGTCAGTGA
 c V L F I D Q G N R P L F E D M T D S D C -
 GCCGAGACAATGCGCCGCGAACCATTTCATTATATCTATGTACAAGGATTCTCAGCCGC
 15 5281 -----+-----+-----+-----+-----+ 5340
 CGGCTCTGTTACGCGCGCTTGGTAAAGTAATATAGATACATGTTCTTAAGAGTCGGCG
 c R D N A P R T I F I I S M Y K D S Q P R -
 GCGGAATGGCCGTAACCTATTCTGTCAAATGTGAAAAGATATCCACGCTGTCGTGTGAGA
 20 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 ACAAGATTATAGTTTCAAAGAGATGAATCCGCGGATAATATCAAGGACACGAAGTCTG
 5401 -----+-----+-----+-----+-----+ 5460
 TGTTCTAATAATCAAAGTTTCTCTACTTAGGCGGCTATTATAGTTCCTGTGCTTCAGAC
 30 c K I I S F K E M N P P D N I K D T K S D -
 ATATCATATTTTTCCAGCGCAGCGTGCCGGGCGACGATAACAAGATGCAATTTGAATCAT
 5461 -----+-----+-----+-----+-----+ 5520
 TATAGTATAAAAAGGTGCGCTGCGACGCCCCGTGCTATTGTTCTACGTTAAACTTAGTA
 35 c I I F F R S V P G H D N K M Q F E S S -
 CCAGCTATGAAGGGTACTTTCTTGCATGCGAGAAGGAACGCGATCTCTTAAACTTATTT
 5521 -----+-----+-----+-----+-----+ 5580
 40 GGTGATACTTCCCATGAAAGAACGTACGCTCTTCCTTGCGCTAGAGAAATTTGAATAAA
 c S Y E G Y F L A C E K E R D L F K L I L -
 TAAAGAAAGAGGACGAGCTAGGCGATCGCAGCATLATGTTCACTGTCCAAAATGAAGACT
 45 5581 -----+-----+-----+-----+-----+ 5640
 ATTTCTTTCTCCTGCTCGATCCGCTAGCGTCGTAAATACAAGTGACAGGTTTACTTCTGA
 c K K E D E L G D R S I M F T V Q N E D * -
 Defektní Shine-Dalgarno Začátek kaspasy-5
 50 AGTggaggatataaTACCAGGaatataataaaatccatgGgccatcatcatcatcatcatg

210003

14/31

5641 -----+-----+-----+-----+-----+ 5700
TCacctcctatatattATGGTcCttattttatttttaggtacCcggtagtagtagtagtagtac

5 c W R I * Y Q E * I K S M G H H H H H H G -
gcATACTCAAACCTTGTCTCGTGAAGAATTCCTGAGACTGTGTAATAAAAAATCATGATG

5701 -----+-----+-----+-----+-----+ 5760
cgTATGAGTTTGAAACAGGAGCActTCTTAAGGACTCTGACACATTTTTTTTAGTACTAC

10 c I L K L C P R E E F L R L C K K N H D E -
AGATCTATCCAATAAAAAAGAGAGAGGACCGCAGACGCCTGGCTCTCATCATATGCAATA

5761 -----+-----+-----+-----+-----+ 5820
TCTAGATAGGTTATTTTTTCTCTCTCCTGGCGTCTGCGGACCGAGAGTAGTATACGTTAT

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

5821 -----+-----+-----+-----+-----+ 5880
GTTTCAAACCTAGTGGACGGACGTTCCCTTACCCCGAGTGATACTGTAGCACCCCTACTTTT

20 c K F D H L P A R N G A H Y D I V G M K R -
GGCTGCTTCAAGGCCTGGGCTACACTGTGGTTGACGAAAAGAATCTCACAGCCAGGGATA

5881 -----+-----+-----+-----+-----+ 5940
CCGACGAAGTTCCGGACCCGATGTGACACCAACTGCTTTTCTTAGAGTGTGCGTCCCTAT

25 c L L Q G L G Y T V V D E K N L T A R D M -
TGGAGTCAGTGCTGAGGGCATTGCTGCCAGACCAGAGCACAAGTCCTCTGACAGCACGT

5941 -----+-----+-----+-----+-----+ 6000
ACCTCAGTCACGACTCCCGTAAACGACGGTCTGGTCTCGTGTTCAGGAGACTGTCTGTGCA

30 c E S V L R A F A A R P E H K S S D S T F -
TCTTGGTACTCATGTCTCATGGCATCCTAGAGGGAATCTGCGGAATGCGCATAAAAAGA

6001 -----+-----+-----+-----+-----+ 6060
AGAACCATGAGTACAGAGTACCGTAGGATCTCCCTTAGACGCCTTGACGCGTATTTTTCT

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

6061 -----+-----+-----+-----+-----+ 6120
TTTTTGGCCTACACGACGAAATACTGTGGTAGAAGGTCTATAAGTTGTTGGCGTTGACGG

40 c K P D V L L Y D T I F Q I F N N R N C L -
TCAGTCTAAAGGACAAACCAAGGTCATCATTGTCCAGGCCTGCAGAGGTGAAAAACATG

6121 -----+-----+-----+-----+-----+ 6180
AGTCAGATTTCCTGTTTGGGTTCCAGTAGTAACAGGTCCGGACGTCTCCACTTTTGTAC

45
50

210003

15/31

c S L K D K P K V I I V Q A C R G E K H G -
GGGAACCTCTGGGTCAGAGACTCTCCAGCATCCTTGGCAGTCATCTCTTCACAGTCATCTG
5 6181 -----+-----+-----+-----+-----+ 6240
CCCTTGAGACCCAGTCTCTGAGAGGTCGTAGGAACCGTCAGTAGAGAAGTGTACAGTAGAC
c E L W V R D S P A S L A V I S S Q S S E -
10 AGAACCTGGAGGCAGATTCTGTTTGAAGATCCACGAGGAGAAGGACTTCATTGCTTTCT
6241 -----+-----+-----+-----+-----+ 6300
TCTTGGACCTCCGTCTAAGACAAACGTTCTAGGTGCTCCTCTTCTCTGAAGTAACGAAAGA
c N L E A D S V C K I H E E K D F I A F C -
15 GTTCTTCAACACCACATAACGTGTCTTGGAGAGACCGCACAGGGGCTCCATCTTCATTA
6301 -----+-----+-----+-----+-----+ 6360
CAAGAAGTTGTGGTGTATTGCACAGGACCTCTCTGGCGTGTTCCTCCGAGGTAGAAGTAAT
20 c S S T P H N V S W R D R T R G S I F I T -
CGGAACCTCATCACATGCTTCCAGAAATATTCTTGCTGCTGCCACCTAATGGAAATATTTC
6361 -----+-----+-----+-----+-----+ 6420
GCCTTGAGTAGTGTACGAAGGTCTTTATAAGAACGACGACGGTGGATTACCTTTATAAAG
25 c E L I T C F Q K Y S C C C H L M E I F R -
GGAAGGTACAGAAATCATTGGAAGTTCACAGGCTAAAGCCCAGATGCCCACCATAGAAC
6421 -----+-----+-----+-----+-----+ 6480
30 CCTTCCATGTCTTTAGTAACTTCAAGGTGTCCGATTTCGGGTCTACGGGTGGTATCTTG
c K V Q K S F E V P Q A K A Q M P T I E R -
GAGCAACCTTGACAAGAGATTCTACCTCTTTCTTGGCAATTGACTCGAGCACCACCACC
35 6481 -----+-----+-----+-----+-----+ 6540
CTCGTTGGAACCTGTTCTCTAAAGATGGAGAAAGGACCGTTAACTGAGCTCGTGGTGGTGG
c A T L T R D F Y L F P G N * L E H H H H -
40 ACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCA
6541 -----+-----+-----+-----+-----+ 6600
TGGTGGTGACTCTAGGCCGACGATTGTTTCGGGCTTTCTTCTGACTCAACCGACGACGGT
45 c H H * D P A A N K A R K E A E L A A A T -
T7 Terminator
CCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTT
6601 -----+-----+-----+-----+-----+ 6660
GGCGACTCGTTATTGATCGTATTGGGGAACCCCGAGATTGCCCAGAACTCCCCAAAAA
50 c A E Q * L A * P L G A S K R V L R G F L -

TGCTGAAAGGAGGAACTATATCCGGT
 6661 -----+-----+----- 6687
 ACGACTTTCCTCCTTGATATAGGCCA

5

c L K G G T I S G -

Obr. 15

10

IL18/ Kasp5

0 1 2 4 18 hodiny



Obr. 16

15

SEQ ID NO:10

1 MQIFVKTLTG KTITLEVESS DTIDNVKSKI QDKEGIPPDQ QRLIFAGKQL
 51 EDGRTLSDYN IQKESTLHLV LRLRGYFGK LESKLSVIRN LNDQVLFDQ
 101 GNRPLFEDMT DSDCRDNAPR TIFIISMYKD SQPRGMAVTI SVKCEKISTL
 20 151 SCENKIISFK EMNPPDNIKD TKSDIIFQOR SVPGHDKMQ FESSYEGYF
 201 LACEKERDLF KLILKKEDEL GDRSIMFTVQ NED

Obr. 17

25 SEQ ID NO:11

1 50
 ATGCAGATCT TCGTCAAGAC GTTAACCGGT AAAACCATAA CTCTAGAAGT
 51 100
 TGAATCTTCC GATACCATCG ACAACGTAA GTCGAAAATT CAAGACAAGG
 30 101 150

21.02.03

17/31

AAGGCATTCC ACCTGATCAA CAAAGATTGA TCTTTGCCGG TAAGCAGCTC
151 200
GAAGACGGTA GAACGCTGTC TGATTACAAC ATTCAGAAGG AGTCGACCTT
201 250
5 ACATCTTGTC TTAAGACTAA GAGGAGGGTA CTTTGGCAAG CTTGAGAGCA
251 300
AACTATCGGT CATTGTAAT TTAAATGACC AGGTCCTATT TATCGACCAA
301 350
GGGAATCGTC CACTATTCGA GGACATGACA GACAGTGA CTGCGAGACAA
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 AGCGTGCCCG
551 600
GGCAGGATAA CAAGATGCAA TTTGAATCAT CCAGCTATGA AGGGTACTTT
20 601 650
CTTGCGATGCG AGAAGGAACG CGATCTCTTT AACTTATTT TAAAGAAAGA
651 700
GGACGAGCTA GGCGATCGCA GCATTATGTT CACTGTCCAA AATGAAGACT
701
25 AG

Obr. 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

TCTTGTCTTA 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 CACGCTGTCTG
10 551 600
TGTGAGAACA AGATTATTAG TTTCAAAGAG ATGAATCCGC CGGATAATAT
601 650
CAAGGACACG AAGTCTGATA TCATATTTTTT CCAGCGCAGC GTGCCGGGGC
651 700
15 ACGATAACAA GATGCAATTT GAATCATCCA GCTATGAAGG GTACTTTCTT
701 750
GCATGCGAGA AGGAACGCGA TCTCTTTTAA 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 TGGTTCCCGA CAGGATTTTT TGAGAAATTT TAAAACTTGG AGTAACAACA
951 1000
ATAACAATCT ATCGATTTAT TTATTAATTT TTGGCATAGT AGTATTTTTT
1001 1050
TATAAAAAAC CAGACCATCT AACTACATT 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 CATAAGAAAA AACTCGTAA
1351 1400
GGGTGGCAAA GTTTATGGTA AGCATAAGAA GAAATTGAAT AGGAAGTCAA

21.02.03

19/31

	1401		1450
	GTTTCGAAAGA AGACGAAGAA AAGAGCCAGG AGCCAGATAT CACTTTTCAGT		
	1451		1500
	GTCGCCTTAA GGGATCTACT TTCTGCCTTA AATGCGAAGT ATTATCGGGA		
5	1501		1550
	TAAACCCTAT TTCAAAACCA ATAGTTTATT GAAAGCAATG TCCAAATCTC		
	1551		1600
	CAAGAAAAAA TATTCTTCTT GGCTACGACC AAGAGGACGC GCAAGAATTC		
	1601		1650
10	TTCCAGAACA TACTAGCCGA GTTGGAAAGT AACGTAAAT CATTGAATAC		
	1651		1700
	TGAAAACTA GATACTACTC CAGTTGCGAA ATCAGAATTA CCCGATGATG		
	1701		1750
	CTTTAGTAGG TCAACTTAAC CTTGGTGAAG TTGGCACTGT TTACATTCCA		
15	1751		1800
	ACTGAACAGA TTGATCCTAA CTCTATACTA CATGACAAGT CCATTCAAAA		
	1801		1850
	TTTCACACCT TTCAAACCTAA TGACTCCTTT AGATGGTATC ACGGCAGAAA		
	1851		1900
20	GAATTGGTTG TTTACAGTGT GGTGAGAACG GTGGCATAAG ATATTCCGTA		
	1901		1950
	TTTTTCGGGAT TAAGCTTAAA TTTACCGAAC GAGAATATTG GTTCCACTTT		
	1951		2000
	AAAATTATCT CAGTTATTGA GCGACTGGAG TAAACCTGAA ATCATCGAAG		
25	2001		2050
	TCGTAGAATG TAACCGTTGT GCCCTCACAG CAGCGCACTC TCATTTATTT		
	2051		2100
	GGTCAGTTGA AAGAATTGA AAAAAACCT GAGGGTTCTGA TCCCAGAAAA		
	2101		2150
30	GCCAATTAAC GCTGTAAAAG ATAGGGTCCA TCAAATCGAA GAAGTTCTTG		
	2151		2200
	CCAAACCAGT TATTGACGAT GAAGATTATA AGAAGTTGCA TACAGCAAAT		
	2201		2250
	ATGGTACGTA AATGCTCTAA ATCTAAGCAG ATTTTAATAT CAAGACCTCC		
35	2251		2300
	ACCATTATTA TCCATTCTA TCAACAGATC CGTATTGAT CCAAGAACGT		
	2301		2350
	ACATGATTAG AAAAAATAAC TCGAAAGTAT TGTTTAAGTC AACGTTGAAT		
	2351		2400
40	CTTGCCCCCTT GGTGTTGTGA TATTAATGAA ATCAATTTGG ATGCTCGTTT		
	2401		2450
	GCCAATGTCA AAAAAGGAAA AAGCTGCGCA ACAAGATTCA AGTGAAGATG		
	2451		2500

21.02.03

20/31

AAAACATTGG 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
GCTCTGTCAT 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 AGGAAAGCCA AGAGCAAGGA GAAGGTGAAG
30 3201 3250
AGCAAGAGGA AGGTCAAGAG CAGATGAAGT TCGAGAGAAC AGAAGACCAT
3251 3300
AGAGATATTT CTGGTAAAGA TGTAAACTAA GCTCGAGCAC CACCACCACC
3301 3350
35 ACCACTGAGA TCCGGCTGCT AACAAAGCCC GAAAGGAAGC TGAGTTGGCT
3351 3400
GCTGCCACCG CTGAGCAATA ACTAGCATAA CCCCTTGGGG CCTCTAAACG
3401 3419
GGTCTTGAGG GGTTTTTTG

Obr. 19

5

T7 promotor

AGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAA
4964 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5023
TCTAGAGCTAGGGCGCTTTAATTATGCTGAGTGATATCCCCTTAACACTCGCCTATTGTT

10

Shine-Dalgarno Začátek Ub-IL18

TTCCCCTCTAGACCACACCTTaaggaggatataacatATGCAGATCTTCGTCAAGACGTT
5024 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5083
AAGGGGAGATCTGGTGTGGAattcctcctatatattgtaTACGTCTAGAAGCAGTTCTGCAA

15

b

M Q I F V K T L -

20

AAACCGGTAAAACCATAACTCTAGAAGTTGAATCTTCCGATACCATCGACAACGTTAAGTC
5084 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5143
TTGGCCATTTTGGTATTGAGATCTTCAACTTAGAAGGCTATGGTAGCTGTTGCAATTCAG

b

T G K T I T L E V E S S D T I D N V K S -

25

GAAAATTCAAGACAAGGAAGGCATTCCACCTGATCAACAAAGATTGATCTTTGCCGGTAA
5144 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5203
CTTTTAAGTTCTGTTCCCTTCCGTAAGGTGGACTAGTTGTTTCTAACTAGAAACGGCCATT

b

K I Q D K E G I P P D Q Q R L I F A G K -

30

GCAGCTCGAGGACGGTAGAACGCTGTCTGATTACAACATTCAGAAGGAGTCGACCTTACA
5204 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5263
CGTCGAGCTCCTGCCATCTTGCACAGACTAATGTTGTAAGTCTTCCTCAGCTGGAATGT

35

b

Q L E D G R T L S D Y N I Q K E S T L H -

Začátek zralého IL18

TCTTGTCCTTAAGACTAAGAGGAGGGTACTTTGGCAAGCTTGAGAGCAAATATCGGTCAT
5264 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5323
AGAACAgAATTCTGATTCTCCTCCCATGAAACCGTTCGAACTCTCGTTTGATAGCCAGTA

40

b

L V L R L R G G Y F G K L E S K L S V I -

tCGTAATTTAAATGACCAGGTCCTATTTATCGACCAAGGGAATCGTCCACTATTTCGAGGA

22/31

5324 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5383
aGCATTAAATTTACTGGTCCAGGATAAATAGCTGGTTCCCTTAGCAGGTGATAAGCTCCT

b R N L N D Q V L F I D Q G N R P L F E D -
CATGACAGACAGTGA CTGCTGCCGAGACAATGCGCGCGAACCA TTTTCATTATATCTATGTA
5384 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5443
GTACTGTCTGTCACTGACGGCTCTGTTACGCGGCGCTTG GTAAaAGTAATATAGATACAT

b M T D S D C R D N A P R T I F I I S M Y -
CAAGGATTCTCAGCCGCGCGGAATGGCCGTA ACTATTTCGTCAAATGTGAAAAGATATC
5444 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5503
GTTCCCTAAGAGTCGGGCGGCCTTACC GGCA TTGATAAAGACAGTTTACACTTTTCTATAG

b K D S Q P R G M A V T I S V K C E K I S -
CACGCTGTCTGTGAGAACAagAttAtTAGTTTCAAGAGATGAATCCGCGGGATAATAT
5504 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5563
GTGCGACAGCACA CTCTTGTTcTaATaTCAAAAGTTTCTCTACTTAGGCGGCCTATTATA

b T L S C E N K I I S F K E M N P P D N I -
CAAGGACACGAAGTCTGATATCATATTTTTTCCAGCGCAGCGTGCCGGGGCAGCATAACAA
5564 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5623
GTTCTCTGTGCTTCAGACTATAGTATAAAAAAGGTCGCGTCGCACGGCCCCGTGCTATTGTT

b K D T K S D I I F F Q R S V P G H D N K -
GATGCAATTTGAATCATCCAGCTATGAAGGGTACTTTTCTTG CATGCGAGAAGGAACGCGA
5624 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5683
CTACGTTAAACTTAGTAGGTGATACTTCCC ATGAAAGAACGTACGCTCTTCCTTGCGCT

b M Q F E S S S Y E G Y F L A C E K E R D -
TCTCTTTAAACTTATTTTAAAGAAAGAGGACGAGCTAGGCGATCGCAGCATtATGTT CAC
5684 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5743
AGAGAAATTTGAATAAAATTTCTTTCTCCTGCTCGATCCGCTAGCGTCGTAAaTACAAGTG

b L F K L I L K K E D E L G D R S I M F T -

Defektní Shine-Dalgarno Začátek Upb-1

TGTCCAAAATGAAGACTAGTggaggatataaTACCAGGaataaaataaaatccatggggcca

[illegible]

ACAGGTTTTACTTCTGATCAcctcctatatattATGGTcCttattttatttttaggtacccggt

5

b V Q N E D * M G H -

tcacatcatcatcatcatggcATGGATGAAAGCAAGATAAACAGTTTATTACAATTTTTATT

[illegible]

10

agtagtagtagtagtaccgTACCTACTTTCGTTCTATTTGTCAAATAATGTTAAAAATAA

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

TGGTTCCTCCGACAGGATTTTTTGAGAAATTTTAAAACTTGGAGTAACAACAATAACAATCT

15

[illegible]

ACCAAGGGCTGTCCTAAAAAACTCTTTAAAAATTTTGAACCTCATTGTTGTTATTGTTAGA

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

20

ATCGATTTATTTATTAATTTTTGGCATAGTAGTATTTTTTTTATAAAAAACCAGACCATCT

5924 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5983

TAGCTAAATAAATAATTAAAAACCGTATCATCATAAAAAAATATTTTTTGGTCTGGTAGA

25

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

AAACTACATTGTTGAGAGCGTTAGTGAAATGACAACAAACTTCAGAAATAATAATAGCCT

[illegible]

TTTGATGTAACAACCTCTCGCAATCACTTTACTGTTGTTTGAAGTCTTTATTATTATTCGGA

30

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

TAGCCGTTGGTTGCCCAGAAGTAAGTTTACCCACTTAGACGAAGAGATCTTGAAAAGAGG

[illegible]

ATCGGCAACCAACGGGTCTTCATTCAAATGGGTGAATCTGCTTCTCTAGAACTTTTCTCC

35

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

TGGTTTCATTGCTGGTTTAGTTAATGATGGTAACACTTGTTTTATGAACCTCTGTTTTGCA

[illegible]

40

ACCAAAGTAACGACCAAATCAATTACTACCATTGTGAACAAAATACCTTGAGACAAAACGT

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

210203

24/31

ATCATTTGGCATCATCCAGAGAATTAATGGAGTTCTTGGACAATAATGTCATAAGGACCTA
6164 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6223
TAGTAACCGTAGTAGGTCTCTTAATTACCTCAAGAACCTGTTATTACAGTATTCTCTGGAT

5 b S L A S S R E L M E F L D N N V I R T Y -
TGAGGAGATAGAACAAAATGAACACRAATGAAGAAGGAAACGGGCAAGAATCTGCTCAAGA
6224 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6283
ACTCCTCTATCTTGTGTTTACTTGTGTTACTTCTTCTTCTTCCCGTTCTTAGACGAGTTCT

10 b E E I E Q N E H N E E G N G Q E S A Q D -
TGAAGCCACTCATAAGAAAAACACTCGTAAGGGTGGCAAAGTTTATGGTAAGCATAAGAA
6284 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6343
ACTTCGGTGAGTATTCTTTTGTGAGCATTCACCGTTTCAAATACCATTCTGATTCTT

15 b E A T H K K N T R K G G K V Y G K H K K -
GAAATTGAATAGGAAGTCAAGTTCGAAAGAAGACGAAGAAAAGAGCCAGGAGCCAGATAT
6344 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6403
CTTTAACTTATCCTTCAGTTCAGCTTCTTCTGCTTCTTTTCTCGGTCCTCGGTCTATA

20 b K L N R K S S S K E D E E K S Q E P D I -
CACTTTCACTGTCGCCTTAAGGGATCTACTTTCTGCCTTAAATGCGAAGTATTATCGGGA
6404 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6463
GTGAAAGTCACAGCGGAATTCCTAGATGAAAGACGGAATTTACGCTTCATAATAGCCCT

25 b T F S V A L R D L L S A L N A K Y Y R D -
TAAACCCTATTTCAAAACCAATAGTTTATTGAAAGCAATGTCCAAATCTCCAAGAAAAA
6464 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6523
ATTTGGGATAAAGTTTGTGTTATCAAATAACTTTCGTTACAGGTTTAGAGGTTCTTTTTT

30 b K P Y F K T N S L L K A M S K S P R K N -
TATTCTTCTTGGCTACGACCAAGAGGACGCGCAAGAATTCTTCCAGAACATACTAGCCGA
6524 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6583
ATAAGAAGAACCGATGCTGTTCTCCTGCGCGTTCTTAAGAAGGTCTTGTATGATCGGCT

40 b I L L G Y D Q E D A Q E F F Q N I L A E -
GTTGGAAAGTAACGTTAAATCATTGAATACTGAAAACTAGATACCACTCCAGTTGCGAA

6584 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6643
CAACCTTTCATTGCAATTAGTAACCTTATGACTTTTGTATCTATGGTGAGGTCAACGCTT

b L E S N V K S L N T E K L D T T P V A K -

5

ATCAGAATTACCCGATGATGCTTTAGTAGGTCAACTTAACCTTGGTGAAGTTGGCACTGT

6644 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6703

TAGTCTTAATGGGCTACTACGAAATCATCCAGTTGAATTGGAACCACTTCAACCGTGACA

10 b S E L P D D A L V G Q L N L G E V G T V -

TTACATTCCAACCTGAACAGATTGATCCTAACTCTATACTACATGACAAGTCCATTCAAAA

6704 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6763

AATGTAAGGTTGACTTGTCTAACTAGGATTGAGATATGATGTAAGTCTTTCAGGTAAGTTTT

15
b Y I P T E Q I D P N S I L H D K S I Q N -
TTTCACACCTTTCAAACCTAATGACTCCTTTAGATGGTATCACGGCAGAAAGAATTGGTTG
6764 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6823
20 AAAGTGTGGAAAGTTTGATTACTGAGGAAATCTACCATAGTGCCGCTCTTTCTTAACCAAC

b F T P F K L M T P L D G I T A E R I G C -

25
6824 TTTACAGTGTGGTGAGAACGGTGGCATAAGATATTCGGTATTTTCGGGATTAAGCTTAAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6883
AAATGTCACACCACTCTTGCCACCGTATTCTATAAGGCATAAAAGCCCTAATTCGAATTT

b L Q C G E N G G I R Y S V F S G L S L N -

30 TTTACCGAACGAGAAATATTGGTTCCACTTTAAAATTATCTCAGTTATTgAGCGACTGGAG

6884 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6943

AAATGGCTTGCTCTTATAACCAAGGTGAAATTTTAATAGAGTCAATAAcTCGCTGACCTC

b L P N E N I G S T L K L S Q L L S D W S -

35

TAAACCTGAAATCATCGAAGTCGTAGAATGTAACCGTTGTGCCCTCACAGCAGCGCACTC

6944 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 7003

ATTTGGACTTTAGTAGCTTCAGCATCTTACATTGGCAACACGGGAGTGTGTCGTCGCGTGAG

40 b K P E I I E V V E C N R C A L T A A H S -
TCATTTATTTGGTCAGTTGAAAGAATTTGAAAAAAAAA CCTGAGGGTTCGATCCCAGAAAA
7004 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 7063

AGTAAATAAACCGAGTCAACTTTCCTTAACTTTTTTTTGGACTCCCAAGCTAGGGTCTTTT

b H L F G Q L K E F E K K P E G S I P E K -

5 GCCAATTAACGCTGTAAAAGATAGGGTCCATCAAATCGAAGAAGTTCTTGCCAAACCAGT

7064 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 7123

CGGTTAATTGCGACATTTTCTATCCCAGGTAGTTTAGCTTCTTCAAGAACGGTTTGGTCA

b P I N A V K D R V H Q I E E V L A K P V -

10

TATTGACGATGAAGATTATAAGAAGTTGCATACAGCAAATATGGTACGTAAATGCTCTAA

[illegible]

ATAACTGCTACTTCTAATATTCTTCAACGTATGTCGTTTATACCATGCATTTACGAGATT

15 b I D D E D Y K K L H T A N M V R K C S K -

ATCTAAGCAGATTTTAAATATCAAGACCTCCACCATTATTATCCATTATATCAACAGATC

7184 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 7243

TAGATTCGTCTAAAATTATAGTTCCTGGAGGTGGTAATAATAGGTAAGTATAGTTGTCTAG

20

b S K Q I L I S R P P P L L S I H I N R S -

CGTATTTGATCCAAGAACGTACATGATTAGAAAAATAACTCGAAAGTATTGTTTAAGTC

[illegible]

25

GCATAAACTAGGTTCTTGCATGTACTAATCTTTTTTATTGAGCTTTCATAACAAATTCAG

b V F D P R T Y M I R K N N S K V L F K S -

AACGTTGAATCTTGCCCCctTGGTGTGTGATATTAATGAAATCAATTTGGATGCTCGTTT

30

7304 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 7363

TTGCAACTTAGAACGGGGaACCACAACACTATAATTACTTTAGTTAAACCTACGAGCAAA

b T L N L A P W C C D I N E I N L D A R L -

35

GCCAATGTCAAAAAAGGAAAAAGCTGCGCAACAAGATTCAAGTGAAGATGAAAACATTGG

[illegible]

CGGTTACAGTTTTTTCCTTTTCGACGCGTTGTTCTAAGTTCAC TTCTACTTTTGTAACC

b P M S K K E K A A Q Q D S S E D E N I G -

40

CGGTGAATACTATACGAAATTACATGAACGCTTCGAGCAGGAATTTGAAGACAGCGAGGA

[illegible]

GCCACTTATGATATGCTTTAATGTACTTGCGAAGCTCGTCCTTAAACTTCTGTCGCTCCT

b G E Y Y T K L H E R F E Q E F E D S E E -
AGAAAAAGAATACGATGACGAGAGGGGAACTATGCGTCTCATTACAATCATACCAAGGA
5 7484 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 7543
TCTTTTCTTATGCTACTGCGTCTCCCTTGATACGAGAGTAATGTTAGTATGGTTCCCT

b E K E Y D D A E G N Y A S H Y N H T K D -
10 TATCAGTAACTATGATCCCCTAAACGGTGAAGTCGATGGCGTGACATCCGATGATGAAGA
7544 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 7603
ATAGTCATTGATACTAGGGGATTGCCCCTTCAGCTACCGCACTGTAGGCTACTACTTCT

b I S N Y D P L N G E V D G V T S D D E D -
15 TGAGTACATTGAAGAAACCGATGCTTTAGGGAATACAATCAAAAAAGGATCATAGAACA
7604 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 7663
ACTCATGTAACCTTCTTTGGCTACGAAATCCCTTATGTTAGTTTTCCTAGTATCTTGT

20 b E Y I E E T D A L G N T I K K R I I E H -
TTCTGATGTTGAAAACGAGAATGTAAAAGATAATGAAGAACTGCAAGAAATCGACAATGT
7664 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 7723
AAGACTACAACCTTTTGCTCTTACATTTCTATTACTTCTTGACGTTCTTTAGCTGTTACA

25 b S D V E N E N V K D N E E L Q E I D N V -
GAGCCTTGACGAACCAAGATCAATGTTGAAGATCAACTAGAAACATCATCTGATGAGGA
7724 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 7783
CTCGGAACCTGCTTGGTTTCTAGTTACAACCTTCTAGTTGATCTTTGTAGTAGACTACTCCT

30 b S L D E P K I N V E D Q L E T S S D E E -
AGATGTTATACCAGCTCCACCTATCAATTATGCTAGGTCATTTCCACAGTTCCAGCCAC
35 7784 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 7843
TCTACAATATGGTCGAGGTGGATAGTTAATACGATCCAGTAAAAGGTGTCAAGGTCCGGTG

b D V I P A P P I N Y A R S F S T V P A T -
40 TCCATTGACATATTCAATGCGCTCTGTCAATTGTTCACTACGGTACCCATAATTATGGTCA
7844 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 7903
AGGTAACCTGTATAAGTAACGCGAGACAGTAACAAGTGATGCCATGGGTATTAAATACCAGT

210303

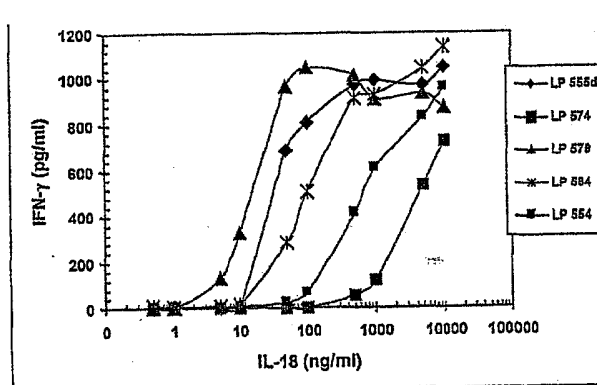
28/31

b P L T Y S L R S V I V H Y G T H N Y G H -
TTACATTGCATTTAGAAAATACAGGGGTTGTTGGTGGAGAATATCTGATGAGACTGTGTA
7904 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 7963
5 AATGTAACGTAAATCTTTTATGTCCCAACAACCACCTCTTATAGACTACTCTGACACAT
b Y I A F R K Y R G C W W R I S D E T V Y -
CGTTGTGGACGAAGCTGAAGTCCTTTCAACACCCGGTGTATTATGTTATTTTACGAATA
10 7964 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 8023
GCAACACCTGCTTCGACTTCAGGAAAGTTGTGGGCCACATAAATAACAATAAAATGCTTAT
b V V D E A E V L S T P G V F M L F Y E Y -
TGACTTTGATGAAGAACTGGGAAGATGAAGGATGATTGGAAGCTATTCAGAGTAATAA
15 8024 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 8083
ACTGAAACTACTTCTTTGACCCCTTCTACTTCCTACTAAACCTTCGATAAGTCTCATTAT
b D F D E E T G K M K D D L E A I Q S N N -
TGAAGAAGATGATGAAAAAGAGCAGGAGCAAAAAGGAGTCCAGGAGCCAAAGGAAAGCCA
20 8084 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 8143
ACTTCTTCTACTACTTTTCTCTCCTCGTTTTTCCTCAGGTCCTCGGTTTCTTTCGGT
25 b E E D D E K E Q E Q K G V Q E P K E S Q -
AGAGCAAGGAGAAGGTGAAGAGCAAGAGGAAGGTCAAGAGCAGATGAAGTTCGAGAGAAC
8144 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 8203
TCTCGTTCCTCTTCCACTTCTCGTTCCTTCCAGTTCTCGTCTACTTCAAGCTCTCTTG
30 b E Q G E G E E Q E E G Q E Q M K F E R T -
AGAAGACCATAGAGATATTCTGGTAAAGATGTAAACTAAGCTCGAGCACCACCACCACC
8204 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 8263
35 TCTTCTGGTATCTCTATAAAGAGCATTCTACATTTGATTGAGCTCGTGGTGGTGGTGG
b E D H R D I S G K D V N
ACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCG
40 8264 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 8323
TGGTGACTCTAGGCCGACGATTGTTTCGGGCTTTCCTTCGACTCAACCGACGACGGTGGC

- | | |
|----------------------------------|-----------------------------|
| 1. Ub-lidský IL-18, 3 hod | C. Kontrola - ProIL18/Kasp4 |
| 2. Ub-lidský IL-18/Ubp-1, 0 hod | |
| 3. Ub-lidský IL-18/Ubp-1, 3 hod | Western: Anti IL-18 |
| 4. Ub-lidský IL-18/Ubp-1, 18 hod | |

Obr. 21

Detekce IFN-gamma z buněk KG-1 stimulovaných po dobu 24 hod
IL-18



5

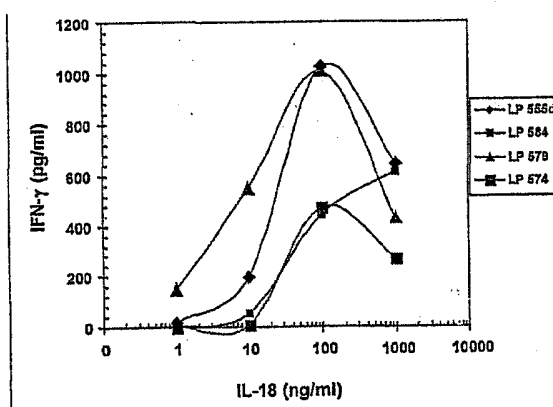
Popis různých vzorků lidského/myšího IL-18 (různé položky/konstrukty)

10

LP555d (standard) E. coli ICE-štěpený (in vitro)
LP554 E. coli myší IL-18 ICE-štěpený (in vitro)
LP559 E. coli exprimovaný zralý IL-18 obsahující N-koncový methionin
LP574 E. coli exprimovaný zralý IL-18 obsahující N-koncový methionin
LP579 Pichii exprimovaný secernovaný zralý IL-18
LP584 E. coli IL-18/ICE bicistronická koexprese (in vivo)
LP594 E. coli ICE-štěpený (in vitro)
LP613 E. coli kaspasa 4 štěpená (in vitro)
LP614 E. coli ICE koexprimovaná (in vitro)
LP623 kaspasa 4 koexprimovaná (in vivo)

Obr. 22

Detekce IFN-gamma z lidských PBMC stimulovaných po dobu 24 hod IL-18



5

Popis různých vzorků lidského/myšího IL-18 (různé položky/konstrukty)

10

LP555d (standard) E. coli ICE-štěpený (in vitro)

LP554 E. coli myší IL-18 ICE-štěpený (in vitro)

LP559 E. coli exprimovaný zralý IL-18 obsahující N-koncový methionin

LP574 E. coli exprimovaný zralý IL-18 obsahující N-koncový methionin

LP579 Pichií exprimovaný secernovaný zralý IL-18

LP584 E. coli IL-18/ICE bicistronická koexprese (in vivo)

LP594 E. coli ICE-štěpený (in vitro)

15

LP613 E. coli kaspasa 4 štěpená (in vitro)

LP614 E. coli ICE koexprimovaná (in vitro)

LP623 kaspasa 4 koexprimovaná (in vivo)

21.03.03

1

PV 2102-9085

~~13584~~

Seznam sekvencí

5 <110> SMITHKLINE BEECHAM

<120> ZPŮSOB PŘÍPRAVY FYZIOLOGICKY AKTIVNÍHO
IL-18 POLYPEPTIDU

10 <130> P51137

<140> k určení

<141> tímto

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 pro Windows verze 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

210303

2

Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met
85 90 95
Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys
100 105 110
5 Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile
115 120 125
Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly
130 135 140
His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe
10 145 150 155 160
Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys
165 170 175
Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu
180 185 190
15 Asp

<210> 2
<211> 582
20 <212> DNA
<213> Homo sapien

<400> 2
atggctgctg aaccagtaga agacaattgc atcaactttg tggcaatgaa atttattgac 60
25 aatacgcttt actttatagc tgaagatgat gaaaacotgg aatcagatta ctttggaag 120
cttgagagca aactatoggt cattcgtaat ttaaattgacc aggtcctatt tatcgaccaa 180
gggaatogtc cactattcga ggacatgaca gacagtgact gcgagacaa tgcgcgcgca 240
accattttca ttatatctat gtacaaggat tctcagccgc gcggaatggc cgtaactatt 300
tctgtcaaatt gtgaaaagat atccacgctg tcgtgtgaga acaagattat tagtttcaaa 360
30 gagatgaatc cgccggataa tatcaaggac acgaagtctg atatcatatt tttccagcgc 420
agcgtgccgg ggcacgataa caagatgcaa tttgaatcat ccagctatga agggactttt 480
cttgcattgcg agaaggaacg cgatctcttt aaacttattt taaagaaaga ggacgagcta 540
ggcgatcgca gcattatgtt cactgtccaa aatgaagact ag 582

35 <210> 3
<211> 157
<212> PRT
<213> Homo sapien

40 <400> 3
Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn
1 5 10 15
Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp

210203

3

	20	25	30
	Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile		
	35	40	45
5	Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile		
	50	55	60
	Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile		
	65	70	75
	Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys		
	85	90	95
10	Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys		
	100	105	110
	Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu		
	115	120	125
	Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu		
15	130	135	140
	Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp		
	145	150	155
	<210> 4		
20	<211> 282		
	<212> PRT		
	<213> Homo sapien		
	<400> 4		
25	Met Gly His His His His His His Gly Ala Leu Lys Leu Cys Pro His		
	1	5	10
	Glu Glu Phe Leu Arg Leu Cys Lys Glu Arg Ala Glu Glu Ile Tyr Pro		
	20	25	30
	Ile Lys Glu Arg Asn Asn Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ile Ile Cys Asn		
30	35	40	45
	Thr Glu Phe Asp His Leu Pro Pro Arg Asn Gly Ala Asp Phe Asp Ile		
	50	55	60
	Thr Gly Met Lys Glu Leu Leu Glu Gly Leu Asp Tyr Ser Val Asp Val		
	65	70	75
35	Glu Glu Asn Leu Thr Ala Arg Asp Met Glu Ser Ala Leu Arg Ala Phe		
	85	90	95
	Ala Thr 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 Val His Asp Glu		
40	115	120	125
	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 Ala Asn Arg Gly Glu Leu Trp Val Arg Asp Ser
 165 170 175
 Pro Thr Ser Leu Glu Val Ala Ser Ser Gln Ser Ser Glu Asn Leu Glu
 5 180 185 190
 Glu Asp Ala Val Tyr Lys Thr His Val Glu Lys Asp Phe Ile Ala Phe
 195 200 205
 Cys Ser Ser Thr Pro His Asn Val Ser Trp Arg Asp Ser Thr Met Gly
 210 215 220
 10 Ser Ile Phe Ile Thr Gln Leu Ile Thr Cys Phe Gln Lys Tyr Ser Trp
 225 230 235 240
 Cys Cys His Leu Glu Glu Val Phe Arg Lys Val Gln Gln Ser Phe Glu
 245 250 255
 Thr Pro Arg Ala Lys Ala Gln Met Pro Thr Ile Glu Arg Leu Ser Met
 15 260 265 270
 Thr Arg Tyr Phe Tyr Leu Phe Pro Gly Asn
 275 280

 <210> 5
 20 <211> 849
 <212> DNA
 <213> Homo sapien

 <400> 5
 25 atggggccatc atcatcatca tcatggcgcc ctcaagcttt gtctcatga agaattcctg 60
 agactatgta aagaaagagc tgaagagatc tatccaataa aggagagaaa caaccgcaca 120
 cgcttggtc tcatcatatg caatacagag ttgaccatc tgcctccgag gaatggagct 180
 gactttgaca tcacagggat gaaggagcta cttgagggtc tggactatag tgtagatgta 240
 gaagagaatc tgacagccag ggatattggag tcagcgctga gggcatttgc taccagacca 300
 30 gagcacaagt cctctgacag cacattcttg gtactcatgt ctcatggcat cctggaggga 360
 atctgaggaa ctgtgcatga tgagaaaaaa ccagatgtgc tgctttatga caccatcttc 420
 cagatattca acaaccgcaa ctgcctcagt ctgaaggaca aaccaagggt catcattgtc 480
 caggcctgca gaggtgcaaa ccgtggggaa ctgtgggtca gagactctcc agcatccttg 540
 gaagtggcct cttcacagtc atctgagaac ctggaggaa atgctgttta caagaccac 600
 35 gtggagaagg acttcattgc tttctgctct tcaacgcac acaacgtgtc ctggagagac 660
 agcacaatgg gctctatctt catcacacaa ctcatcacat gcttccagaa atattcttgg 720
 tgctgcaacc tagaggaagt atttgggaag gtacagcaat catttgaaac tocaagggcc 780
 aaagctcaaa tgcccaccat agaacgactg tccatgacaa gatatttcta cctctttcct 840
 ggcaattga 849
 40
 <210> 6
 <211> 282
 <212> PRT

<213> Homo sapien

<400> 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

<210> 7

<211> 849

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 7

5 atggggccatc atcatcatca tcatggcata ctcaaacttt gtcctcgtga agaattcctg 60
 agactgtgta aaaaaaatca tgatgagatc tatccaataa aaaagagaga ggaccgcaga 120
 cgcttggtc tcatcatatg caatacaaaag tttgatcaac tgccctgcaag gaatggggct 180
 cactatgaca tcgtggggat gaaaaggctg cttcaaggcc tgggctacac tgtgggtgac 240
 gaaaagaatc tcacagccag ggatatggag tcagtgtcga gggcatttgc tgccagacca 300
 gagcacaagt cctctgacag caggttcttg gtactcatgt ctcatggcat cctagaggga 360
 10 atctgcggaa ctgcgcataa aaagaaaaaa cgggatgtgc tgctttatga caccatcttc 420
 cagatattca acaaccgcaa ctgcctcagt ctaaaggaca aaccaagggt catcattgtc 480
 caggcctgca gaggtgaaaa acatggggaa ctctgggtca gagactctcc agcatccttg 540
 gcagtcatct cttcacagtc atctgagaac ctggaggcag attctgtttg caagatccac 600
 gaggagaagg acttcattgc tttctgttct tcaacaccac ataacgtgtc ctggagagac 660
 15 cgcaacaagg gctccatctt cattacggaa ctcatcacat gcttcagaa atattcttgc 720
 tgctgccacc taatggaaat atttcggaag gtacagaaat catttgaagt tccacaggct 780
 aaagcccaga tgcccacat agaocgagca accttgacaa gagatttcta cctctttcct 840
 ggcaattga 849

20

<210> 8

<211> 1743

<212> DNA

<213> Homo sapien

25

<400> 8

agatctcgat cccgcgaaat taatacgact cactataggg gaattgtgag cggataacaa 60
 ttccccctcta gaccacacct taaggaggat ataacatatg gctgctgaac cagtagaaga 120
 caattgcac aactttgtgg caatgaaatt tattgacaat acgctttact ttatagctga 180
 agatgatgaa aaocctggaat cagattactt tggcaagctt gagagcaaac tatcggtcat 240
 30 tcgtaattta aatgaccagg tcctatttat cgaccaaggg aatcgtccac tattogagga 300
 catgacagac agtgactgcc gagacaatgc gccgcgaacc attttcatta tatctatgta 360
 caaggattct cagccgcgcg gaatggccgt aactatttct gtcaaagtgt aaaagatatc 420
 cagctgtcg tgtgagaaca agattattag tttcaaagag atgaatccgc cggataatat 480
 caaggacacg aagtctgata tcatatTTTT ccagcgcagc gtgccggggc acgataacaa 540
 35 gatgcaattt gaatcatcca gctatgaagg gtactttctt gcatgcgaga aggaocgcga 600
 totcttttaa cttattttta agaaagagga cgagctaggc gatcgcagca ttatgttcac 660
 tgtccaaaat gaagactagt ggaggatata ataccaggaa taaataaaat ccatgggcca 720
 tcatcatcat catcatggcg ccctcaagct ttgtctcat gaagaattcc tgagactatg 780
 taaagaaaga gctgaagaga tctatccaat aaaggagaga aacaaccgca cagcctggc 840
 40 tctcatcata tgcaatacag agtttgacca tctgcctccg aggaatggag ctgactttga 900
 catcacaggg atgaaggagc tacttgaggg tctggactat agtgtagatg tagaagagaa 960
 tctgacagcc agggatatgg agtcagcgt gagggcattt gotaccagac cagagcacia 1020
 gtcctctgac agcacattct tggctactcat gtctcatggc atcctggagg gaatctgcgg 1080

aactgtgcat gatgagaaaa aaccagatgt gctgctttat gacaccatct tccagatatt 1140
 caacaaccgc aactgcctca gtotgaagga caaaccacaag gtcattcattg tccaggcctg 1200
 cagaggtgca aaccgtgggg aactgtgggt cagagactct ccagcatcct tggaagtggc 1260
 ctcttcacag tcatctgaga acctggagga agatgctgtt tacaagaccc acgtggagaa 1320
 5 ggacttcatt gctttctgct cttcaacgcc acacaacgtg tcttgagag acagcacaat 1380
 gggctctatc ttcacacac aactcatcac atgcttcag aaatattctt ggtgctgcca 1440
 cctagaggaa gtatttcgga aggtacagca atcatttgaa actccaaggg ccaaagctca 1500
 aatgcccacc atagaacgac tgtccatgac aagatatttc taactctttc ctggcaattg 1560
 aaaatggatc cgaattcgag ctccgtcgac aagcttgagg ccgcactcga gcaccaccac 1620
 10 caccaccact gagatccggc tgctaacaaa gcccgaaagg aagctgagtt ggctgctgcc 1680
 accgctgagc aataactagc ataaccocctt 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 ctttggaag 120
 cttgagagca aactatcggc cattcgtaat ttaaagacc aggtctatt tatcgaccaa 180
 gggaatcgtc cactattoga ggacatgaca gacagtgaact gccgagacaa tgcgcgcga 240
 accattttca ttatatctat gtacaaggat tctcagccgc gcggaatggc cgtaactatt 300
 25 tctgtcaaat gtgaaaagat atccacgctg tctgttgaga acaagattat tagtttcaaa 360
 gagatgaatc cgccggataa tatcaaggac acgaagtctg atatcatatt tttccagcgc 420
 agcgtgcggg ggcacgataa caagatgcaa tttgaatcat ccagctatga agggactttt 480
 cttgcatgcy agaaggaaag cgtctctttt aaacttattt taaagaaaga ggacgagcta 540
 ggcgatcgca gcattatgtt cactgtccaa aatgaagact agtggaggat ataataccag 600
 30 gaataaataa aatccatggg ccatcatcat catcatcatg gcatactcaa actttgtcct 660
 cgtgaagaat tctgagact gtgtaaaaaa aatcatgatg agatctatcc aataaaaaag 720
 agagaggacc gcagacgcct ggctctcatc atatgcaata caaagtttga tcacctgcct 780
 gcaaggaatg gggctcacta tgacatcgtg gggatgaaaa ggctgcttca aggcctgggc 840
 tacactgtgg ttgacgaaaa gaatctcaca gccagggata tggagtcagt gctgagggca 900
 35 tttgtgcca gaccagagca caagtctct gacagcacgt tcttggtact catgtctcat 960
 ggcactctag agggaatctg cggaactgag cataaaaaa aaaaaccgga tgtgctgctt 1020
 tatgacacca tcttcagat attcaacaac cgcaactgcc tcagtctaaa ggacaaacc 1080
 aaggtcatca ttgtccaggc ctgcagagg gaaaaacatg gggaactctg ggtcagagac 1140
 tctccagcat ccttggcagt catctcttca cagtcatctg agaacctgga ggcagattct 1200
 40 gtttgcaaga tccacgagga gaaggacttc attgctttct gttcttcaac aocacataac 1260
 gtgtcctgga gagacgcac aaggggctcc atcttcatta cggaactcat cacatgcttc 1320
 cagaaatatt cttgctgctg ccacctaatg gaaatatttc ggaaggtaca gaaatcattt 1380
 gaagttccac aggctaaagc ccagatgcc accatagaac gagcaacctt gacaagagat 1440

ttotacctct ttctggcaa ttga

1464

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

 <400> 10
 10 Met Gln Ile Phe Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
 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 ctotagaagt tgaatcttcc 60
 gataccatcg acaacgttaa gtcgaaaatt caagacaagg aaggoattcc acctgatcaa 120
 5 caaagattga tctttgocgg taagcagctc gaagacggta gaacgctgtc tgattacaac 180
 attcagaagg agtcgacott acatcttgtc ttaagactaa gaggagggtta ctttggcaag 240
 cttgagagca aactatoggt cattcgtaat ttaaatagacc aggtoctatt tatcgaccaa 300
 gggaaatcgtc cactattoga ggacatgaca gacagtgact gccgagacaa tgcgcgcgca 360
 accatcttca ttatatctat gtacaaggat tctcagccgc gcggaatggc cgtaactatt 420
 10 tctgtcaaatt gtgaaaagat atccacgctg tcgtgtgaga acaagattat tagtttcaaa 480
 gagatgaatc cgcgcgataa tatcaaggac acgaagtctg atatcatatt tttccagcgc 540
 agcgtgccgg ggcacgataa caagatgcaa tttgaatcat ccagctatga aggggtacttt 600
 cttgcatgcg agaaggaaag cgatctcttt aaacttattt taaagaaaga ggacgagcta 660
 ggogatcgca gcattatggt cactgtccaa aatgaagact ag 702

15

<210> 12

<211> 3419

<212> DNA

<213> Homo sapien

20

<400> 12

agatctogac ccgcgaaat taatacgact cactataggg gaattgtgag cggataacaa 60
 ttccccctcta gaccacacct taaggaggat ataacatatg cagatcttcg tcaagacggt 120
 aaccggtaaa accataactc tagaagttag atcttccgat accatcgaca acgttaagtc 180
 25 gaaaattcaa gacaaggaag gcattccacc tgatcaacaa agattgatct ttgccggtaa 240
 gcagctcgag gacggtagaa cgctgtctga ttacaacatt cagaaggagt cgaccttaca 300
 tottgtctta agaactaagag gagggtactt tggcaagctt gagagcaaac tatcggtcat 360
 tcgtaattha aatgaccagg tcctattttat cgaccaaggg aatcgctccac tattcgagga 420
 catgacagac agtgactgcc gagacaatgc gccgcgaacc attttcatta tatctatgta 480
 30 caaggattct cagcgcgcgc gaatggccgt aactattttc gtcaaagtgt aaaagatctc 540
 cacgtgtcgc tgtgagaaca agattattag tttcaaagag atgaatccgc cggataatat 600
 caaggacacg aagtctgata tcatattttt ccagcgcagc gtgccggggc acgataacaa 660
 gatgcaattt gaatcatcca gctatgaagg gtactttctt gcatgcgaga aggaacgcga 720
 totctttaa cttattttta agaaagagga cgagctagga gatcgcagca ttatgttcac 780
 35 tgtocaaaat gaagactagt ggaggatata ataccaggaa taaataaaat ccatggggca 840
 tcatcatcat catcatggca tggatgaaag caagataaac agtttattac aatttttatt 900
 tggttccga caggattttt tgagaaattt taaaacttgg agtaacaaca ataacaatct 960
 atcgatttat ttattaattt ttggcatagt agtatttttt tataaaaaac cagaccatct 1020
 aaactacatt gttgagagcg ttagtgaaat gacaacaaac ttcagaaata ataatagcct 1080
 40 tagcggttgg ttgccagaa gtaagtttac ccacttagac gaagagatct tgaaaagagg 1140
 tggtttcatt gctggtttag ttaatgatgg taacacttgt tttatgaact ctgttttgca 1200
 atcattggca tcatccagag aattaatgga gttcttggac aataatgtca taaggacct 1260
 tgaggagata gaacaaaatg aacacaatga agaaggaaac gggcaagaat ctgctcaaga 1320

	tgaagccact	cataagaaaa	acactcgtaa	gggtggcaaa	gtttatggta	agcataagaa	1380
	gaaattgaat	aggaagtcaa	gttcgaaaga	agacgaagaa	aagagccagg	agccagatat	1440
	cactttcagt	gtcgccctaa	gggatctact	ttctgcctta	aatgcgaagt	attatcggga	1500
	taaaccctat	ttcaaaacca	atagtttatt	gaaagcaatg	tccaaatctc	caagaaaaaa	1560
5	tattcttctt	ggctacgacc	aagaggagcg	gcaagaattc	ttccagaaca	tactagccga	1620
	gttggaagt	aacgttaa	cattgaatac	tgaaaaacta	gataccactc	cagttgcgaa	1680
	atcagaatta	cccgatgatg	ctttagtagg	tcaacttaac	cttggtgaag	ttggcactgt	1740
	ttacattcca	actgaacaga	ttgatcctaa	ctctatacta	catgacaagt	ccattcaaaa	1800
	tttcacacct	ttcaaaacta	tgactccttt	agatgggtatc	acggcagaaa	gaattgggtg	1860
10	tttacagtgt	ggtgagaacg	gtggcataag	atattccgta	ttttcgggat	taagcttaaa	1920
	tttaocgaac	gagaatattg	gttccacttt	aaaattatct	cagttattga	gcgactggag	1980
	taaacctgaa	atcatcgaag	tcgtagaatg	taaccgttgt	gccctcacag	cagcgcaactc	2040
	tcattttattt	ggtcagttga	aagaatttga	aaaaaacct	gaggggttcga	tcccagaaaa	2100
	gccaattaac	gctgtaaaag	ataggggtcca	tcaaatcgaa	gaagttcttg	ccaaaccagt	2160
15	tattgacgat	gaagattata	agaagttgca	tacagcaaat	atggtagcta	aatgctctaa	2220
	atotaagcag	attttaatat	caagacotcc	accattatta	tccattcata	tcaacagatc	2280
	cgtatttgat	ccaagaacgt	acatgattag	aaaaaataac	tcgaaagtat	tgtttaagtc	2340
	aacgttgaat	cttgccctt	ggtgttggtga	tattaatgaa	atcaatttgg	atgctcgttt	2400
	gccaatgtca	aaaaaggaaa	aagctgcgca	acaagattca	agtgaagatg	aaaacattgg	2460
20	cggtgaatac	tatacgaaat	tacatgaacg	cttcgagcag	gaatttgaag	acagcgagga	2520
	agaaaaagaa	tacgatgacg	cagaggggaa	ctatgcgtct	cattacaatc	ataccaagga	2580
	tatcagtaac	tatgatcccc	taaacggtga	agtogatggc	gtgacatccg	atgatgaaga	2640
	tgagtacatt	gaagaaaccg	atgcttttagg	gaatacaatc	aaaaaaagga	tcatagaaca	2700
	ttctgatgtt	gaaaacgaga	atgtaaaaga	taatgaagaa	ctgcaagaaa	tcgacaatgt	2760
25	gagccttgac	gaaccaaaga	tcaatgttga	agatcaacta	gaaacatcat	ctgatgagga	2820
	agatgttata	ccagctccac	ctatcaatta	tgotaggtca	ttttccacag	ttccagccac	2880
	tccattgaca	tattcattgc	gctctgtcat	tgttcaactac	ggtaccata	attatggtca	2940
	ttacattgca	tttagaaaat	acaggggttg	ttggtggaga	atatctgatg	agactgtgta	3000
	cgttgtggac	gaagctgaag	tcctttcaac	acccggtgta	tttatgttat	tttaogaata	3060
30	tgactttgat	gaagaaactg	ggaagatgaa	ggatgatttg	gaagctattc	agagtaataa	3120
	tgaagaagat	gatgaaaaag	agcaggagca	aaaaggagtc	caggagccaa	aggaaagcca	3180
	agagcaagga	gaaggtgaag	agcaagagga	aggtaagag	cagatgaagt	tcgagagAAC	3240
	agaagaccat	agagatattt	ctggtaaaga	tgtaaactaa	gctcgagcac	caccaccacc	3300
	accactgaga	tcgggtgct	aacaaagccc	gaaaggaagc	tgagttggct	gctgccaccg	3360
35	ctgagcaata	actagcataa	ccccttgggg	cctctaaacg	ggtcttgagg	ggttttttg	3419