



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 35 232 T2** 2007.10.11

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 774 004 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 35 232.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/FR95/01035**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 927 005.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1996/004387**

(86) PCT-Anmeldetag: **01.08.1995**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **15.02.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.05.1997**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **20.09.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **11.10.2007**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12N 15/57 (2006.01)**

**C12N 9/64 (2006.01)**

**C07K 16/40 (2006.01)**

**A61K 38/48 (2006.01)**

**C12N 5/10 (2006.01)**

(30) Unionspriorität:

**9409567 02.08.1994 FR**

(73) Patentinhaber:

**Aventis Pharma S.A., Antony, FR**

(74) Vertreter:

**derzeit kein Vertreter bestellt**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU,  
NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**DIU, Anita, F-94220 Charenton-le-Pont, FR;  
FAUCHEU, Chi, F-77184 Emervainville, FR;  
HERCEND, Thierry, F-94220 Charenton-le-Pont,  
FR; LALANNE, Jean-Louis, F-94120  
Fontenay-sous-Bois, FR; LIVINGSTON, J., David,  
Newton, MA 02160, US; SU, S.-S., Michael,  
Newton, MA 02159, US**

(54) Bezeichnung: **DNA-SEQUENZEN, DIE FÜR DIE MENSCHLICHE PROTEINE Tx UND Ty KODIEREN, DIE ICE GLEICHEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft eine DNA-Sequenz, die für ein neues menschliches Tx-Protein, das mit dem "Interleukin-1beta-Converting"-Enzym verwandt ist, das Protein Tx, ihr Herstellungsverfahren, pharmazeutische Verbindungen, die es enthalten, und ihre Anwendungen als Arzneimittel.

**[0002]** Interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ) ist ein entzündungsförderndes Cytokin, das an der Pathogenie von mehreren akuten oder chronischen Entzündungserkrankungen, wie der rheumatoiden Polyarthrit, Entzündungserkrankungen der Eingeweide oder septischem Schock beteiligt ist (Dinarello et al., 1992, Immunological Reviews, 127, 119-146).

**[0003]** Die menschlichen Monozyten und Makrophagen synthetisieren IL-1 $\beta$  in Form einer inaktiven 31 kDa großen Vorstufe (pIL-1 $\beta$ ). pIL-1 $\beta$  weist keine übliche Signalsequenz auf und kann nur nach Schneiden zwischen der Asparaginsäure 116 und dem Alanin 117 wirksam von der Zelle sezerniert werden. Dieses Schneiden, das zu der aktiven 17 kDa großen Form IL-1 $\beta$  führt, erfolgt mit einem spezifischen Enzym, das "Interleukin-1beta converting"-Enzym (ICE) genannt wird (Thornberry et al., 1992, Nature, 356, 768-774; Cerretti et al., 1992, Science, 256, 97-100). Dieses Enzym wurde beim Menschen und bei der Maus charakterisiert und kloniert (Nett et al., 1992, Journal of Immunology, 149, 3254-3259; Molineaux et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 1809-1813). Es handelt sich um eine einmalig vorkommende Cysteinprotease, die keine Homologie mit den anderen bekannten Thiolproteasen aufweist. Es weist auch eine bestimmte Spezifität für gewisse Asp-X-Peptidbindungen von pIL-1 $\beta$  auf.

**[0004]** Das Enzym ICE besteht aus zwei 20 kDa und 10 kDa großen Untereinheiten (p20 bzw. p10), die miteinander kombiniert sein müssen, um die Enzymaktivität zu gewährleisten. Diese Untereinheiten stammen von der proteolytischen Spaltung einer 45 kDa großen Proenzymform (p45). Das Enzym ICE selbst kann seine Vorstufe p45 oder die 30 kDa große Form p30, die nicht die 119 Aminosäuren des N-terminalen Teils des Proenzym aufweist, in die aktive p20 plus p10 spalten. Die vollständige Sequenz von p45 ist durch ihre cDNA sowie die Aminosäuresequenz charakterisiert worden (Thornberry et al., Zitat oben). Die Charakterisierung des Gens des menschlichen ICE ist beschrieben worden (Cerretti et al., 1994, Genomics, 20, 468-473).

**[0005]** In jüngeren Arbeiten wurde eine mögliche Rolle des ICE bei der Regulation des programmierten Zelltods, auch Apoptose genannt, nachgewiesen (Yuan et al., 1993, Cell, 75, 641-652). Das ICE weist nämlich 28% Homologie mit Ced-3, einem Protein aus *C. Elegans*, das an der Apoptose beteiligt ist, auf, und die Überexpression des Maus-ICE in Rattenfibroblasten löst Apoptose aus (Miura et al., 1993, Cell, 75, 653-660). Außerdem schützt die Expression des Proteins crmA, ein Virus-Serpin, das das ICE hemmt, in Ganglionneuronen von transfizierten Hühnern diese Zellen gegen Apoptosetod durch Suppression des Wachstumsfaktors (nerve growth factor) (Gagliardini et al., 1994, Science, 263, 826-828). Diese Beobachtungen legen nahe, daß das ICE oder Homologe dieses Proteins an der Regulation des programmierten Zelltods, wie er insbesondere bei degenerativen Neuronalerkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson sowie an Zerebralschämien beteiligt ist (Barinaga, M, Science, 259, 762, 1993).

**[0006]** Der Nachweis von neuen Proteinen, die mit dem ICE, das eine Rolle entweder bei der Reifung von IL-1 $\beta$  oder bei der Apoptose spielt, verwandt sind, kann zur Entwicklung von neuen Therapeutika oder Diagnostika für Situationen, an denen IL-1 $\beta$  oder Apoptose beteiligt sind, beitragen.

**[0007]** Ein Protein, das dem "IL-1beta-converting"-Enzym (ICE) ähnlich ist, wird vom Nedd2-Gen der Maus kodiert (Kumar et al., Genes & Dev. 8:1613-1626, 1994).

**[0008]** Cysteinproteasen derselben Familie sind nach dem Prioritätsdatum der vorliegenden Patentanmeldung beschrieben worden (Munday et al., J.Biol.Chem. 270; 15870-15876, Ausgabe von 30. Juni 1995).

**[0009]** Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues menschliches Tx-Protein mit ungefähr 52% Homologie zu der menschlichen Vorstufe p45 des ICE, das die Reifung der Vorstufe von IL-1 $\beta$  zum aktiven Cytokin verhindert. Das Protein Tx weist zwei unerwartete Funktionen auf: einerseits ist dies eine Protease, die insbesondere die Vorstufe p30 des ICE in die Untereinheiten p10 und p20 spalten kann, und zweitens kann es bei Zellen, zum Beispiel bei transfizierten Cos-Zellen, Apoptose induzieren.

**[0010]** Diese biologischen Eigenschaften gestatten es, die Verwendung des Proteins Tx bei der Behandlung von pathologischen Situationen, die auf IL-1 $\beta$  ansprechen oder bei denen Apoptose eintritt, vorzusehen.

**[0011]** Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein neues menschliches Protein Ty, das eine Homologie von über 70% mit dem Protein Tx aufweist. Das Protein Ty kann in Zellen, zum Beispiel in transfizierten Cos-Zellen, Apoptose induzieren. Bei dem Protein Ty handelt es sich um eine Protease, die sich intermolekular selbst spalten kann.

**[0012]** Die vorliegende Erfindung betrifft also eine DNA-Sequenz, die für ein menschliches Polypeptid codiert, das eine Proteaseaktivität aufweist, und die die Nukleotidsequenz der Sequenz SEQ ID Nr. 1 aufweist:

```

GCTCTTCC ACGCTGTAAA AAAGGACAGA GGCTGTCC T ATG GCA GAA GGC      53
                                     Met Ala Glu Gly
                                     1
20
AAC CAC AGA AAA AAG CCA CTT AAG GTG TTG GAA TCC CTG GGC AAA GAT      101
Asn His Arg Lys Lys Pro Leu Lys Val Leu Glu Ser Leu Gly Lys Asp
   5                10                15                20
25 TTC CTC ACT GGT GTT TTG GAT AAC TTG GTG GAA CAA AAT GTA CTG AAC      149
Phe Leu Thr Gly Val Leu Asp Asn Leu Val Glu Gln Asn Val Leu Asn
                25                30                35
30 TGG AAG GAA GAG GAA AAA AAG AAA TAT TAC GAT GCT AAA ACT GAA GAC      197
Trp Lys Glu Glu Glu Lys Lys Lys Tyr Tyr Asp Ala Lys Thr Glu Asp
                40                45                50
35 AAA GTT CGG GTC ATG GCA GAC TCT ATG CAA GAG AAG CAA CGT ATG GCA      245
Lys Val Arg Val Met Ala Asp Ser Met Gln Glu Lys Gln Arg Met Ala
   35                55                60                65
40 GGA CAA ATG CTT CTT CAA ACC TTT TTT AAC ATA GAC CAA ATA TCC CCC      293
Gly Gln Met Leu Leu Gln Thr Phe Phe Asn Ile Asp Gln Ile Ser Pro
   70                75                80

```

	AAT AAA AAA GCT CAT CCG AAT ATG GAG GCT GCA CCA CCT GAG TCA GGA	341
	Asn Lys Lys Ala His Pro Asn Met Glu Ala Gly Pro Pro Glu Ser Gly	
	85 90 95 100	
5	GAA TCT ACA GAT GCC CTC AAG CTT TGT CCT CAT GAA GAA TTC CTG AGA	389
	Glu Ser Thr Asp Ala Leu Lys Leu Cys Pro His Glu Glu Phe Leu Arg	
	105 110 115	
	CTA TGT AAA GAA AGA GCT GAA GAG ATC TAT CCA ATA AAG GAG AGA AAC	437
10	Leu Cys Lys Glu Arg Ala Glu Glu Ile Tyr Pro Ile Lys Glu Arg Asn	
	120 125 130	
	AAC CGC ACA CGC CTG GCT CTC ATC ATA TGC AAT ACA GAG TTT GAC CAT	485
	Asn Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ile Ile Cys Asn Thr Glu Phe Asp His	
15	135 140 145	
	CTG CCT CCG AGG AAT GGA GCT GAC TTT GAC ATC ACA GGG ATG AAG GAG	533
	Leu Pro Pro Arg Asn Gly Ala Asp Phe Asp Ile Thr Gly Met Lys Glu	
	150 155 160	
20	CTA CTT GAG GGT CTG GAC TAT AGT GTA GAT GTA GAA GAG AAT CTG ACA	581
	Leu Leu Glu Gly Leu Asp Tyr Ser Val Asp Val Glu Glu Asn Leu Thr	
	165 170 175 180	
25	GCC AGG GAT ATG GAG TCA GCG CTG AGG GCA TTT GCT ACC AGA CCA GAG	629
	Ala Arg Asp Met Glu Ser Ala Leu Arg Ala Phe Ala Thr Arg Pro Glu	
	185 190 195	
	CAC AAG TCC TCT GAC AGC ACA TTC TTG GTA CTC ATG TCT CAT GGC ATC	677
30	His Lys Ser Ser Asp Ser Thr Phe Leu Val Leu Met Ser His Gly Ile	
	200 205 210	
	CTG GAG GGA ATC TGC GGA ACT GTG CAT GAT GAG AAA AAA CCA GAT GTG	725
	Leu Glu Gly Ile Cys Gly Thr Val His Asp Glu Lys Lys Pro Asp Val	
35	215 220 225	
	CTG CTT TAT GAC ACC ATC TTC CAG ATA TTC AAC AAC CGC AAC TGC CTC	773
	Leu Leu Tyr Asp Thr Ile Phe Gln Ile Phe Asn Asn Arg Asn Cys Leu	
	230 235 240	
40	AGT CTG AAG GAC AAA CCC AAG GTC ATC ATT GTC CAG GCC TGC AGA GGT	821
	Ser Leu Lys Asp Lys Pro Lys Val Ile Ile Val Gln Ala Cys Arg Gly	
	245 250 255 260	
45		

	GCA AAC CGT GGG GAA CTG TGG GTC AGA GAC TCT CCA GCA TCC TTG GAA	869
	Ala Asn Arg Gly Glu Leu Trp Val Arg Asp Ser Pro Ala Ser Leu Glu	
	265 270 275	
5	GTG GCC TCT TCA CAG TCA TCT GAG AAC CTG GAG GAA GAT GCT GTT TAC	917
	Val Ala Ser Ser Gln Ser Ser Glu Asn Leu Glu Glu Asp Ala Val Tyr	
	280 285 290	
	AAG ACC CAC GTG GAG AAG GAC TTC ATT GCT TTC TGC TCT TCA ACG CCA	965
10	Lys Thr His Val Glu Lys Asp Phe Ile Ala Phe Cys Ser Ser Thr Pro	
	295 300 305	
	CAC AAC GTG TCC TGG AGA GAC AGC ACA ATG GGC TCT ATC TTC ATC ACA	1013
	His Asn Val Ser Trp Arg Asp Ser Thr Met Gly Ser Ile Phe Ile Thr	
15	310 315 320	
	CAA CTC ATC ACA TGC TTC CAG AAA TAT TCT TGG TGC TGC CAC CTA GAG	1061
	Gln Leu Ile Thr Cys Phe Gln Lys Tyr Ser Trp Cys Cys His Leu Glu	
	325 330 335 340	
20	GAA GTA TTT CGG AAG GTA CAG CAA TCA TTT GAA ACT CCA AGG GCC AAA	1109
	Glu Val Phe Arg Lys Val Gln Gln Ser Phe Glu Thr Pro Arg Ala Lys	
	345 350 355	
	GCT CAA ATG CCC ACC ATA GAA CGA CTG TCC ATG ACA AGA TAT TTC TAC	1157
25	Ala Gln Met Pro Thr Ile Glu Arg Leu Ser Met Thr Arg Tyr Phe Tyr	
	360 365 370	
	CTC TTT CCT GGC AAT TGAAAATGGA AGCCACAAGC AGCCCAGCCC TCCTTAATCA	1212
30	Leu Phe Pro Gly Asn	
	375	
	ACTTCAAGGA GCACCTTCAT TAGTACAGCT TGCATATTTA ACATTTTGTA TTTCATATAA	1272
35	AGTGAAGACA AAAAAAAAAA	1291

sowie eine DNA-Sequenz, die für ein menschliches Polypeptid codiert, die fähig ist, den Zelltod zu induzieren, und die die Nukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 1 oben aufweist.

**[0013]** Die Erfindung betrifft insbesondere eine DNA-Sequenz, die für ein menschliches Polypeptid codiert, das eine Proteaseaktivität aufweist und fähig ist, den Zelltod zu induzieren, und die die Nukleotidsequenz gemäß Sequenz SEQ ID Nr. 1 oben aufweist.

**[0014]** Die DNA-Sequenz oben, die für ein Protein mit 377 Aminosäuren codiert, ist eine cDNA-Sequenz, die durch Amplifikation mittels PCR mit Hilfe der Oligonukleotide, die sich von der ICE-Sequenz und der Sequenz der zuvor identifizierten homologen Gene ableiten, unter den weiter unten näher erläuterten Arbeitsbedingungen erhalten werden kann, und zwar ausgehend von der RNA von Monozyten, die durch LPS oder Granulozyten oder Plazenta des Menschen aktiviert worden sind.

**[0015]** Der Nachweis der Proteaseaktivität sowie der Fähigkeit, den Zelltod zu induzieren, sind weiter unten im Versuchsteil veranschaulicht.

**[0016]** Das Patent beschreibt insbesondere eine DNA-Sequenz, die für ein menschliches Polypeptid codiert, das eine Proteaseaktivität aufweist und fähig ist, den Zelltod zu induzieren, und die bei Nukleotid 42 beginnt und bei Nukleotid 1172 der Sequenz SEQ ID Nr. 1 aufhört, sowie die DNA-Sequenzen, die mit dieser Sequenz hybridisieren und die gleiche Funktion aufweisen.

**[0017]** Der Begriff "Sequenzen, die hybridisieren" soll auch diejenigen DNA-Sequenzen beinhalten, die unter hoch stringenten Bedingungen hybridisieren und die für ein Polypeptid mit der gleichen Aktivität codieren. Die Stringenzbedingungen beinhalten zum Beispiel gemäß Maniatis et al., Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, eine 18stündige Hybridisierung bei 65°C in einer Lösung aus 5 × SSPE, 10 × Den-

hardt, 100 µg/ml DNase, 1% SDS, woran sich 3 5minütige Waschschrirte mit 2 × SSC, 0,05% SDS und dann 3 15minütige Waschschrirte bei 65°C in 1 × SSC, 0,1% SDS, anschließen.

**[0018]** Die Kenntnis der Sequenz SED ID Nr. 1 ermöglicht es, die vorliegende Erfindung zum Beispiel mittels bekannten chemischen Syntheseverfahren oder mittels Durchmusterung einer Genombibliothek oder einer cDNA-Bibliothek mit Hilfe von Syntheseoligonukleotidsonden mit bekannten Hybridisierungstechniken nachzuarbeiten.

**[0019]** Die Erfindung betrifft auch ein menschliches Polypeptid, das eine Proteaseaktivität aufweist und fähig ist, den Zelltod zu induzieren, und das die Aminosäuresequenz der Sequenz SED ID Nr. 2 aufweist

```

Met Ala Glu Gly Asn His Arg Lys Lys Pro Leu Lys Val Leu Glu Ser
5   1                               5           10           15

Leu Gly Lys Asp Phe Leu Thr Gly Val Leu Asp Asn Leu Val Glu Gln
                20                   25                   30

10 Asn Val Leu Asn Trp Lys Glu Glu Glu Lys Lys Lys Tyr Tyr Asp Ala
    35                   40                   45

Lys Thr Glu Asp Lys Val Arg Val Met Ala Asp Ser Met Gln Glu Lys
    50                   55                   60

15 Gln Arg Met Ala Gly Gln Met Leu Leu Gln Thr Phe Phe Asn Ile Asp
    65                   70                   75                   80

Gln Ile Ser Pro Asn Lys Lys Ala His Pro Asn Met Glu Ala Gly Pro
20                   85                   90                   95

Pro Glu Ser Gly Glu Ser Thr Asp Ala Leu Lys Leu Cys Pro His Glu
    100                   105                   110

25 Glu Phe Leu Arg Leu Cys Lys Glu Arg Ala Glu Glu Ile Tyr Pro Ile
    115                   120                   125

Lys Glu Arg Asn Asn Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ile Ile Cys Asn Thr
    130                   135                   140

30 Glu Phe Asp His Leu Pro Pro Arg Asn Gly Ala Asp Phe Asp Ile Thr
    145                   150                   155                   160

Gly Met Lys Glu Leu Leu Glu Gly Leu Asp Tyr Ser Val Asp Val Glu
35                   165                   170                   175

Glu Asn Leu Thr Ala Arg Asp Met Glu Ser Ala Leu Arg Ala Phe Ala
    180                   185                   190

40 Thr Arg Pro Glu His Lys Ser Ser Asp Ser Thr Phe Leu Val Leu Met
    195                   200                   205

Ser His Gly Ile Leu Glu Gly Ile Cys Gly Thr Val His Asp Glu Lys
    210                   215                   220

45

```

Lys Pro Asp Val Leu Leu Tyr Asp Thr Ile Phe Gln Ile Phe Asn Asn  
 225 230 235 240  
 Arg Asn Cys Leu Ser Leu Lys Asp Lys Pro Lys Val Ile Ile Val Gln  
 5 245 250 255  
 Ala Cys Arg Gly Ala Asn Arg Gly Glu Leu Trp Val Arg Asp Ser Pro  
 260 265 270  
 10 Ala Ser Leu Glu Val Ala Ser Ser Gln Ser Ser Glu Asn Leu Glu Glu  
 275 280 285  
 Asp Ala Val Tyr Lys Thr His Val Glu Lys Asp Phe Ile Ala Phe Cys  
 290 295 300  
 15 Ser Ser Thr Pro His Asn Val Ser Trp Arg Asp Ser Thr Met Gly Ser  
 305 310 315 320  
 Ile Phe Ile Thr Gln Leu Ile Thr Cys Phe Gln Lys Tyr Ser Trp Cys  
 20 325 330 335  
 Cys His Leu Glu Glu Val Phe Arg Lys Val Gln Gln Ser Phe Glu Thr  
 340 345 350  
 25 Pro Arg Ala Lys Ala Gln Met Pro Thr Ile Glu Arg Leu Ser Met Thr  
 355 360 365  
 Arg Tyr Phe Tyr Leu Phe Pro Gly Asn  
 370 375  
 30

sowie die Allele und Analoge dieser Sequenz.

**[0020]** Der Begriff "Allele und Analoge" beinhaltet auch die durch Substitution, Deletion oder Addition von einer oder mehreren Aminosäuren modifizierten Sequenzen, solange diese Produkte noch dieselbe Funktion aufweisen.

**[0021]** Die Erfindung betrifft insbesondere das Polypeptid mit der Aminosäuresequenz der Sequenz SEQ ID Nr. 2, das Protein Tx genannt wird.

**[0022]** Einer der Aspekte der Erfindung betrifft auch ein erfindungsgemäßes Polypeptid, wie es durch Expression einer DNA, die für die Aminosäuresequenz der Sequenz SEQ ID Nr. 2 codiert, in einer Wirtszelle erhalten wird.

**[0023]** Wird das erfindungsgemäße Polypeptid durch Expression an einer Wirtszelle erhalten, so erfolgt dies nach bekannten Gentechnik- und Zellkulturverfahren.

**[0024]** Die Expression kann in einer prokaryontischen Zelle, z.B. E. coli, oder in einer eukaryontischen Zelle, z.B. einer Cos-Zelle, durchgeführt werden, die die DNA-Sequenz, die für das erfindungsgemäße Polypeptid codiert, sowie stromaufwärts eine geeignete Promotersequenz enthält.

**[0025]** Die Erfindung betrifft insbesondere ein erfindungsgemäßes Polypeptid, wie es durch Expression in einer eukaryontischen Wirtszelle erhalten wird.

**[0026]** Die Erfindung betrifft ganz besonders ein erfindungsgemäßes Polypeptid, dessen Proteaseaktivität der Fähigkeit, das "IL-1beta"-Converting"-Enzym reifen zu lassen, entspricht. Ein Beispiel für die Bestimmung dieser bestimmten Proteaseaktivität ist weiter unten beschrieben.

**[0027]** Die Erfindung betrifft auch einen Expressionsvektor, der eine DNA-Sequenz enthält, die für ein menschliches Polypeptid codiert, das eine Proteaseaktivität aufweist und fähig ist, den Zelltod zu induzieren, sowie eine Wirtszelle, die mit einem oben genannten Vektor transformiert ist.

**[0028]** Bei den Expressionsvektoren handelt es sich um bekannte Vektoren, mit denen das Protein unter der Kontrolle eines geeigneten Promoters exprimiert werden kann. Bei prokaryontischen Zellen kann es sich bei dem Promoter zum Beispiel um den lac-Promoter, den trp-Promoter, den tac-Promoter, den  $\beta$ -Lactamase-Promoter oder den PL-Promoter handeln. Bei Hefezellen kann es sich bei dem Promoter zum Beispiel um den PGK-Promoter oder den AD-Promoter handeln. Bei Säugetierzellen kann es sich bei dem Promoter zum Beispiel um den SV40-Promoter oder um Adenoviren-Promoter handeln. Vektoren des Baculovirustyps können auch für die Expression in Insektenzellen verwendet werden.

**[0029]** Bei den Wirtszellen handelt es sich zum Beispiel um prokaryontische Zellen oder um eukaryontische Zellen. Bei den prokaryontischen Zellen handelt es sich zum Beispiel um *E. coli*, *Bacillus* oder *Streptomyces*. Zu den eukaryontischen Wirtszellen zählen Hefen sowie Zellen von höheren Organismen, zum Beispiel Säugetierzellen oder Insektenzellen. Bei den Säugetierzellen handelt es sich zum Beispiel um Fibroblasten wie Hamster-CHO- oder -BHK-Zellen und Affen-Cos-Zellen. Bei den Insektenzellen handelt es sich zum Beispiel um SF9-Zellen.

**[0030]** Die Erfindung betrifft ein Verfahren, bei dem das Tx-Protein in einer Wirtszelle exprimiert wird, die mit einer DNA transformiert ist, die für die Aminosäuresequenz der Sequenz SEQ ID Nr. 2 codiert, und insbesondere ein Verfahren, bei dem die Wirtszelle eine eukaryontische Zelle ist.

**[0031]** Das Patent beschreibt auch Antikörper, die gegen das erfindungsgemäße Polypeptid gerichtet sind.

**[0032]** Die erfindungsgemäßen polyklonalen oder monoklonalen Antikörper können nach den bekannten Verfahren hergestellt werden und können zum Beispiel für die quantitative Bestimmung des Tx-Proteins, zum Beispiel in einem ELISA-Test, sowie als Diagnostika verwendet werden.

**[0033]** Das neue erfindungsgemäße Tx-Protein weist bemerkenswerte biologische Eigenschaften auf, insbesondere eine Proteaseaktivität, speziell die Fähigkeit, das "Il-1beta-Converting"-Enzym reifen zu lassen sowie die Fähigkeit, den Zelltod zu induzieren, wie dies in den weiter unten angeführten Ergebnissen gezeigt wird.

**[0034]** Diese biologischen Eigenschaften bedeuten, daß das erfindungsgemäße Tx-Protein zum Beispiel für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen, bei der Wundheilung oder bei der Verringerung von Nebenwirkungen von Strahlenbehandlungen, an denen Il-1 $\beta$  beteiligt ist, oder zum Beispiel auf dem Gebiet der Karzinome und der Infektionen, bei denen Zelltod auftritt, verwendet werden kann.

**[0035]** Die vorliegende Erfindung betrifft daher das erfindungsgemäße Polypeptid als Arznei.

**[0036]** Die Erfindung betrifft auch pharmazeutische Zusammensetzungen, die als Wirkstoff eine oben definierte Arznei umfassen, und sie betrifft insbesondere pharmazeutische Zusammensetzungen zur Modulation der Produktion von Il-1beta oder zur Modulation des Zelltods.

**[0037]** Der Wirkstoff kann für die Herstellung der oben genannten pharmazeutischen Zusammensetzungen in die üblichen Grundstoffe eingearbeitet werden. Die Zusammensetzungen können parenteral, oral oder lokal verabreicht werden.

**[0038]** Mit den erfindungsgemäßen Polypeptiden sind auch neue Therapeutika, die aus Hemmern dieser Polypeptide bestehen und ihre Verwendung als Arznei denkbar, zum Beispiel bei der Behandlung von Entzündung, die mit Autoimmunerkrankungen einhergeht, septischem Schock oder neurodegenerativen Erkrankungen.

**[0039]** Die Erfindung betrifft auch eine DNA-Sequenz, die mit der DNA-Sequenz, die bei Nukleotid 42 der Sequenz SEQ ID Nr. 1 beginnt und bei Nukleotid 1172 der Sequenz SEQ ID Nr. 1 aufhört, hybridisiert und die dieselbe Funktion aufweist.

**[0040]** Die Hybridisierung erfolgt zum Beispiel über Nacht bei 65°C in 5  $\times$  SSC Puffer, 10  $\times$  Denhardt, 100  $\mu$ g/ml Lachssperma-DNA, und 1% SDS. Anschließend wird zum Beispiel zweimal 30 Minuten lang bei 60°C in 1  $\times$  SSC Puffer, 0,1% SDS gewaschen.

**[0041]** Die Erfindung betrifft insbesondere die DNA-Sequenz, die für ein Polypeptid codiert, das eine Proteaseaktivität aufweist und fähig ist, den Zelltod zu induzieren, und die die Nukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 22 aufweist, insbesondere die Sequenz, die bei Nukleotid 104 der Sequenz SEQ ID Nr. 22 beginnt und bei Nukleotid 1195 dieser Sequenz aufhört.

**[0042]** Die obige DNA-Sequenz SEQ ID Nr. 22, die für ein Protein mit 364 Aminosäuren codiert, ist eine cDNA-Sequenz, die zum Beispiel durch Amplifikation mittels PCR mit von der Sequenz Tx-cDNA (SEQ ID Nr. 1) abgeleiteten Oligonukleotiden erhalten werden kann, und zwar ausgehend von cDNA der Ratte oder der menschlichen Plazenta. Ein genau beschriebenes Herstellungsbeispiel ist weiter unten im Versuchsteil angeführt. Aufgrund der Kenntnis der Sequenz SEQ ID Nr. 22 kann man die vorliegende Erfindung zum Beispiel mittels bekannten chemischen Syntheseverfahren oder Verfahren zur Durchmusterung von Genombanken oder cDNA-Banken mit Hilfe von Oligonukleotidsonden mittels Hybridisierungstechniken nacharbeiten.

**[0043]** Die Erfindung betrifft weiterhin ein menschliches Polypeptid, das eine Proteaseaktivität aufweist und fähig ist, den Zelltod zu induzieren, und das die Aminosäuresequenz der Sequenz SEQ ID Nr. 23 aufweist und Ty-Protein genannt wird.

**[0044]** Ein Aspekt der Erfindung betrifft auch ein erfindungsgemäßes Polypeptid, wie es durch Expression einer DNA, die für die Aminosäuresequenz der Sequenz SEQ ID Nr. 23 codiert, in einer Wirtszelle erhalten wird.

**[0045]** Die Erfindung betrifft auch die Wirtszellen, die Expressionsvektoren, mit denen das Ty-Protein exprimiert werden kann, und für die Beispiele oben für die Expression des Tx-Proteins angegeben wurden.

**[0046]** Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren, bei dem das Ty-Protein in einer Wirtszelle exprimiert wird, die mit einer DNA transformiert ist, die für die Aminosäuresequenz der Sequenz SEQ ID Nr. 23 codiert.

**[0047]** Die Erfindung betrifft auch polyklonale Antikörper oder monoklonale Antikörper, die gegen das Ty-Protein gerichtet sind.

**[0048]** Die Erfindung betrifft auch pharmazeutische Zusammensetzungen, die das Ty-Protein umfassen, als Arznei.

**[0049]** In den beigelegten Abbildungen sind gewisse Aspekte der Erfindung veranschaulicht:

**[0050]** [Abb. 1](#) ist eine Darstellung eines Southern-Blot-Nachweises von zu ICE homologen Sequenzen in der genomischen DNA des Menschen aus PBMCs, die mit den Restriktionsenzymen BglII (Bahn A), PstI (Bahn B), HindIII (Bahn C) bzw. BamHI (Bahn D) verdaut worden ist. Der Nachweis erfolgt durch Hybridisierung mit einer mit <sup>32</sup>P-markierten ICE-Exon-6-Sonde.

**[0051]** [Abb. 2](#) ist eine Darstellung der Nukleotidsequenz des Exons 6 des T2-Gens (SEQ ID Nr. 5).

**[0052]** [Abb. 3](#) ist eine Darstellung der Nukleotidsequenz der Tx-cDNA (SEQ ID Nr. 1) und der entsprechenden Aminosäuresequenz (SEQ ID Nr. 2).

**[0053]** [Abb. 4](#) ist eine Darstellung des Northern-Blot-Nachweises von Tx-mRNA in Geweben der Ratte (Bahn A), Thymus (Bahn B), Prostata (Bahn C), Testes (Bahn D), Ovarien (Bahn E), Dünndarm (Bahn F), Dickdarm (Bahn G) und peripheren Leukozyten (Bahn H). Der Nachweis erfolgt durch Hybridisierung mit einer mit <sup>32</sup>P-markierten "Tx-Exon-6"-Sonde.

**[0054]** [Abb. 5](#) ist eine Darstellung der Sekretion von reifem II-1β in Cos-1-Zellen, die konstitutiv pII-1β enthalten und die mit dem Vektor pcDL-SRα296, der ICE-p45 (Bahn 2) oder Tx (Bahn 3), dem pcDL-SRα296-Blankvektor (Bahn 4), dem pcDNAI/Amp-Blankvektor (Bahn 5), dem Vektor pcDNAI/Amp, der Tx (Bahn 6) oder ICE p30 (Bahn 7) enthält, transfiziert wurden, im Vergleich zu einer Kontrollkultur ohne DNA (Bahn 1). Die Bestimmung von reifem II-1β erfolgt in pg/ml Zellüberstand mittels ELISA (A: 16stündige Inkubation; B: 24stündige Inkubation).

**[0055]** [Abb. 6](#) ist eine Darstellung der Spaltung der Vorstufe ICE p30 in Cos-1-Zellen, die mit dem pcDL-SRα296-Blankvektor (Bahn A) oder mit dem Vektor pdDL-SRα296, der die mutierte Mutante T7-ICEp30C285S enthält (Bahn B) transfiziert wurden oder die mit dem Vektor pcDL-SRα296, der die markierte Mutante T7-ICEp30T285S enthält, und dem Vektor, der ICE p30 (Bahn C) oder ICE p45 (Bahn D) oder Tx

(Bahn E) enthält, cotransfiziert wurden. Der Nachweis erfolgt mittels Western-Blot mit dem Antikörper anti-T7 mit einer Kontrolle, die einer Transfektion mit dem Vektor pcDL-SR $\alpha$ 296, der nur Tx enthält, entspricht (Bahn F).

**[0056]** [Abb. 7](#) ist eine Darstellung der Induktion des Zelltods durch das Tx-Protein in Cos-1-Zellen, die mit dem pcDL-SR $\alpha$ 296-Blankvektor (7B) oder dem Vektor pcDL-SR $\alpha$ 296, der Tx (7C) oder ICE p45 (7D) enthält, transfiziert werden, im Vergleich zu einer Kontrollkultur ohne DNA (7A) nach 22stündiger Kultur (400fache Vergrößerung).

**[0057]** [Abb. 8](#) ist eine Darstellung der DNA von Cos-1-Zellen, die mit dem Vektor pcDL-SR $\alpha$ 296, der ICE p45 (Behn B) oder Tx (Bahn C) enthält oder mit dem Blankvektor (Bahn D) transfiziert wurden im Vergleich zu einer Kontrollkultur ohne DNA (Bahn A). Der Nachweis erfolgt durch Färbung mit BET nach Wanderung auf einem Agarosegel mit Größenmarkern für die DNA des Phagen Lambda, die mit HindIII (M1) verdaut wurde, sowie von DNA des Phagen  $\Phi$ X174, die mit HindIII verdaut wurde (M2).

**[0058]** [Abb. 9](#) ist eine Darstellung der Spaltung des mutierten Ty-Proteins (T7TY $\Delta$ 67C245S) in Cos-1-Zellen, die entweder mit dem pcDL-SR $\alpha$ 296-Blankvektor (Bahn B) oder dem pcDNA1/Amp-Blankvektor (Bahn C) oder dem Vektor pT7TY $\Delta$ 67C245S (Bahn E) transfiziert wurden oder mit dem Vektor pT7TY und dem Vektor pT7TY $\Delta$ 67C245S (Bahn F; 23 Stunden, und Bahn G; 43 Stunden) cotransfiziert wurden. Der Nachweis erfolgt mittels Western-Blot im Vergleich zu einer Kontrollkultur ohne DNA (Bahn A) und Molekulargewichtsmarkern (Bahn D; nicht nachweisbar).

**[0059]** Die folgenden Beispiele veranschaulichen die Erfindung, ohne diese jedoch einzuschränken.

#### Beispiel 1: Identifikation der Sequenz Tx

##### A – Nachweis von Genen, die zu dem Human-ICE homolog sind

**[0060]** ICE-homologe Gene wurden mittels Southern-Blot identifiziert, wobei man eine DNA-Probe verwendete, die dem Exon 6 des ICE-Gens entsprach.

##### a) Herstellung der ICE-Exon-6-Sonde

**[0061]** Die Borders des Exon 6 des menschlichen ICE sowie der vollständige Intron/Exon-Aufbau des menschlichen ICE-Gens sind bereits beschrieben (Cerretti et al., Zitat oben). Das Exon 6 (235 Bp) entspricht den Nukleotiden 635 bis 868 der ICE p45-cDNA-Sequenz des beschriebenen ICEs (Thornberry et al., Zitat oben).

**[0062]** Die ICE-Exon-6-Sonde wurde durch Amplifikation mittels PCR mit den folgenden Nukleotiden hergestellt:

ICE 6.5 : ACATGACTAC AGAGCTGGAG (SEQ ID N° 3)

ICE 6.3 : CACCACGGCA GGCCTGGATG (SEQ ID N° 4)

die unter Verwendung von veröffentlichten Daten (Thornberry et al., Zitat oben) ausgewählt wurden, synthetisiert und für die Amplifikation von RNA aus menschlichen Blutmonozyten mittels RT-PCR verwendet wurden, extrahiert und aufgereinigt mit Hilfe von einem "RNA-Kit"<sup>TM</sup> (Bioprobe), und zwar unter den folgenden Amplifikationsbedingungen: Biotaq-Enzym (Bioprobe), 30 Zyklen (94°C, 1 Min; 60°C, 1 Min; 72°C, 1 Min); PCR-Gerät: Perkin-Elmer (GeneAmp PCR System 9600).

**[0063]** Die erhaltene Exon-6-DNA wurde mittels Zentrifugation an einer Spin X Säule (Costar) aufgereinigt und mittels der "Random Priming"-Technik mit dem "Oligolabelling"-Kit (Pharmacia Biotech) mit <sup>32</sup>P markiert.

##### b) Hybridisierung mit genomischer DNA: Southern Blot

**[0064]** Die radioaktiv markierte ICE-Exon-6-Sonde wurde als Hybridisierungssonde für eine menschliche genomische DNA verwendet.

**[0065]** Die menschliche genomische DNA wurde ausgehend von peripheren Blutzellen (PBMCs) mit dem TurboGen-Kit (Invitrogen) hergestellt und anschließend mit dem Restriktionsenzym BglIII, PstI, HindIII bzw. BamHI (Boehringer Mannheim) geschnitten, auf einem 0,9%igen Agarosegel in 1 × TAE laufen gelassen, auf eine GeneScreen Plus (NEN Dupont) Nylonmembran übertragen und anschließend mit der ICE-Exon-6-Sonde hybridi-

disiert.

**[0066]** Bei den Hybridisierungsbedingungen handelt es sich um die von Maniatis et al. (Zitat oben) beschriebenen Bedingungen, die in 5 × SSPE, 10 × Denhardt, 100 µg/ml DNAss, 1% SDS über Nacht bei 65°C durchgeführt werden, woran sich aufeinanderfolgende Waschschriffe mit 2 × SSC, 0,05% SDS über 30 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend mit 1 × SSC, 0,1% SDS über 30 Minuten bei 65°C anschließt, was einer hohen Stringenz entspricht. Der Waschpuffer wird aus den folgenden Vorratslösungen hergestellt:

- 20 × SSC: wäßrige Lösung von 3M Natriumchlorid, 0,3 M Natriumcitrat,
- 10% SDS: wäßrige Lösung von Natriumdodecylsulfat.

**[0067]** Nach dem Waschen wird die Membran auf einen Film des Typs Hyperfilm-MP (Amersham) gegeben.

**[0068]** Wie in [Abb. 1](#) dargestellt, beobachtet man bei jedem der Restriktionsenzyme drei bis vier unterschiedliche Banden, die DNA-Fragmenten mit einer unterschiedlichen Größe entsprechen, die in manchen Fällen sehr wahrscheinlich Genen entsprechen, die zu ICE stark homolog sind, sich jedoch von letzteren unterscheiden, da ein einmalig vorkommendes Gen nur eine oder maximal zwei unterschiedliche Banden bei Hybridisierung mit einer Sonde, die einem einzigen Exon entspricht, ergeben kann.

## B – Klonierung von Genen mit ICE-Homologie

### a) Klonierung von genomischen Sequenzen mit ICE-Homologie

**[0069]** Um die oben erhaltenen verschiedenen DNA-Fragmente zu identifizieren, wurden die Fragmente von menschlicher genomischer DNA, die von peripheren Blutzellen (PBMCs) extrahiert wurde und anschließend mit dem Enzym HindIII (Boehringer Mannheim) verdaut wurde, mittels präparativer Elektrophorese auf 1,5%igem Agarosegel, 1 × TAE, gemäß den von Maniatis et al. (Zitat oben) beschriebenen Bedingungen aufgetrennt. Das Gel wurde in der Zone, die Molekulargewichten von unter 2,3 kB entsprach, in 20 Stücke geschnitten und anschließend wurde an der von jeder der Fraktionen eluierten DNA eine Amplifikation mittels PCR durchgeführt, und zwar mit den oben beschriebenen Oligonukleotiden ICE 6,5 (SEQ ID Nr. 3) und ICE 6,3 (SEQ ID Nr. 4) und unter den folgenden Amplifikationsbedingungen: 1 Min bei 94°C, 1 Min bei 55°C, 1 Min bei 72°C, 30 Zyklen, BioTaq-Polymerase.

**[0070]** Unter den oben genannten 20 Fraktionen hat man 8 Fraktionen, die die beste PCR-Amplifikation ergeben haben, aufbewahrt. Das amplifizierte Material wurde mit dem Enzym T4-DNA-Ligase mit dem TA-Kloning Kit (Invitrogen) nach den Anweisungen des Zulieferers in den Vektor pCRII kloniert und mit der Technik von Sanger mit dem Enzym Sequenase unter Verwendung des Elektrophoresematerials Macrophor (Pharmacia System) sequenziert. Die Sequenzen, die bestimmt worden waren, wurden mittels GCG-Software analysiert (Devereux et al. *Nucleic Acids Research* 12, 387-391 (1984)).

**[0071]** Unter den erhaltenen Nukleotidsequenzen wurde eine Sequenz mit der Bezeichnung T2 identifiziert, die 90% Identität auf Nukleotidebene mit der ICE-Exon-6-Sequenz aufweist.

**[0072]** Die Nukleotidsequenz T2 weist über die Gesamtheit des Exon 6 (SEQ ID Nr. 5) ein offenes Leseraster auf, das in [Abb. 2](#) dargestellt ist und aufgrund dessen nun versucht, Messenger-RNAs, die für ein T2-Protein codieren, zu identifizieren und die T2 entsprechende cDNA zu klonieren.

### b) Klonierung von ICE-homologer cDNA

**[0073]** Die Gesamt-RNAs wurden aus Monozyten, die 18 Stunden lang mit LPS aktiviert worden waren oder aus Plazenta oder aus aus peripherem Blut isolierten granulären Leukozyten extrahiert und aufgereinigt, und zwar mit einem RNA Kit™ (Bioprobe). Jede entsprechende cDNA wurde mit einem Poly-dT-Oligonukleotid und dem Enzym reverse Transkriptase unter Verwendung des GeneAmp RNA PCR kit (Perkin Elmer) nach den Anweisungen des Zulieferers synthetisiert und anschließend mittels PCR mit den beiden folgenden Oligonukleotiden amplifiziert:

T2.A : CTACAGAGCTGGAGGCATTTGCT (SEQ ID N° 6)

das in der Codiersequenz des Exon 6 von T2 ausgewählt wurde, um spezifisch eine Sequenz des T2-Typs, jedoch nicht eine ICE-Sequenz, zu amplifizieren, sowie

ICE45.3 TTAATGTCCTGGGAAGAGGTAGAA (SEQ ID N° 7)

das aus den 3'-terminalen Ende der Codierregion der cDNA des ICE (Komplementärstrang) ausgewählt wurde.

**[0074]** Ausgehend von jedem der 3 RNA-Präparate wurde unter den folgenden Amplifikationsbedingungen: 30 Sek. bei 94°C, 30 Sek. bei 60°C, 30 Sek. bei 72°C, 30 Zyklen mit dem GeneAmp RNA PCR Kit (Perkin Elmer) ein ungefähr 600 Basenpaare langes Fragment erhalten. Das Fragment wurde mit dem TA cloning Kit (Invitrogen) kloniert und wie oben beschrieben sequenziert. Die Nukleotidsequenz, die so bestimmt worden war, entspricht keiner erwarteten T2-cDNA, sondern einer neuen cDNA, die Tx genannt wurde.

#### C – Identifikation der Tx-cDNA

##### a) Bestimmung der Konsensussequenz der Tx-cDNA

**[0075]** Die Nukleotidsequenzen der 5'- und 3'-terminalen Enden der Tx-cDNA wurden mit dem "anchored"-PCR-Verfahren erhalten, und zwar ausgehend von einer Plazenta-cDNA.

**[0076]** Das 5'-terminale Ende der Tx-cDNA wurde mit dem "5'-Race-Ready"-cDNA-Kit (Human Quick-Clone cDNA) (Clontech) und den folgenden Amplifikationsoligonukleotiden amplifiziert:

TxPCR5A : GAGGCAGTTG CGGTTGTTGA A (SEQ ID N° 8)

TxPCR5B : CTCTGACCCA CAGTTCCCCA C (SEQ ID N° 9)

**[0077]** Das 3'-terminale Ende der Tx-cDNA wurde mit dem 3'-RACE-System-Kit (Gibco-BRL) und den folgenden Amplifikationsoligonukleotiden amplifiziert:

TxA : AACTGTGCAT GATGAGA (SEQ ID N° 10)

TxB : AGATGCTGTG TACAAGACC (SEQ ID N° 11)

**[0078]** Diese beiden Primer-Paare wurden ausgehend von der oben erhaltenen Tx-Partialsequenz definiert.

**[0079]** Die erhaltenen Amplifikationsfragmente wurden anschließend mit dem TA Cloning Kit (Invitrogen) und den oben angegebenen Sequenzen kloniert.

**[0080]** Die Nukleotidsequenzen wurden mit den Oligonukleotiden TxA (SEQ ID Nr. 10) und TxB (SEQ ID Nr. 11) oben und den folgenden Oligonukleotiden verifiziert:

**TxC :** GCCTGGACAA TGATGAC (SEQ ID N° 12)

**5 TxD :** TGATGAAGAT AGAGCCC (SEQ ID N° 13)

**Tx1 :** CGGGTCATGG CAGACTC (SEQ ID N° 14)

**Tx2 :** GTTTGAAGAA GCATTTG (SEQ ID N° 15)

10

**Tx3 :** CCTGAGTCAG GAGAATC (SEQ ID N° 16)

**Tx4 :** AGTCTCAGGA ATTCTTC (SEQ ID N° 17)

**15 Tx5 :** AGCTGACTTT GACATCA (SEQ ID N° 18)

**Tx6 :** GCGCTGACTC CATATCC (SEQ ID N° 19)

wobei diese Oligonukleotide aus der Tx-Codiersequenz (Codierstrang oder Komplementärstrang) gewählt wurden.

**[0081]** Durch Assemblierung der erhaltenen Sequenzen erhält man die Konsensus-Nukleotidsequenz der Tx-cDNA (SEQ ID Nr. 1), die in [Abb. 3](#) dargestellt ist. Die Sequenz, die auf diese Art bestimmt wurde, umfaßt 1291 Nukleotide und schließt mit einer Polyadenylierungssequenz ab. Sie stellt ein offenes Leseraster dar, das mit einem Initiations-Methionin beim Nukleotid 42 beginnt und mit einem Terminationscodon beim Nukleotid 1172 aufhört. So ergibt sich ein offenes Leseraster mit 1131 Nukleotiden, das für ein Protein mit 377 Aminosäuren codiert.

## B – Klonierung der Tx-cDNA-Codierregion:

**[0082]** Die Tx-cDNA-Codierregion (SEQ ID Nr. 1) wurde mittels RT-PCR amplifiziert und zwar ausgehend von Gesamt RNA von Monozyten, von Granulozyten oder von der Plazenta, wobei man die folgenden Oligonukleotide verwendete:

TxP5 : CGCGGATCCACCATGGCAGAAGGCAACCACAGA (SEQ ID N° 20)

TxP3 : GGCTCTAGACTCGAGTTATCAATTGCCAGGAAAGAGGTA (SEQ ID N° 21)

**[0083]** Diese Amplifikations-Primer wurden gemäß der oben bestimmten Tx-cDNA-Konsensussequenz (oder dem Komplementärstrang) ausgewählt und dadurch synthetisiert, daß man für das Oligonukleotid TxP5 die Klonierungsstellen BamHI und NcoI und für das Oligonukleotid TxP3 die Klonierungsstellen XbaI und XhoI hinzufügte.

**[0084]** Das erhaltene Amplifikationsprodukt, das eine Länge von ungefähr 1150 Basenpaaren aufweist, wurde mit den Enzymen BamHI und XbaI (Boehringer Mannheim) verdaut und mit dem Amersham-Ligationskit in den zuvor mit demselben Restriktionsenzymen BamHI und XbaI verdauten Vektor pcDNA1/Amp (Invitrogen) kloniert. Das Klonierungsprodukt wurde vollständig an beiden Strängen sequenziert, und zwar mit den oben beschriebenen Oligonukleotiden TxA, TxB, TxC, TxD, Tx1, Tx2, Tx3, Tx4, Tx5 und Tx6.

**[0085]** Für jede verwendete Ausgangs-RNA ist die erhaltene Nukleotidsequenz identisch mit der oben genannten Tx-cDNA-Konsensussequenz (SEQ ID Nr. 1). Man beobachtet also für die verschiedenen verwendeten Gewebe, die von verschiedenen Einzelorganismen stammen, keinen Unterschied.

**[0086]** Die Codierregion der Tx-cDNA codiert für das Tx-Protein, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz (SEQ ID Nr. 2) in [Abb. 3](#) dargestellt ist. Die Sequenz des Tx-Proteins umfaßt 377 Aminosäuren und weist ein berechnetes Molekulargewicht von 43,26 kDa auf.

**[0087]** Die Sequenzhomologie des Tx-Proteins mit der Vorstufe ICE p45 beträgt maximal 52% auf Aminosäureebene, wobei Diskontinuitäten in Alignment der Sequenzen eingeführt wurden.

**[0088]** Ein Muster von E. coli XL-1 blue mit der Tx-cDNA-Codierregion (SEQ ID Nr. 1) in dem Vektor pcDNA1/Amp (cDNA Tx/pcDNAU 13/07/94) wurde am 29. Juli 1994 unter der Nummer I-1462 beim CNCM hinterlegt.

## C – Expression der Tx-mRNA in verschiedenen menschlichen Geweben:

**[0089]** Die Expression der mRNA, die für das Tx-Protein codiert, wurde in acht unterschiedlichen Geweben mittels Northern Blot untersucht, und zwar mit einer DNA-Sonde, die demjenigen Teil von Tx entspricht, der mit dem ICE-Exon 6 ("Tx exon 6") ein Alignment ergibt. Diese Sonde entspricht den Nukleotiden 595 bis 811 der SEQ ID Nr. 1.

**[0090]** Die Sonde "Tx exon 6" wurde dadurch hergestellt, daß man diese Sequenz ausgehend von dem Plasmid, das die Tx-cDNA enthält, amplifiziert, wobei man als Primer die oben genannten Oligonukleotide: T2.A (SEQ ID Nr. 6) und TxC (SEQ ID Nr. 12) verwendete.

**[0091]** Diese Sonde wurde mit dem "Random Priming"-Verfahren mit dem Oligolabelling Kit (Pharmacia Bio-Tech) mit <sup>32</sup>P markiert und anschließend für den Nachweis von Tx mRNAs durch Hybridisierung auf einer Membran, die 2 µg polyA+ – RNA der jeweiligen verschiedenen menschlichen Gewebe auf einer Multiple Tissue Northern Blot II Membran (Clontech) enthielt, verwendet, wobei man unter den von Zulieferer angegebenen Hybridisierungsbedingungen arbeitete.

**[0092]** Wie in [Abb. 4](#) dargestellt wird in den meisten geprüften Geweben ein mRNA-Signal nachgewiesen, wobei die Intensitäten schwanken. Periphere Blutleukozyten (H) ergeben das stärkste Signal. Mittelstarke Signale erhält man mit der Ratte (A), dem Dünndarm (F), dem Thymus (B) und den Ovarien (E). Bei der Prostata (C) und beim Dickdarm (G) erhält man ein sehr schwaches Signal, und keinerlei Signal wird schließlich und endlich in der mRNA der Testes (D) nachgewiesen.

**[0093]** Die für das Tx-Protein codierende mRNA wird also in zahlreichen Geweben, insbesondere in den Blutzellen, exprimiert.

## Beispiel 2: Funktionsstudie des Tx-Proteins

A – Spaltung von pre-IL-1 $\beta$ 

**[0094]** Die Fähigkeit des Tx-Proteins, gegebenenfalls die Vorstufe des menschlichen IL-1 $\beta$  zu spalten, wurde in einem Transfektionssystem in eukaryontische Zellen geprüft, wobei jeweils einer der Expressionsvektoren pcDNA1/Amp und pcDL-SR $\alpha$ 296 verwendet wurde.

**[0095]** Zuerst wurde die Tx-cDNA-Codierregion (SEQ ID Nr. 1) in die BamHI- und XbaI-Stellen des eukaryontischen Expressionvektors pcDNA1/Amp (Invitrogen) kloniert. Nach Verdauung mit den Enzymen BamHI und XbaI wurde ein ungefähr 1150 große Basenpaare großes Insert isoliert und dann aufgereinigt. Die Restriktionsstellen der Enden wurden mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase (Boehringer Mannheim) aufgefüllt. Die erhaltene cDNA wurde mit Hilfe eines Ligationskits (Amersham) in den Vektor pcDL-SR $\alpha$ 296 (Takebe et al., Molecular and Cellular Biology, Vol 8, 466, 1988) subkloniert, wobei dieser Vektor mit dem Enzym XbaI geöffnet worden war und die Enden anschließend mit T4-DNA-Polymerase aufgefüllt worden waren. Nach Aufreinigung mit dem Plasmid-Maxi-Kit (QIAGEN) erhielt man Präparate von Tx-Plasmid-DNA in den beiden Vektoren.

**[0096]** Bei den für die Transfektion verwendeten eukaryontischen Zellen handelt es sich um eine Cos-1-Zelllinie, die pIL-1 $\beta$  konstitutiv exprimiert und die durch Transfektion eines Plasmids, das das Gen des menschlichen pIL-1 $\beta$  enthält, erhalten wurde. Die Synthese von pIL-1 $\beta$  wird in dieser Linie dadurch aufrechterhalten, daß man die Zellen in Anwesenheit von 0,5 mg/ml G-418-Sulfat im Kulturmedium DMEM, 10% FKS, Glutamin, P/S, Pyruvat, HEPES kultiviert.

**[0097]**  $3 \times 10^6$  Cos-1-Zellen werden bei 37°C in feuchter Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> in Petrischalen inkubiert und mit 15  $\mu$ g Plasmid-DNA, die zuvor mit 200  $\mu$ l DEAE-Dextran vermischt und vor dem Hinzufügen in die Schalen mit 4 ml PBS verdünnt wurde, transfiziert. Nach 30minütiger Inkubation der Zellen bei 37°C und Hinzufügen von 8 ml einer 80  $\mu$ M Chloroquin-Lösung in DMEM ohne Serum werden die Zellen 2,5 Stunden lang inkubiert. Der Überstand wird anschließend abgesaugt und die Zellen werden 2 Minuten lang mit 10%igem DMSO in serumfreiem DMEM behandelt. Nach Waschen mit serumfreiem Medium wird mit 10 ml vollständigem Kulturmedium wie oben beschrieben versetzt. Nach der Inkubation wird der Überstand der transfizierten Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten zwischen 16 und 45 Stunden entnommen.

**[0098]** Das in den Überständen vorhandene reife IL-1 $\beta$  wird mit einem IL-1 $\beta$ -ELISA-Test (R & D Systems), der den spezifischen Nachweis von reifem IL-1 $\beta$  gestattet, quantitativ bestimmt.

**[0099]** Die Transfektion wurde mit der Tx-cDNA-Codierregion, die in jeweils einen der beiden oben genannten Vektoren inseriert worden war, im Vergleich zu Transfektionen mit der Codierregion der cDNA von ICE p45 oder von ICE p30 sowie einer Kontrolltransfektion mit dem entsprechenden Blankvektor, der kein Plasmid enthielt, durchgeführt.

**[0100]** Wie in [Abb. 5](#) dargestellt verleiht die Transfektion von cDNA von ICE p45 (Säule 2) bzw. p30 (Säule 7) den Zellen die Fähigkeit, reifes IL-1 $\beta$  zu sezernieren. Im Gegensatz dazu wird, wenn Tx-cDNA unter denselben Bedingungen transfiziert wird (Säulen 3 und 6), kein sezerniertes IL-1 $\beta$  beobachtet, wie dies auch bei den Kontrolltransfektionen der Fall ist (Säulen 1, 4, 5). Ähnliche Ergebnisse erhält man mit den beiden Expressionsvektoren zu einem beliebigen Inkubationszeitpunkt (16 Stunden: **Abb. 5A**; 24 Stunden: **Abb. 5B**; 29 Stunden und bis 44 Stunden) nach der Transfektion.

**[0101]** Das Tx-Protein verfügt nicht über die Konvertaseeigenschaft von IL-1 $\beta$ .

## B – Proteaseaktivität des Tx-Proteins: Spaltung einer ICE-Vorstufe mit 30 kDa

**[0102]** Die Fähigkeit des Tx-Proteins, gegebenenfalls die ICE-Vorstufe mit 30 kDa (ICE p30) zu spalten, wurde in einem Cotransfektionssystem in eukaryontische Zellen geprüft, wobei man gleichzeitig einen Vektor mit der Tx-cDNA-Codierregion (SEQ ID Nr. 1) und einen Vektor mit einer DNA, die für ein modifiziertes ICE-Protein codiert, in Cos-1-Zellen einbringt, wobei jede DNA in dem oben genannten Expressionsvektor pcDL-SR $\alpha$ 296 inseriert wurde.

**[0103]** Das ICE-Protein wurde auf zweierlei Art und Weise modifiziert: erstens wurde für einen spezifischen Nachweis das ICE-Protein in Gegenwart des Tx-Proteins ein kleines T7-Peptid mit dem N-terminalen Ende des Proteins ICE p30 fusioniert. Das so markierte Protein oder seine Reifungsprodukte sind mittels Western-Blot-

ting mit einem für das T7-Peptid spezifischen monoklonalen Antikörper nachweisbar (Tsai et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 89, 8864, 1992). Zweitens wird für die Expression des Enzyms in einer Form, die unfähig ist, eine richtige Reifung heranzuführen, eine Mutante von ICE p30 verwendet, deren Cystein Cys 285 des aktiven Zentrums durch ein Serin ersetzt worden war (Wilson, K.P. et al. Nature, 370, 28 July 1994, 270-275). Dieses Enzym ist also inaktiv und unfähig, eine richtige Reifung zu induzieren oder pIL-1 $\beta$  zu spalten. Die Mutante wurde durch gerichtete Mutagenese hergestellt, und zwar mit entsprechenden Oligonukleotiden und dem "Transformer™ site-directed mutagenesis"-Mutagenesekit (Clontech). Die erhaltene Sequenz wurde vollständig verifiziert. So erhielt man das mutierte und markierte ICE p30 mit der Bezeichnung T7-ICEp30C285S.

**[0104]** Die Cos-1-Zellen wurden entweder mit dem Vektor pcDL-SR $\alpha$ 296, der T7-ICEp30C285S enthielt, oder mit dem Vektor pcDL-SR $\alpha$ 296, der Tx enthielt, transfiziert oder mit beiden Vektoren cotransfiziert, und zwar unter den oben beschriebenen Arbeitsbedingungen. Nach 22stündiger Kultur wurden die Zellen geerntet, gewaschen und in einem Puffer mit 10 mM NaCl, 10 mM Hepes, pH 7,4, 1 mM EDTA, 50 mM NaF, 0,2% Triton X-100, 1  $\mu$ g/ml Leupeptin, 20 u/ $\mu$ l Aprotinin und 1 mM PMSF. Das Zelllysate wurde bei 4°C bei 400 g zentrifugiert und mit dem Überstand wurde anschließend eine Elektrophorese auf einem 16%igen Polyacrylamid-Gel, SDS-PAGE, durchgeführt. Die Proteine des Gels wurden anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit dem monoklonalen Maus-anti-T7-Antikörper (Novagen) 2 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde gewaschen und anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem mit alkalischer Phosphatase konjugierten Anti-Maus-Immunglobulin-Antikörper aus der Ziege inkubiert. ... ??

**[0105]** Auf gleiche Art und Weise wurden Kotranfektionen mit dem Vektor pcDL-SR $\alpha$ 296, der T7-ICEp30C285S enthält, und dem Vektor pcDL-SR $\alpha$ 296, der entweder ICE p30 oder ICE p45 statt Tx enthält, durchgeführt.

**[0106]** Wie aus [Abb. 6](#) hervorgeht kann die T7-p30-Form des Enzyms (scheinbares Molekulargewicht 35 kDa) dann nachgewiesen werden (Bahn B), wenn nur das mutierte Protein ICE p30 (T7-ICEp30C285S) in den transfizierten Cos-Zellen exprimiert wird.

**[0107]** Das Fehlen einer Bande, die der p20-Form entspricht, zeigt, daß das mutierte Enzym unfähig ist, sich zu spalten. Werden die Zellen mit dem Vektor, der das Enzym ICE p30 (Bahn C) oder p45 (Bahn D) enthält, cotransfiziert, so beobachtet man eine Bande mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 26 kDa, die dem T7-p20-Spaltungsprodukt des aktiven Enzyms entspricht. Werden die Zellen mit dem Vektor, der Tx enthält (Bahn E) cotransfiziert, so beobachtet man ebenfalls eine größere Bande mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 26 kDa, die von zwei kleineren Banden mit ungefähr 31 kDa bzw. 28 kDa begleitet wird. Die verschiedenen Banden entsprechen den Spaltprodukten der p30-Form von ICE durch das Tx-Protein, das in den Zellen exprimiert wurde.

**[0108]** Diese Ergebnisse zeigen, daß das Tx-Protein erstens in transfizierten Cos-Zellen exprimiert wird und zweitens eine Proteaseaktivität aufweist. Außerdem ist das Tx-Protein fähig, die ICE-Vorstufe mit 30 kDa zu spalten und kann so zur in-vivo-Reifung des ICE-Proenzym unter Erzeugung des Enzyms in seiner aktiven Form beitragen.

C – ... ???

**[0109]** Die Fähigkeit des Tx-Proteins, den Zelltod zu induzieren, wurde durch Transfektion in Cos-Zellen und durch morphologische Beobachtung der kultivierten Zellen geprüft.

**[0110]** Die Transfektion von ICE in verschiedenen Zelltypen, die zum Tod dieser Zellen aufgrund von Apoptosis führt, ist bereits beschrieben (Miura et al., Zitat oben).

**[0111]** Die Transfektion von Cos-1-Zellen mit dem Vektor pcDL-SR $\alpha$ 296, der die Codierregion der Tx-cDNA (SEQ ID Nr. 1) enthält, sowie die Transfektion mit dem Vektor pcDL-SR $\alpha$ 296, der ICE p45 enthält, erfolgten wie bereits beschrieben. Die Morphologie der Zellen wurde nach 22stündiger Inkubationszeit beobachtet.

**[0112]** Wie in [Abb. 7](#) dargestellt, beobachtet man das Auftreten von abgerundeten Zellen, die sich vom Träger ablösen und deren morphologisches Aussehen für apoptotische Zellen in mit ICE-cDNA transfizierten Cos-Zellen charakteristisch ist (7D). Dieselbe morphologische Veränderung wird bei mit der Tx-cDNA transfizierten Cos-Zellen beobachtet (7C).

**[0113]** Zu identischen morphologischen Ergebnissen gelangt man, wenn man für die Expression von ICE und

Tx in transfizierten Cos-1-Zellen den oben beschriebenen Vektor pcDNA1/Amp verwendet.

**[0114]** Diese Ergebnisse wurden durch Beobachtung der DNA, die aus transfizierten Cos-1-Zellen, die nach der Transfektion 40 Stunden lang inkubiert worden waren, isoliert worden war, bestätigt. Die DNA der Zellen wurde mit dem TurboGen-Mikrokit (Invitrogen) präpariert, auf einem 1,5%igen Agarosegel laufen gelassen und mit ETB gefärbt.

**[0115]** Wie in [Abb. 8](#) dargestellt, weist die DNA von mit ICE p45 (Bahn B) und mit Tx (Bahn C) transfizierten Zellen das charakteristische "leiterartige" Aussehen von apoptotischen Zellen auf.

**[0116]** Ohne DNA transfizierte Zellen (7A und 8A) bzw. Zellen, die mit dem Vektor ohne cDNA transfiziert wurde (7B und 8D) weisen weder die Morphologie noch die DNA von apoptotischen Zellen auf.

**[0117]** Diese Ergebnisse zeigen, daß das Tx-Protein an der Induktion des Zelltods beteiligt ist.

### Beispiel 3: Identifikation der Ty-Sequenz

#### A – Klonierung von Tx-homologen Genen

**[0118]** Menschliche genomische DNA, die aus peripheren Blutmonozyten extrahiert worden war, wurde mit dem HindIII (Boehringer Mannheim) verdaut und die Fragmente wurden anschließend mittels präparativer Gelelektrophorese auf 1%igem Agarosegel, 1 × TAE, unter den von Maniatis et al. (Zitat oben) beschriebenen Bedingungen aufgetrennt. Das Gel wurde in der Region der Ladevertiefung entsprechend Molekulargewichten von oberhalb 1,9 kB zerschnitten und anschließend wurde mit der aus jeder der Fraktionen eluierten DNA unter den folgenden Amplifikationsbedingungen: 30 Sek. Bei 94°C, 30 Sek. Bei 55°C, 1 Min bei 72°C, 30 Zyklen, BioTaq-Polymerase (Bioprobe) eine PCR-Amplifikation durchgeführt, und zwar mit Hilfe der Oligonukleotide T2A (SEQ ID Nr. 6) und TxC (SEQ ID Nr. 12).

**[0119]** Von diesen 24 Fraktionen wurden die 10 Fraktionen, die die beste PCR-Amplifikation ergeben hatten, aufbewahrt. Das amplifizierte Material wurde auf Agarosegel gereinigt und mit dem TA-Cloning-Kit (Invitrogen) in den Vektor pCRII kloniert und mit der Sanger-Technik mit dem Enzym Sequenase (Version 2.0 DNA Sequencing Kit) sequenziert, wobei man das Macrophor-Elektrophoresesystem (Pharmacia System) verwendete. Die Sequenzen, die bestimmt worden waren, wurden mit der GGG-Software wie in Beispiel 1 angegeben analysiert.

**[0120]** Es wurde eine Ty genannte Nukleotidsequenz identifiziert, die mit der Tx-cDNA-Sequenz (SEQ ID Nr. 1) 94,9% Identität auf der Nukleotidebene aufweist und die dazu führt, daß man versucht, die der Ty-Sequenz entsprechende cDNA zu klonieren.

#### B – Kloning und Identifikation der Ty-cDNA

##### a) Bestimmung der TY-cDNA-Konsensussequenz

**[0121]** Die Nukleotidsequenzen des 5'- und des 3'-terminalen Endes der Ty-cDNA wurden mittels der "anchored"-PCR-Technik ausgehend von Ratten- bzw. Human-Plazenta-cDNA erhalten.

**[0122]** Das 3'-terminale Ende der Ty-cDNA wurde mit dem 3'RACE-System-Kit (Gibco-BRL) und den folgenden Amplifikationsnukleotiden amplifiziert:

Ty 3.2 : CATGTCTCATGGCATCCTA (SEQ ID N° 24) und

Ty 3.1 : CTGCGGAAGTGCATATAAAA (SEQ ID N° 25).

**[0123]** Diese zwei Primer wurden ausgehend von der Partialsequenz des Exon 6 der oben erhaltenen Ty-Sequenz definiert. Die amplifizierten Fragmente wurden auf Agarosegel gereinigt, in den Vektor pCRII kloniert und wie oben angegeben sequenziert. Dadurch, daß die erhaltenen Sequenzen zusammengestellt wurden, konnte man den 3'-terminalen Abschnitt der Codierregion der Ty-cDNA sowie die 3'-terminale Nichtcodierregion definieren.

**[0124]** Das 5'-terminale Ende der Ty-cDNA wurde mit dem Human Spleen 5'-RACE-Ready cDNA"-Kit" (Clontech) und den folgenden Amplifikationsnukleotiden amplifiziert:

Ty5A1 : GGCTCTAGACTCGAGGTGCTCTTTGATGTTGACAG (SEQ ID N° 26)

und

Ty5A4 : CTTCTCCTCGTGGATCTTGC (SEQ ID N° 27).

**[0125]** Diese zwei Primer wurden ausgehend von der 3'-terminalen Region der oben erhaltenen Ty-cDNA durch Hinzufügen der Restriktionsstellen XbaI und XhoI an Ty5A1 definiert. Die Amplifikationsfragmente wurden anschließend mit dem TA-Cloning-Kit (Invitrogen) kloniert und wie oben beschrieben sequenziert.

**[0126]** Die Nukleotidsequenzen wurden mit den Oligonucleotiden Ty5A1 (SEQ ID Nr. 26) und Ty 3,1 (SEQ ID Nr. 25) oben sowie den folgenden Nukleotiden verifiziert:

<b>Ty 2 :</b>	<b>AGATGTTCTTCATGGT</b>	<b>(SEQ ID N° 28)</b>
<b>Ty 4 :</b>	<b>CTTCTCAATATGGACCA</b>	<b>(SEQ ID N° 29)</b>
<b>Ty 5 :</b>	<b>CCTGGCTCTCATCATAT</b>	<b>(SEQ ID N° 30)</b>
<b>Ty 6 :</b>	<b>ATTTGCTGCCAGACCAGA</b>	<b>(SEQ ID N° 31)</b>
<b>Ty 7 :</b>	<b>GCCTGCAGAGGTGAAAAAC</b>	<b>(SEQ ID N° 32)</b>
<b>Ty 8 :</b>	<b>GCTCCATCTTCATTACGGA</b>	<b>(SEQ ID N° 33)</b>
<b>Ty 0 :</b>	<b>GATTTCTGTACCTTCCG</b>	<b>(SEQ ID N° 34)</b>
<b>Ty A :</b>	<b>TTTATGCGCAGTTCCG</b>	<b>(SEQ ID N° 35)</b>
<b>Ty B :</b>	<b>GTCATAGTGAGCCCCATT</b>	<b>(SEQ ID N° 36)</b>
<b>Ty C :</b>	<b>CTTCACGAGGACAAAGT</b>	<b>(SEQ ID N° 37)</b>
<b>Ty D :</b>	<b>TCGCAAAGAGTCTACCA</b>	<b>(SEQ ID N° 38)</b>

**[0127]** Diese Oligonukleotide wurden innerhalb der Ty-Codiersequenz gewählt (Codierstrang oder komplementärer Strang).

**[0128]** Durch Zusammenstellen aller erhaltenen Sequenzen erhält man die Konsensus-Nukleotidsequenz der Ty-cDNA (SEQ ID Nr. 22).

#### b) Klonierung der Codierregion Ty-cDNA

**[0129]** Die Codierregion der Ty-cDNA (SEQ ID Nr. 22) wurde mittels PCR amplifiziert und zwar ausgehend von Ratten- oder Human-Plazenta-cDNA, wobei man die entsprechenden Kits 5'-RACE-Read cDNA kits (Clontech), das Oligonukleotid Ty5A1 (SEQ ID Nr. 26) oben sowie das folgende Oligonukleotid verwendete:  
TyP5 : CGCGGATCCAAGATGTTGGAATACCTGGGCAA (SEQ ID N° 39).

**[0130]** Diese Amplifikationsprimer wurden gemäß der Konsensussequenz der Ty-cDNA (SEQ ID Nr. 22), die oben bestimmt wurde, gewählt, wobei die BamHI-Klonierungsstelle zu TyP5 hinzugefügt wurde.

**[0131]** Das amplifizierte und auf Agarosegel gereinigte Produkt, das eine Länge von ungefähr 1100 Basenpaaren aufweist, wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und XbaI verdaut und anschließend wie in Beispiel 1 in den Vektor pcDNA1/Amp kloniert und wie oben beschrieben sequenziert. Das Klonierungsprodukt wurde vollständig an beiden Strängen mit den oben definierten Oligonukleotiden SEQ ID Nr. 28 bis SEQ ID Nr. 28 bis SEQ ID Nr. 38 sequenziert.

**[0132]** Man erhielt eine Sequenz mit Identität zur Codiersequenz der Ty-cDNA-Konsensussequenz (SEQ ID Nr. 22). Die Homologie der Codiersequenz der Ty-cDNA mit der Codiersequenz der Tx-cDNA, die in Beispiel 1 erhalten wurde, beträgt 84% Identität auf Nukleotidebene.

**[0133]** Die Codierregion der Ty-cDNA codiert für das Ty-Protein mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz SEQ ID Nr. 23. Die Proteinsequenz umfaßt 364 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 41,8 kDa.

**[0134]** Die Homologie der Sequenz des Ty-Proteins mit dem Tx-Protein, das in Beispiel 1 erhalten wurde, beträgt 75% Identität auf Aminosäureebene.

**[0135]** Ein Muster von E. coli XL-1 blue, das die Codierregion der Ty-cDNA (SEQ ID Nr. 22) im Vektor pcD-

NAI/Amp (cDNA Ty/pcDNAI/Amp 30/6/95) enthält, wurde am 5. Juli 1995 unter der Nr. I-1068 bei der CNDM hinterlegt.

#### Beispiel 4: Biologische Aktivitäten des Ty-Proteins

##### A – Induktion des Zelltods:

**[0136]** Die Fähigkeit des Ty-Proteins, den Zelltod zu induzieren, wurde nach dem in Beispiel 2 angegebenen Protokoll geprüft und zwar mit Cos-1-Zellen, die mit dem Vektor pcDL-SR $\alpha$ 296, der die Codierregion der Ty-cDNA (SEQ ID Nr. 22) enthält und pcDL-Ty genannt wird, transfiziert, wobei die Herstellung dieses Vektors nach den in Beispiel 2 für die Subklonierung der Tx-cDNA beschriebenen Bedingungen durchgeführt wurde.

**[0137]** Die Morphologie der Zellen wurde nach 23stündiger und 43stündiger Inkubation beobachtet und die Beobachtung der isolierten DNA erfolgte nach 43stündiger Inkubation.

**[0138]** Die Ergebnisse, die im Vergleich zu Zellen, mit dem Vektor mit der Codierregion von Tx oder von ICE p45 transfiziert worden waren, erhalten wurden, sind mit denjenigen für das Tx-Protein in [Abb. 7](#) und in [Abb. 8](#) von Beispiel 2 identisch.

**[0139]** Diese Ergebnisse zeigen, daß das Ty-Protein, wie auch das Tx-Protein, an der Induktion des Zelltods beteiligt ist.

##### B – Proteaseaktivität des Ty-Proteins:

**[0140]** Die Fähigkeit des Ty-Proteins, sich selbst intermolekular zu schneiden, wurde in einem Cotransfektionssystem in eukaryontischen Zellen getestet, und zwar unter Bedingungen analog denen, wie sie für die Spaltung der ICE-Vorstufe durch das Tx-Protein in Beispiel 2 beschrieben wurden, und zwar dadurch, daß man in Cos-1-Zellen gleichzeitig einen Vektor mit der Codierregion der Ty-cDNA (SEQ ID Nr. 22) und einen Vektor mit einer DNA, die für ein modifiziertes Ty-Protein codiert, einbringt, wobei jede DNA in den Expressionsvektor pcDL-SR $\alpha$ 296 bzw. in den Vektor pcDNAI/Amp, die in Beispiel 2 beschrieben sind, inseriert wurde.

**[0141]** Das Ty-Protein wurde doppelt modifiziert; erstens wurde das Codon Cys 245 nach dem "nested"-PCR-Verfahren zu einem Serin-Codon mutiert, und zweitens wurde der T7-Epitop-Tag (MASMTG-GQQMG) am N-terminalen Ende des Ty-Fragments, das den Resten 68 bis 364 der Sequenz SEQ ID Nr. 23 entspricht, eingeführt.

**[0142]** Für die Amplifikation der Ty-cDNA-Matrix wurden die folgenden Primer-Paare verwendet:

a) erstens,

T7TY : CGCGGATCCACCATGGCTTCTATGACAGGAGGTCAACAAATGGGACAAAAGATCACCAGTG-TAAAACC (SEQ ID N° 40)

wobei dieser Primer aus der Ty-Codiersequenz ausgewählt wurde und dadurch synthetisiert wurde, daß man eine BamHI-Restriktionsstelle und im Anschluß daran die für den T7-Tag codierende Nukleotidsequenz hinzufügte, sowie

TYC245SR : ATGTTTTTTCACCTCTGGAGGCCTGGACAATGATGAC (SEQ ID N° 41)

wobei dieser Primer innerhalb der Ty-Codiersequenz (Komplementärstrang) mit einer Mutation C → G in Position 17 ausgewählt wurde, und

b) zweitens,

TYC245S : GTCATCATTGTCCAGGCCTCCAGAGGTGAAAAACAT (SEQ ID N° 42)

wobei dieser Primer aus der Ty-Codiersequenz mit einer Mutation G → C in Position 20 ausgewählt wurde, und Ty5A1 (SEQ ID Nr. 26) oben,

und wobei man die folgenden Amplifikationsbedingungen verwendete: 1 Min bei 94°C, 1 Minute bei 60°C, 1 Minute bei 72°C, 30 Zyklen, Vent-Polymerase (Biolabs).

**[0143]** Die beiden jeweils erhaltenen Amplifikationsprodukte wurden zusammengegeben und mittels PCR amplifiziert, wobei T7Ty und Ty5A1 sowie die oben beschriebenen Bedingungen verwendet wurden.

**[0144]** Das Amplifikationsprodukt wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und XbaI verdaut und anschließend in den Vektor pcDNAI/Amp kloniert, der zuvor mit denselben Restriktionsenzymen verdaut worden war. Das erhaltene Plasmid wird pT7TY $\Delta$ 67C245S genannt. Die erhaltene Sequenz wurde vollständig mittels DNA-Sequenzierung verifiziert.

**[0145]** Der Expressionsvektor pcDL-SR $\alpha$ 296, in den die Ty-cDNA-Sequenz (SEQ ID Nr. 22) subkloniert worden war und der Plasmid PcDL-TY genannt wird, wurde wie oben beschrieben hergestellt.

**[0146]** Die Cos-1-Zellen wurden anschließend entweder mit dem Vektor pT7TY $\Delta$ 67C245S transfiziert oder mit diesem Plasmid und dem Plasmid pcDL-TY kotransfiziert und anschließend 23 Stunden oder 43 Stunden lang kultiviert, lysiert und mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot mit den monoklonalen Anti-T7-Antikörper aus der Maus unter den in Beispiel 2 beschriebenen Arbeitsbedingungen analysiert, wobei jedoch der Anti-Maus-Immunglobulin-Antikörper aus der Ziege statt mit der alkalischen Phosphatase mit Meerrettich-Peroxydase konjugiert wird. Die an die Membran gebundenen Antikörper werden anschließend mit dem Nachweissystem "Western ECL" (Amersham) mittels Autoradiographie sichtbar gemacht.

**[0147]** Auf gleiche Art und Weise wurden Cotransfektionen mit dem pcDL-SR $\alpha$ 296-Blankvektor und dem pcDNA1/Amp-Blankvektor durchgeführt und die Zellen wurden 23 Stunden lang kultiviert.

**[0148]** Wie aus [Abb. 9](#) hervorgeht kann die Form T7Ty (scheinbares Molekulargewicht ungefähr 30 kDa) nachgewiesen werden (Bahn E), wenn nur das mutierte Ty-Protein in den transfizierten Cos-Zellen exprimiert wird. Die Abwesenheit einer Bande mit niedrigerem Molekulargewicht zeigt, daß das mutierte Ty-Protein unfähig ist, sich selbst zu spalten. Werden Zellen mit dem Vektor, der Ty enthält, cotransfiziert (Bahn F und G), so beobachtet man das Auftreten einer größeren Bande mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 20 kDa, was dem Produkt der Spaltung des mutierten Ty-Proteins durch das Ty-Protein entspricht.

**[0149]** Diese Ergebnisse zeigen, daß das Ty-Protein erstens in transfizierten Cos-Zellen exprimiert wird und zweitens eine Proteaseaktivität aufweist und insbesondere fähig ist, sich selbst intermolekular zu spalten.

#### SEQUENCEPROTOKOLL

##### (1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

###### (i) ANMELDER:

- (A) NAME: ROUSSEL UCLAF
- (B) STRASSE: 102, Route de Noisy
- (C) ORT: ROMAINVILLE
- (E) LAND: FRANCE
- (F) POSTLEITZAHL: 93230
- (G) TELEFON: 49.91.49.91
- (H) TELEFAX: 49.91.46.10

###### (ii) ANMELDETITEL: COPY FROM EPO FORM ????

###### (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 42

###### (iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version  
#1.30 (EPO) + Änderungen mit WORDPERFECT 5.1  
für die SEQ ID NR. 22 (ix)

(vi) INFORMATIONEN ZUR FRÜHEREN ANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER: FR 9409567

(B) EINREICHUNGSDATUM: 02-AUG-1994

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NR. 1:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 1291 Basenpaare

(B) ART: Nukleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 42..1172

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 1:

GCTCTTCCCA ACGCTGTAAA AAAGGACAGA GGCTGTCC T ATG GCA GAA GGC 53  
Met Ala Glu Gly  
1

AAC CAC AGA AAA AAG CCA CTT AAG GTG TTG GAA TCC CTG GGC AAA GAT 101  
Asn His Arg Lys Lys Pro Leu Lys Val Leu Glu Ser Leu Gly Lys Asp  
5 10 15 20

TTC CTC ACT GGT GTT TTG GAT AAC TTG GTG GAA CAA AAT GTA CTG AAC 149  
Phe Leu Thr Gly Val Leu Asp Asn Leu Val Glu Gln Asn Val Leu Asn  
25 30 35

TGG AAG GAA GAG GAA AAA AAG AAA TAT TAC GAT GCT AAA ACT GAA GAC 197  
Trp Lys Glu Glu Glu Lys Lys Lys Tyr Tyr Asp Ala Lys Thr Glu Asp  
40 45 50

AAA GTT CGG GTC ATG GCA GAC TCT ATC CAA GAG AAG CAA CGT ATG GCA 245  
Lys Val Arg Val Met Ala Asp Ser Met Gln Glu Lys Gln Arg Met Ala  
55 60 65

GGA CAA ATC CTT CTT CAA ACC TTT TTT AAC ATA GAC CAA ATA TCC CCC 293  
Gly Gln Met Leu Leu Gln Thr Phe Phe Asn Ile Asp Gln Ile Ser Pro  
70 75 80

AAT AAA AAA GCT CAT CCG AAT ATG GAG GCT GGA CCA CCT GAG TCA GGA 341  
Asn Lys Lys Ala His Pro Asn Met Glu Ala Gly Pro Pro Glu Ser Gly  
85 90 95 100

GAA TCT ACA GAT GCC CTC AAG CTT TGT CCT CAT GAA GAA TTC CTG AGA 389  
Glu Ser Thr Asp Ala Leu Lys Leu Cys Pro His Glu Glu Phe Leu Arg  
105 110 115

CTA TGT AAA GAA AGA GCT GAA GAG ATC TAT CCA ATA AAG GAG AGA AAC 437  
Leu Cys Lys Glu Arg Ala Glu Glu Ile Tyr Pro Ile Lys Glu Arg Asn  
120 125 130

AAC CGC ACA CGC CTG GCT CTC ATC ATA TGC AAT ACA GAG TTT GAC CAT 485  
Asn Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ile Ile Cys Asn Thr Glu Phe Asp His  
135 140 145

CTG CCT CCG AGG AAT GGA GCT GAC TTT GAC ATC ACA GGG ATG AAG GAG	533
Leu Pro Pro Arg Asn Gly Ala Asp Phe Asp Ile Thr Gly Met Lys Glu	
150 155 160	
CTA CTT GAG GGT CTG GAC TAT AGT GTA GAT GTA GAA GAG AAT CTG ACA	581
Leu Leu Glu Gly Leu Asp Tyr Ser Val Asp Val Glu Glu Asn Leu Thr	
165 170 175 180	
GCC AGG GAT ATG GAG TCA GCG CTG AGG GCA TTT GCT ACC AGA CCA GAG	629
Ala Arg Asp Met Glu Ser Ala Leu Arg Ala Phe Ala Thr Arg Pro Glu	
185 190 195	
CAC AAG TCC TCT GAC AGC ACA TTC TTG GTA CTC ATG TCT CAT GGC ATC	677
His Lys Ser Ser Asp Ser Thr Phe Leu Val Leu Met Ser His Gly Ile	
200 205 210	
CTG GAG GGA ATC TGC GGA ACT GTG CAT GAT GAG AAA AAA CCA GAT GTG	725
Leu Glu Gly Ile Cys Gly Thr Val His Asp Glu Lys Lys Pro Asp Val	
215 220 225	
CTG CTT TAT GAC ACC ATC TTC CAG ATA TTC AAC AAC CGC AAC TGC CTC	773
Leu Leu Tyr Asp Thr Ile Phe Gln Ile Phe Asn Asn Arg Asn Cys Leu	
230 235 240	
AGT CTG AAG GAC AAA CCC AAG GTC ATC ATT GTC CAG GCC TGC AGA GGT	821
Ser Leu Lys Asp Lys Pro Lys Val Ile Ile Val Gln Ala Cys Arg Gly	
245 250 255 260	
GCA AAC CGT GGG GAA CTG TGG GTC AGA GAC TCT CCA GCA TCC TTG GAA	869
Ala Asn Arg Gly Glu Leu Trp Val Arg Asp Ser Pro Ala Ser Leu Glu	
265 270 275	
GTG GCC TCT TCA CAG TCA TCT GAG AAC CTG GAG GAA GAT GCT GTT TAC	917
Val Ala Ser Ser Gln Ser Ser Glu Asn Leu Glu Glu Asp Ala Val Tyr	
280 285 290	
AAG ACC CAC GTG GAG AAG GAC TTC ATT GCT TTC TGC TCT TCA ACG CCA	965
Lys Thr His Val Glu Lys Asp Phe Ile Ala Phe Cys Ser Ser Thr Pro	
295 300 305	
CAC AAC GTG TCC TGG AGA GAC AGC ACA ATG GGC TCT ATC TTC ATC ACA	1013
His Asn Val Ser Trp Arg Asp Ser Thr Met Gly Ser Ile Phe Ile Thr	
310 315 320	



Gln Ile Ser Pro Asn Lys Lys Ala His Pro Asn Met Glu Ala Gly Pro  
 85 90 95  
 Pro Glu Ser Gly Glu Ser Thr Asp Ala Leu Lys Leu Cys Pro His Glu  
 100 105 110  
 Glu Phe Leu Arg Leu Cys Lys Glu Arg Ala Glu Glu Ile Tyr Pro Ile  
 115 120 125  
 Lys Glu Arg Asn Asn Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ile Ile Cys Asn Thr  
 130 135 140  
 Glu Phe Asp His Leu Pro Pro Arg Asn Gly Ala Asp Phe Asp Ile Thr  
 145 150 155 160  
 Gly Met Lys Glu Leu Leu Glu Gly Leu Asp Tyr Ser Val Asp Val Glu  
 165 170 175  
 Glu Asn Leu Thr Ala Arg Asp Met Glu Ser Ala Leu Arg Ala Phe Ala  
 180 185 190  
 Thr Arg Pro Glu His Lys Ser Ser Asp Ser Thr Phe Leu Val Leu Met  
 195 200 205  
 Ser His Gly Ile Leu Glu Gly Ile Cys Gly Thr Val His Asp Glu Lys  
 210 215 220  
 Lys Pro Asp Val Leu Leu Tyr Asp Thr Ile Phe Gln Ile Phe Asn Asn  
 225 230 235 240  
 Arg Asn Cys Leu Ser Leu Lys Asp Lys Pro Lys Val Ile Ile Val Gln  
 245 250 255  
 Ala Cys Arg Gly Ala Asn Arg Gly Glu Leu Trp Val Arg Asp Ser Pro  
 260 265 270  
 Ala Ser Leu Glu Val Ala Ser Ser Gln Ser Ser Glu Asn Leu Glu Glu  
 275 280 285  
 Asp Ala Val Tyr Lys Thr His Val Glu Lys Asp Phe Ile Ala Phe Cys  
 290 295 300  
 Ser Ser Thr Pro His Asn Val Ser Trp Arg Asp Ser Thr Met Gly Ser  
 305 310 315 320

Ile Phe Ile Thr Gln Leu Ile Thr Cys Phe Gln Lys Tyr Ser Trp Cys  
 325 330 335

Cys His Leu Glu Glu Val Phe Arg Lys Val Gln Gln Ser Phe Glu Thr  
 340 345 350

Pro Arg Ala Lys Ala Gln Met Pro Thr Ile Glu Arg Leu Ser Met Thr  
 355 360 365

Arg Tyr Phe Tyr Leu Phe Pro Gly Asn  
 370 375

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 3:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG:/desc = "OLIGONUKLEOTID"

(x) INFORMATIONEN ZUR VERÖFFENTLICHUNG:

- (A) AUTOREN: Thornberry, Nancy A.  
 Bull, Herbert G.  
 Calaycay, Jimmy R.  
 Chapman, Kevin T.  
 Howard, Andrew D.  
 Kostura, Matthew J.  
 Miller, Douglas K.  
 Molineaux, Susan M.  
 Weidner, Jeffrey R.  
 Aunins, John

- (B) TITEL: Für das Interleukin-Ibeta-Processing  
 bei Monozyten ist eine neue heterodimere  
 Cysteinprotease erforderlich

- (C) ZEITSCHRIFT: Nature
- (D) BAND: 356
- (F) SEITEN: 768-774
- (G) DATUM: 30. APRIL 1992

(K) RELEVANTE RESTE IN DER SEQ ID Nr. 3: von 1  
bis 20

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 3:

ACATGACTAC AGAGCTGGAG

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 4:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG:

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: complement (1..20)

(x) INFORMATION ZUR VERÖFFENTLICHUNG:

(A) AUTOREN: Thornberry, Nancy A.  
Bull, Herbert G.  
Calaycay, Jimmy R.  
Chapman, Kevin T.  
Howard, Andrew D.  
Kostura, Matthew J.  
Miller, Douglas K.  
Molineaux, Susan M.  
Weidner, Jeffrey R.  
Aunins, John

(B) TITEL: A novel heterodimeric cysteine  
protease is required for interleukin-  
1beta processing in monocytes

(C) ZEITSCHRIFT: Nature

(D) BAND: 356

(F) SEITEN: 768-774

(G) DATUM: 30. APRIL 1992

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 4:

CACCACGGCA GGCCTGGATG

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 5:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 235 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 5:

GAAATGACTA CAGAGCTGGA GGCATTGCT CACCGCCAG AGCACAAGAC CTCTGACAGC	60
ACCTTCCCGG TGTCTGTGC TCATGGTGT CCGGAAGCA TTTGTGGAA GAAACTCT	120
GAACAAGTCC CTGATATATT ACAATCAAT GAAATATTA AATGTTGAA TAGCAAGAAC	180
TGCCCAAGTT TGAAGGACAA ACCCAAGGTG ATCATCTCG AGGCCTGCTG TGCTG	235

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 6:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG:

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: 1..23
- (D) SONSTIGE INFORMATIONEN:note: = "SEQ ID Nr.  
5 von 8 bis 30"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 6:

CTACAGAGCT GGAGGCATTT GCT

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 7:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG:

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: Komplement (1..24)

(x) INFORMATIONEN ZUR VERÖFFENTLICHUNG:

- (A) AUTOREN: Thornberry, Nancy A.  
Bull, Herbert G.  
Calaycay, Jimmy R.  
Chapman, Kevin T.  
Howard, Andrew D.  
Kostura, Matthew J.  
Miller, Douglas K.  
Molineaux, Susan M.  
Weidner, Jeffrey R.  
Aunins, John

(B) TITEL: Für das Interleukin-Ibeta-Processing  
bei Monozyten ist eine neue heterodimere  
Cysteinprotease erforderlich

- (C) ZEITSCHRIFT: Nature
- (D) BAND: 356
- (F) SEITEN: 768-774
- (G) DATUM: 30. APRIL 1992

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 7:

TTAATGTCCT GGGAAGAGGT AGAA

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 8:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "OLIGONUKLEOTID"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc.feature
- (B) LAGE: Komplement (1..21)
- (D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
1 KOMPLEMENTÄR von 753 bis 773"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 8:

GAGGCAGTTG CGGTTGTTGA A

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 9:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "OLIGONUKLEOTID"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc.feature
- (B) LAGE: Komplement (1..21)
- (D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
1 KOMPLEMENTÄR von 829 bis 849"

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 9:

CTCTGACCCA CAGTTCCCCA C 21

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 10:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "OLIGONUKLEOTID"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc.feature
- (B) LAGE: 1..17
- (D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
1 von 695 bis 711"

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 10:

AACTGTGCAT GATGAGA 17

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 11:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 19 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "OLIGONUKLEOTID"

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature

(B) LAGE: 1..9

(D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
1 von 905 bis 913"

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature

(B) LAGE: 11..19

(D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
1 von 915 bis 923"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 11:

AGATGCTGTG TACAAGACC 19

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 12:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 17 Basenpaare

(B) ART: Nukleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "OLIGONUKLEOTID"

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature

(B) LAGE: Komplement (1..17)

(D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
1 von 795 bis 811"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 12:

GCCTGGACAA TGATGAC 17

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 13:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "OLIGONUKLEOTID"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: Komplement (1..17)
- (D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
1 von 995 bis 1011"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 13:

TGATGAAGAT AGAGCCC 17

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 14:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "OLIGONUKLEOTID"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: 1..17

(D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
1 von 204 bis 220"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 14:

CGGGTCATGG CAGACTC 17

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 15:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG:

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: Komplement (1..17)
- (D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
1 von 249 bis 265"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 15:

GTTTGAAGAA GCATTTG 17

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 16:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "OLIGONUKLEOTID"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: 1..17
- (D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
1 von 330 bis 346"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 16:

CCTGAGTCAG GAGAATC 17

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 17:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "OLIGONUKLEOTID"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: Komplement (1..17)
- (D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
1 von 375 bis 391"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 17:

AGTCTCAGGA ATTCTTC 17

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 18:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "OLIGONUKLEOTID"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: 1..17
- (D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr. 1 von 503 bis 519"

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 18:

AGCTGACTTT GACATCA 17

- (2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 19:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "OLIGONUKLEOTID"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: Komplement (1..17)
- (D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr. 1 von 587 bis 603"

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 19:

GCGCTGACTC CATATCC 17

- (2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 20:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "OLIGONUKLEOTID"

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature

(B) LAGE: 13..33

(D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
1 von 42 bis 62"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 20:

CGCGGATCCA CCATGGCAGA AGGCAACCAC AGA

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 21:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 39 Basenpaare

(B) ART: Nukleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG:

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature

(B) LAGE: Komplement (19..39)

(D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
1 von KOMPLEMENTÄR 1155 bis 1175"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 21:

GGCTCTAGAC TCGAGTTATC AATTGCCAGG AAAGAGGTA 39

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 22:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1310 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 104..1195

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 22:

GAACAACGTG GCTGGACAAA CATCTATCCA GACCCTACTA CCTAATACGG ATCAAAAGTC	60
GACCAGTGTA AAAAAAGACA ACCACAAAAA AAAAACAGTT AAG ATG TTG GAA TAC	115
Met Leu Glu Tyr	
1	
CTG GGC AAA GAT GTT CTT CAT GGT GTT TTT AAT TAT TTG GCA AAA CAC	163
Leu Gly Lys Asp Val Leu His Gly Val Phe Asn Tyr Leu Ala Lys His	
5 10 15 20	
GAT GTT CTG ACA TTG AAG GAA GAG GAA AAG AAA AAA TAT TAT GAT GCC	211
Asp Val Leu Thr Leu Lys Glu Glu Glu Lys Lys Lys Tyr Tyr Asp Ala	
25 30 35	
AAA ATT GAA GAC AAG GCC CTG ATC TTG GTA GAC TCT TTG CGA AAG AAT	259
Lys Ile Glu Asp Lys Ala Leu Ile Leu Val Asp Ser Leu Arg Lys Asn	
40 45 50	
CGC GTG GCT CAT CAA ATG TTT ACC CAA ACA CTT CTC AAT ATG GAC CAA	307
Arg Val Ala His Gln Met Phe Thr Gln Thr Leu Leu Asn Met Asp Gln	
55 60 65	
AAG ATC ACC AGT GTA AAA CCT CTT CTG CAA ATC GAG GCT GGA CCA CCT	355
Lys Ile Thr Ser Val Lys Pro Leu Leu Gln Ile Glu Ala Gly Pro Pro	
70 75 80	
GAG TCA GCA GAA TCT ACA AAT ATA CTC AAA CTT TGT CCT CGT GAA GAA	403
Glu Ser Ala Glu Ser Thr Asn Ile Leu Lys Leu Cys Pro Arg Glu Glu	
85 90 95 100	
TTC CTG AGA CTG TGT AAA AAA AAT CAT GAT GAG ATC TAT CCA ATA AAA	451
Phe Leu Arg Leu Cys Lys Lys Asn His Asp Glu Ile Tyr Pro Ile Lys	
105 110 115	
AAG AGA GAG GAC CGC AGA CGC CTG GCT CTC ATC ATA TGC AAT ACA AAG	499
Lys Arg Glu Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Ile Ile Cys Asn Thr Lys	
120 125 130	

TTT GAT CAC CTG CCT GCA AGG AAT GGG GCT CAC TAT GAC ATC GTG GGG Phe Asp His Leu Pro Ala Arg Asn Gly Ala His Tyr Asp Ile Val Gly 135 140 145	547
ATG AAA AGG CTG CTT CAA GGC CTG GGC TAC ACT GTG GTT GAC GAA AAG Met Lys Arg Leu Leu Gln Gly Leu Gly Tyr Thr Val Val Asp Glu Lys 150 155 160	595
AAT CTC ACA GCC AGG GAT ATG GAG TCA GTG CTG AGG GCA TTT GCT GCC Asn Leu Thr Ala Arg Asp Met Glu Ser Val Leu Arg Ala Phe Ala Ala 165 170 175 180	643
AGA CCA GAG CAC AAG TCC TCT GAC AGC ACG TTC TTG GTA CTC ATG TCT Arg Pro Glu His Lys Ser Ser Asp Ser Thr Phe Leu Val Leu Met Ser 185 190 195	691
CAT GGC ATC CTA GAG GGA ATC TGC GGA ACT GCG CAT AAA AAG AAA AAA His Gly Ile Leu Glu Gly Ile Cys Gly Thr Ala His Lys Lys Lys Lys 200 205 210	739
CCG GAT GTG CTG CTT TAT GAC ACC ATC TTC CAG ATA TTC AAC AAC CGC Pro Asp Val Leu Leu Tyr Asp Thr Ile Phe Gln Ile Phe Asn Asn Arg 215 220 225	787
AAC TGC CTC AGT CTA AAG GAC AAA CCC AAG GTC ATC ATT GTC CAG GCC Asn Cys Leu Ser Leu Lys Asp Lys Pro Lys Val Ile Ile Val Gln Ala 230 235 240	835
TGC AGA GGT GAA AAA CAT GGG GAA CTC TGG GTC AGA GAC TCT CCA GCA Cys Arg Gly Glu Lys His Gly Glu Leu Trp Val Arg Asp Ser Pro Ala 245 250 255 260	883
TCC TTG GCA CTC ATC TCT TCA CAG TCA TCT GAG AAC CTG GAG GCA GAT Ser Leu Ala Leu Ile Ser Ser Gln Ser Ser Glu Asn Leu Glu Ala Asp 265 270 275	931
TCT GTT TGC AAG ATC CAC GAG GAG AAG GAC TTC ATT GCT TTC TGT TCT Ser Val Cys Lys Ile His Glu Glu Lys Asp Phe Ile Ala Phe Cys Ser 280 285 290	979
TCA ACA CCA CAT AAC GTG TCC TGG AGA GAC CGC ACA AGG GGC TCC ATC Ser Thr Pro His Asn Val Ser Trp Arg Asp Arg Thr Arg Gly Ser Ile 295 300 305	1027

```

TTC ATT ACG GAA CTC ATC ACA TGC TTC CAG AAA TAT TCT TGC TGC TGC      1075
Phe Ile Thr Glu Leu Ile Thr Cys Phe Gln Lys Tyr Ser Cys Cys Cys
   310                315                320

CAC CTA ATG GAA ATA TTT CGG AAG GTA CAG AAA TCA TTT GAA GTT CCA      1123
His Leu Met Glu Ile Phe Arg Lys Val Gln Lys Ser Phe Glu Val Pro
   325                330                335                340

CAG GCT AAA GCC CAG ATG CCC ACC ATA GAA CGA GCA ACC TTG ACA AGA      1171
Gln Ala Lys Ala Gln Met Pro Thr Ile Glu Arg Ala Thr Leu Thr Arg
                345                350                355

GAT TTC TAC CTC TTT CCT GGC AAT TGAAAATGAA ACCACAGGCA GCCCAGCCCT      1225
Asp Phe Tyr Leu Phe Pro Gly Asn
                360

CCTCTGTCAA CATCAAGAG CACATTTACC AGTATAGCTT GCATAGTCAA TATTTGGTAT      1285

TTCAATAAAA GTAAGACTG TATCT                                           1310

```

## (2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 23:

## (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 364 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 23:

```

Met Leu Glu Tyr Leu Gly Lys Asp Val Leu His Gly Val Phe Asn Tyr
 1                5                10                15

Leu Ala Lys His Asp Val Leu Thr Leu Lys Glu Glu Glu Lys Lys Lys
   20                25                30

Tyr Tyr Asp Ala Lys Ile Glu Asp Lys Ala Leu Ile Leu Val Asp Ser
   35                40                45

Leu Arg Lys Asn Arg Val Ala His Gln Met Phe Thr Gln Thr Leu Leu
   50                55                60

Asn Met Asp Gln Lys Ile Thr Ser Val Lys Pro Leu Leu Gln Ile Glu
 65                70                75                80

```

Ala Gly Pro Pro Glu Ser Ala Glu Ser Thr Asn Ile Leu Lys Leu Cys  
85 90 95

Pro Arg Glu Glu Phe Leu Arg Leu Cys Lys Lys Asn His Asp Glu Ile  
100 105 110

Tyr Pro Ile Lys Lys Arg Glu Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Ile Ile  
115 120 125

Cys Asn Thr Lys Phe Asp His Leu Pro Ala Arg Asn Gly Ala His Tyr  
130 135 140

Asp Ile Val Gly Met Lys Arg Leu Leu Gln Gly Leu Gly Tyr Thr Val  
145 150 155 160

Val Asp Glu Lys Asn Leu Thr Ala Arg Asp Met Glu Ser Val Leu Arg  
165 170 175

Ala Phe Ala Ala Arg Pro Glu His Lys Ser Ser Asp Ser Thr Phe Leu  
180 185 190

Val Leu Met Ser His Gly Ile Leu Glu Gly Ile Cys Gly Thr Ala His  
195 200 205

Lys Lys Lys Lys Pro Asp Val Leu Leu Tyr Asp Thr Ile Phe Gln Ile  
210 215 220

Phe Asn Asn Arg Asn Cys Leu Ser Leu Lys Asp Lys Pro Lys Val Ile  
225 230 235 240

Ile Val Gln Ala Cys Arg Gly Glu Lys His Gly Glu Leu Trp Val Arg  
245 250 255

Asp Ser Pro Ala Ser Leu Ala Leu Ile Ser Ser Gln Ser Ser Glu Asn  
260 265 270

Leu Glu Ala Asp Ser Val Cys Lys Ile His Glu Glu Lys Asp Phe Ile  
275 280 285

Ala Phe Cys Ser Ser Thr Pro His Asn Val Ser Trp Arg Asp Arg Thr  
290 295 300

Arg Gly Ser Ile Phe Ile Thr Glu Leu Ile Thr Cys Phe Gln Lys Tyr  
305 310 315 320

Ser Cys Cys Cys His Leu Met Glu Ile Phe Arg Lys Val Gln Lys Ser  
325 330 335

Phe Glu Val Pro Gln Ala Lys Ala Gln Met Pro Thr Ile Glu Arg Ala  
340 345 350

Thr Leu Thr Arg Asp Phe Tyr Leu Phe Pro Gly Asn  
355 360

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 24:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 19 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "OLIGONUKLEOTID"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: 1..19
- (D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
22 von 685 bis 703"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 24:

CATGTCTCAT GGCATCCTA 19

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 25:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "OLIGONUKLEOTID"

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature

(B) LAGE: 1..20

(D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
22 von 712 bis 731"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 25:

CTGCGGAACT GGCATAAAA 20

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 26:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 35 Basenpaare

(B) ART: Nukleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "OLIGONUKLEOTID"

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature

(B) LAGE: Komplement (16..35)

(D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
22 von 1229 bis 1248"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 26:

GGCTCTAGAC TCGAGGTGCT CTTTGATGTT GACAG 35

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 27:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) ART: Nukleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "OLIGONUKLEOTID"

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature

(B) LAGE: Komplement (1..20)

(D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
22 von 939 bis 958"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 27:

CTTCTCCTCG TGGATCTTGC 20

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 28:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 16 Basenpaare

(B) ART: Nukleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "OLIGONUKLEOTID"

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature

(B) LAGE: 1..16

(D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
22 von 124 bis 139"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 28:

AGATGTTCTT CATGGT 16

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 29:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "OLIGONUKLEOTID"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: 1..17
- (D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
22 von 290 bis 306"

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 29:

CTTCTCAATA TGGACCA

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 30:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "OLIGONUKLEOTID"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: 1..17
- (D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
22 von 472 bis 488"

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 30:

CCTGGCTCTC ATCATAT

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 31:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "OLIGONUKLEOTID"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: 1..18
- (D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
22 von 634 bis 651"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 31:

ATTTGCTGCC AGACCAGA 18

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 32:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 19 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "OLIGONUKLEOTID"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: 1..19
- (D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
22 von 833 bis 851"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 32:

GCCTGCAGAG GTGAAAAAC

19

## (2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 33:

## (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 19 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "OLIGONUKLEOTID"

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: 1..19
- (D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
22 von 1020 bis 1038"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 33:

GCTCCATCTT CATTACGGA

19

## (2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 34:

## (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "OLIGONUKLEOTID"

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: Komplement (1..17)

(D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
22 von 1094 bis 1110"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 34:

GATTTCTGTA CCTTCCG 17

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 35:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 16 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "OLIGONUKLEOTID"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: Komplement (1..16)
- (D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
22 von 715 bis 730"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 35:

TTTATGCGCA GTTCCG 16

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 36:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "OLIGONUKLEOTID"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: Komplement (1..18)
- (D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
22 KOMPLEMENTÄR von 521 bis 538"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 36:

GTCATAGTGA GCCCCATT 18

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 37:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "OLIGONUKLEOTID"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: Komplement (1..17)
- (D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
22 KOMPLEMENTÄR von 385 bis 401"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 37:

CTTCACGAGG ACAAAGT 17

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 38:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "OLIGONUKLEOTID"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: complement (1..17)
- (D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
22 von 237 bis 253"

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 38:

TCGCAAAGAG TCTACCA 33

- (2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 39:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG:

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: 10..33
- (D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
22 DE 101 bis 124"

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 39:

CGCGGATCCA AGATGTTGGA ATACCTGGGC AAA

- (2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 40:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 68 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG:

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature

(B) LAGE: 46..48

(D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
22 DE 305 bis 327"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 40:

CGCGGATCCA CCATGGCTTC TATGACAGGA GGTCAACAAA TGGGACAAAA  
GATCACCAAGT GTAAAACC

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 41:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 36 Basenpaare

(B) ART: Nukleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure

(A) BESCHREIBUNG:

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature

(B) LAGE: Komplement (1..16)

(D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
22 DE 838 to 853"

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature

(B) LAGE: Komplement (18..36)

(D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
22 DE 818 bis 836"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 41:

ATGTTTTTCA CCTCTGGAGG CCTGGACAAT GATGAC 3

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID Nr. 42:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 36 Basenpaare
- (B) ART: Nukleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "OLIGONUKLEOTID"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: 1..19
- (D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
22 von 818 bis 836"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc\_feature
- (B) LAGE: 21..36
- (D) SONSTIGE INFORMATIONEN:/note: = "SEQ ID Nr.  
22 von 838 bis 853"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 42:

GTCATCATTG TCCAGGCCTC CAGAGGTGAA AAACAT 36

#### Patentansprüche

1. DNA-Sequenz, die für ein Polypeptid kodiert, das eine Proteaseaktivität aufweist und fähig ist, den Zelltod zu induzieren, und die aus der Nukleotidsequenz der Sequenz SEQ ID Nr. 22 besteht.
2. DNA-Sequenz nach Anspruch 1, die bei Nukleotid 104 der Sequenz SEQ ID Nr. 22 beginnt und bei Nukleotid 1195 dieser Sequenz aufhört.
3. Menschliches Polypeptid, das eine Proteaseaktivität aufweist und fähig ist, den Zelltod zu induzieren, und das aus der Aminosäuresequenz der Sequenz SEQ ID Nr. 23 besteht und Ty-Protein genannt wird.
4. Verfahren, umfassend die Expression des Ty-Proteins in einer Wirtszelle, die mit einer DNA, die für die Aminosäuresequenz der Sequenz SEQ ID Nr. 23 kodiert, transformiert ist.
5. DNA, die aus der Nukleotidsequenz SEQ ID Nr. 1 besteht.

6. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend das Polypeptid nach Anspruch 3 als eine Arznei.
7. Polypeptid nach Anspruch 3 als eine Arznei.
8. Pharmazeutische Zusammensetzung, die als Wirkstoff eine Arznei nach Anspruch 7 umfaßt.
9. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 8 zur Modulation der Produktion von IL-1 Beta.
10. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 6 zur Modulation des Zelltods.
11. Verwendung des Polypeptids nach Anspruch 3 zur Herstellung einer Arznei für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen.
12. Verwendung des Polypeptids nach Anspruch 3 oder des Polypeptids der Sequenz SEQ ID Nr. 2 zur Herstellung einer Arznei für die Wundheilung.

Es folgen 11 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

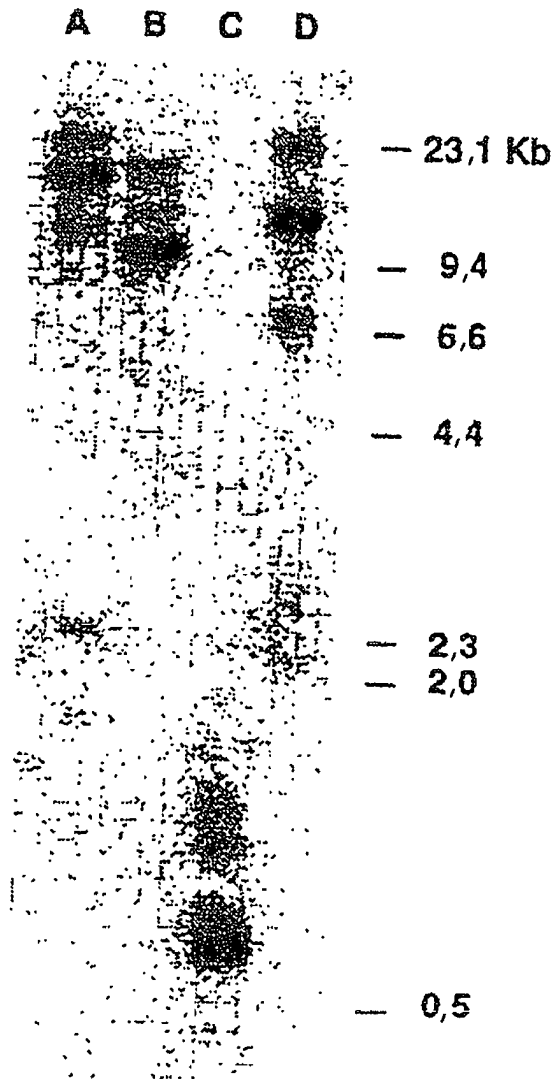


Abbildung 1

1 GAAATGACTACAGAGCTGGAGGCATTTGCTCACCGCCCAGAGCACAAGACCTCTGACAGC 60  
61 ACCTTCCCAGTGTCTTCTGTCTCATGGTGTTCGGGAAGGCATTTGTGGGAAGAAATACTCT 120  
121 GAACAAGTCCCTGATATATTACAATTCAATGAATATTTAAAATGTTGAATAGCAAGAAC 180  
181 TGCCCAAGTTTGAAGGACAAACCCAGGTGATCATCTTCGAGGCCTGCTGTGGTG 235

Abbildung 2

GCTCTTTCCA ACGCTGTAAA AAAGGACAGA GGCTGTCC T ATG GCA GAA GGC	53
Met Ala Glu Gly	
1	
AAC CAC AGA AAA AAG CCA CTT AAG GTG TTG GAA TCC CTG GGC AAA GAT	101
Asn His Arg Lys Lys Pro Leu Lys Val Leu Glu Ser Leu Gly Lys Asp	
5 10 15 20	
TTC CTC ACT GGT GTT TTG GAT AAC TTG GTG GAA CAA AAT GTA CTG AAC	149
Phe Leu Thr Gly Val Leu Asp Asn Leu Val Glu Gln Asn Val Leu Asn	
25 30 35	
TGC AAG GAA GAG GAA AAA AAG AAA TAT TAC GAT GCT AAA ACT CAA GAC	197
Trp Lys Glu Glu Glu Lys Lys Lys Tyr Tyr Asp Ala Lys Thr Glu Asp	
40 45 50	
AAA GTT CCG GTC ATG GCA GAC TCT ATG CAA GAG AAG CAA CGT ATG GCA	245
Lys Val Arg Val Met Ala Asp Ser Met Gln Glu Lys Gln Arg Met Ala	
55 60 65	
GGA CAA ATG CTT CTT CAA ACC TTT TTT AAC ATA GAC CAA ATA TCC CCC	293
Gly Gln Met Leu Leu Gln Thr Phe Phe Asn Ile Asp Gln Ile Ser Pro	
70 75 80	
AAT AAA AAA GCT CAT CCG AAT ATG GAG GCT GGA CCA CCT GAG TCA GGA	341
Asn Lys Lys Ala His Pro Asn Met Glu Ala Gly Pro Pro Glu Ser Gly	
85 90 95 100	
GAA TCT ACA GAT GCC CTC AAG CTT TGT CCT CAT GAA GAA TTC CTG AGA	389
Glu Ser Thr Asp Ala Leu Lys Leu Cys Pro His Glu Glu Phe Leu Arg	
105 110 115	
CTA TGT AAA GAA AGA GCT GAA GAG ATC TAT CCA ATA AAG GAG AGA AAC	437
Leu Cys Lys Glu Arg Ala Glu Glu Ile Tyr Pro Ile Lys Glu Arg Asn	
120 125 130	
AAC CGC ACA CGC CTG GCT CTC ATC ATA TGC AAT ACA GAG TTT GAC CAT	485
Asn Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ile Ile Cys Asn Thr Glu Phe Asp His	
135 140 145	
CTG CCT CCG AGG AAT GGA GCT GAC TTT GAC ATC ACA GGC ATG AAG GAG	533
Leu Pro Pro Arg Asn Gly Ala Asp Phe Asp Ile Thr Gly Met Lys Glu	
150 155 160	

Abbildung 3



GAA GTA TTT CGG AAG GTA CAG CAA TCA TTT GAA ACT CCA AGG GCC AAA	1109
Glu Val Phe Arg Lys Val Gln Gln Ser Phe Glu Thr Pro Arg Ala Lys	
345 350 355	
GCT CAA ATG CCC ACC ATA GAA CGA CTG TCC ATG ACA AGA TAT TTC TAC	1157
Ala Gln Met Pro Thr Ile Glu Arg Leu Ser Met Thr Arg Tyr Phe Tyr	
360 365 370	
CTC TTT CCT GGC AAT TGAAAATGGA AGCCACAAGC AGCCCAGCCC TCCTTAATCA	1212
Leu Phe Pro Gly Asn	
375	
ACTTCAAGGA GCACCTTCAT TAGTACAGCT TGCAATATTA ACATTTTGTA TTTCATATAA	1272
AGTGAAGACA AAAAAAAAAA	1291

Abbildung 3

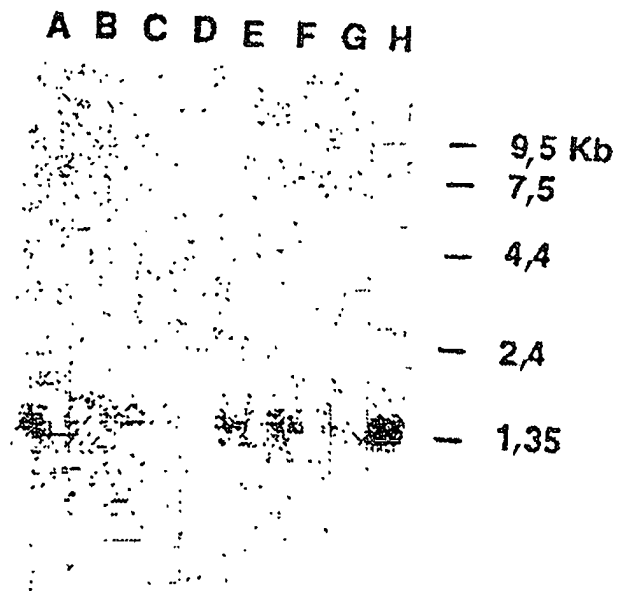


Abbildung 4

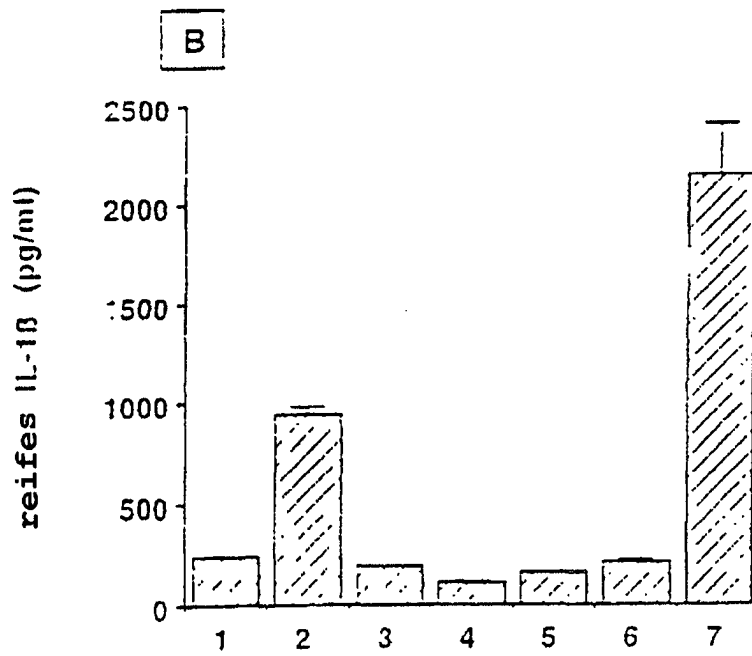
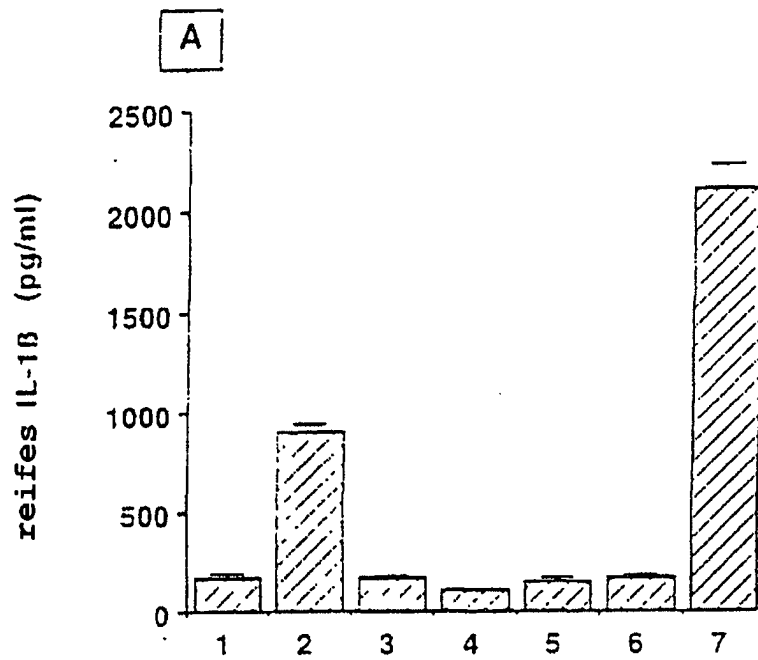


Abbildung 5

A	B	C	D	E	F	PM
						<u>-139,9</u>
						86,8
						-47,8
						-33,3
						-28,6
						-20,7

Abbildung 6

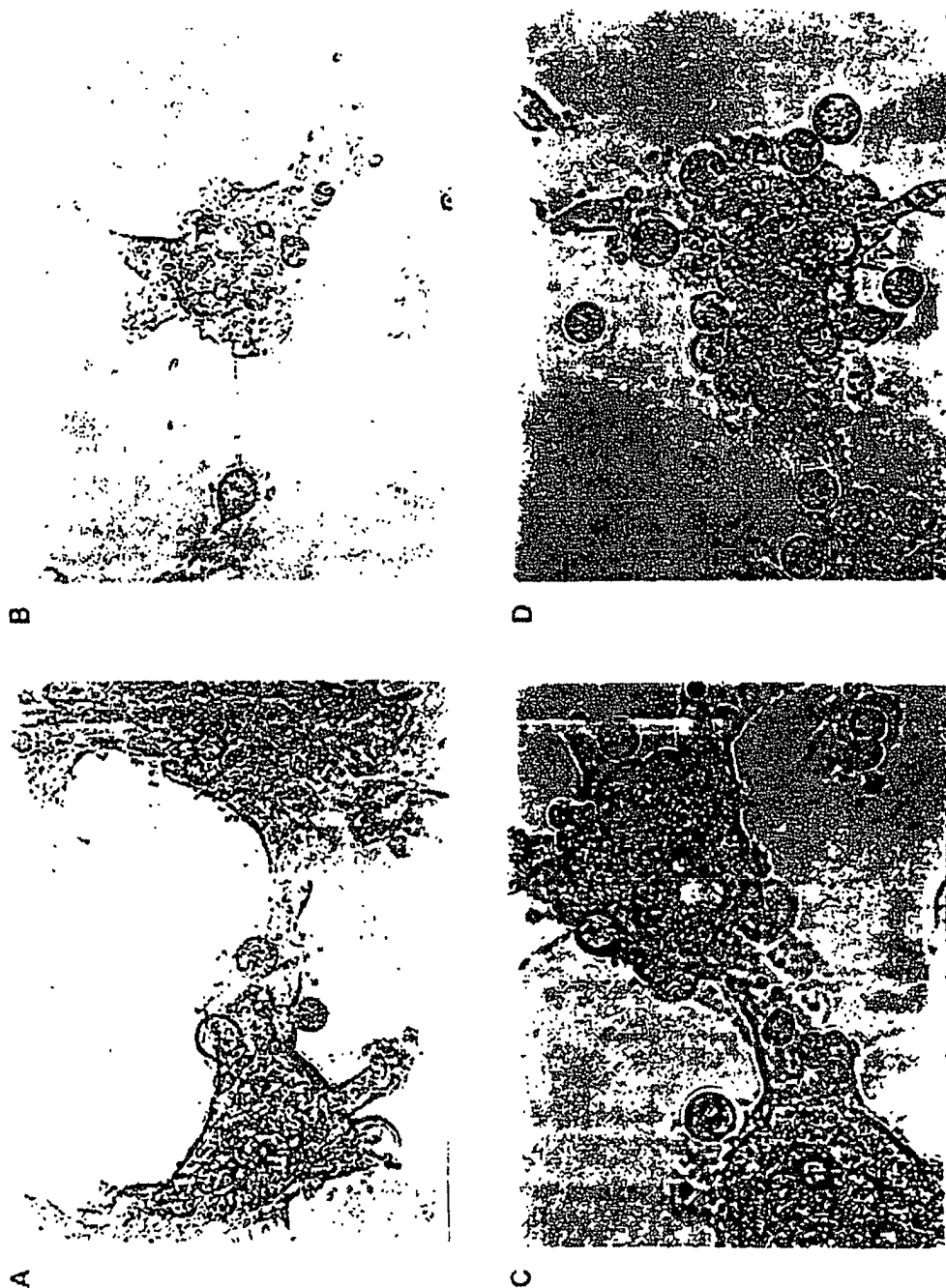


Abbildung 7

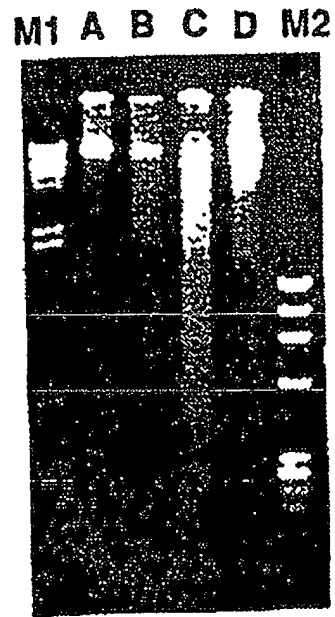


Abbildung 8

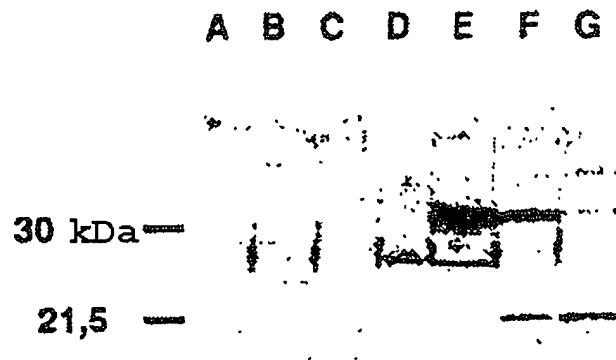


Abbildung 9