

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5121109号

(P5121109)

(45) 発行日 平成25年1月16日 (2013. 1. 16)

(24) 登録日 平成24年11月2日 (2012. 11. 2)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 P 21/06 (2006. 01)

C 1 2 P 21/06

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 14/54 (2006. 01)

C O 7 K 14/54

A 6 1 K 38/00 (2006. 01)

A 6 1 K 37/02

A 6 1 P 43/00 (2006. 01)

A 6 1 P 43/00 1 1 1

請求項の数 31 (全 37 頁)

(21) 出願番号 特願2002-504604 (P2002-504604)
 (86) (22) 出願日 平成13年6月11日 (2001. 6. 11)
 (65) 公表番号 特表2004-523204 (P2004-523204A)
 (43) 公表日 平成16年8月5日 (2004. 8. 5)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/018804
 (87) 国際公開番号 W02001/098455
 (87) 国際公開日 平成13年12月27日 (2001. 12. 27)
 審査請求日 平成20年4月24日 (2008. 4. 24)
 (31) 優先権主張番号 60/211, 832
 (32) 優先日 平成12年6月15日 (2000. 6. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/224, 128
 (32) 優先日 平成12年8月10日 (2000. 8. 10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 591002957
 グラクソスミスクライン・リミテッド・ラ
 イアビリティ・カンパニー
 GlaxoSmithKline LLC
 アメリカ合衆国19102ペンシルベニア
 州フィラデルフィア、ノース・シックス
 イーンズ・ストリート200番、ワン・フ
 ランクリン・プラザ
 (74) 代理人 100062144
 弁理士 青山 篠
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生理的に活性な I L-18 ポリペプチドの調製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

カスパーゼと I L-18 ポリペプチド前駆体のポリシストロンの共発現により活性 I L-18 ポリペプチドを製造するための方法であって、

(i) カスパーゼ 4 を該ポリペプチド前駆体と接触させること、および

(ii) 活性ポリペプチドを精製すること

を含み、該ポリペプチド前駆体が、アミノ酸配列 X E Y D (配列中、X は W、L、F、Y、I、V、D、または E から成るアミノ酸の群から選択され、および Y は H、I、A、T、S、P または E から成るアミノ酸の群から選択される) を含むプロテアーゼ活性化モチーフを有するポリペプチドであり、該プロテアーゼのポリシストロンの共発現が、単一のステップで細胞からの I L-18 ポリペプチドの大規模産生を可能にする、方法。

【請求項 2】

カスパーゼと I L-18 ポリペプチド前駆体のポリシストロンの共発現により活性 I L-18 ポリペプチドを製造するための方法であって、

(i) カスパーゼ 5 を該ポリペプチド前駆体と接触させること、および

(ii) 活性ポリペプチドを精製すること

を含み、該ポリペプチド前駆体が、アミノ酸配列 X E Y D (配列中、X は W、L、F、Y、I、V、D、または E から成るアミノ酸の群から選択され、および Y は H、I、A、T、S、P または E から成るアミノ酸の群から選択される) を含むプロテアーゼ活性化モチーフを有するポリペプチドであり、該プロテアーゼのポリシストロンの共発現が、単一の

10

20

ステップで細胞からの I L - 1 8 ポリペプチドの大規模産生を可能にする、方法。

【請求項 3】

カスパーゼと I L - 1 8 ポリペプチド前駆体のポリシストロンの共発現により活性 I L - 1 8 ポリペプチドを製造するための方法であって、

(i)カスパーゼ 4 を I L - 1 8 ポリペプチド前駆体と接触させること、および

(ii)活性 I L - 1 8 ポリペプチドを精製すること

を含み、該プロテアーゼのポリシストロンの共発現が、単一のステップで細胞からの I L - 1 8 ポリペプチドの大規模産生を可能にする、方法。

【請求項 4】

カスパーゼと I L - 1 8 ポリペプチド前駆体のポリシストロンの共発現により活性 I L - 1 8 ポリペプチドを製造するための方法であって、

(i)カスパーゼ 5 を I L - 1 8 ポリペプチド前駆体と接触させること、および

(ii)活性 I L - 1 8 ポリペプチドを精製すること

を含み、該プロテアーゼのポリシストロンの共発現が、単一のステップで細胞からの I L - 1 8 ポリペプチドの大規模産生を可能にする、方法。

【請求項 5】

I L - 1 8 ポリペプチド前駆体がヒトの I L - 1 8 ポリペプチドである、請求項 3 記載の方法。

【請求項 6】

I L - 1 8 ポリペプチド前駆体がヒトの I L - 1 8 ポリペプチドである、請求項 4 記載の方法。

【請求項 7】

カスパーゼとヒト I L - 1 8 ポリペプチド前駆体のポリシストロンの共発現により活性ヒト I L - 1 8 ポリペプチドを製造するための方法であって、

(i)カスパーゼ 4 をヒトの I L - 1 8 ポリペプチド前駆体と接触させて、該ポリペプチド前駆体を活性ヒト I L - 1 8 ポリペプチドに変換すること、ここで、該 I L - 1 8 ポリペプチド前駆体は配列番号 1 のアミノ酸配列、または配列番号 1 のアミノ酸配列中のアスパラギン酸 3 6 およびチロシン 3 7 残基を N 末端配列として保持するその部分を含む、および、

(ii)活性ヒト I L - 1 8 ポリペプチドを精製すること、

を含み、該プロテアーゼのポリシストロンの共発現が、単一のステップで細胞からの I L - 1 8 ポリペプチドの大規模産生を可能にする、方法。

【請求項 8】

カスパーゼとヒト I L - 1 8 ポリペプチド前駆体のポリシストロンの共発現により活性ヒト I L - 1 8 ポリペプチドを製造するための方法であって、

(i)カスパーゼ 5 をヒトの I L - 1 8 ポリペプチド前駆体と接触させて、該ポリペプチド前駆体を活性ヒト I L - 1 8 ポリペプチドに変換すること、ここで、該 I L - 1 8 ポリペプチド前駆体は配列番号 1 のアミノ酸配列、または配列番号 1 のアミノ酸配列中のアスパラギン酸 3 6 およびチロシン 3 7 残基を N 末端配列として保持するその部分を含む、および、

(ii)活性ヒト I L - 1 8 ポリペプチドを精製すること、

を含み、該プロテアーゼのポリシストロンの共発現が、単一のステップで細胞からの I L - 1 8 ポリペプチドの大規模産生を可能にする、方法。

【請求項 9】

活性ヒト I L - 1 8 ポリペプチドが配列番号 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドである、請求項 7 記載の活性ヒト I L - 1 8 ポリペプチドを製造するための方法。

【請求項 10】

活性ヒト I L - 1 8 ポリペプチドが配列番号 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドである、請求項 8 記載の活性ヒト I L - 1 8 ポリペプチドを製造するための方法。

【請求項 11】

カスパーゼと I L - 1 8 ポリペプチド前駆体のポリシストロンの共発現により活性 I L - 1 8 ポリペプチドを製造するための方法であって、

10

20

30

40

50

(i)カスパーゼ 4 を該ポリペプチド前駆体とポリシストロンの共発現させること；および、
(ii)活性ポリペプチドを精製すること
を含み、該プロテアーゼのポリシストロンの共発現が、単一のステップで細胞からの I L - 1 8 ポリペプチドの大規模産生を可能にする、方法。

【請求項 1 2】

カスパーゼと I L - 1 8 ポリペプチド前駆体のポリシストロンの共発現により活性 I L - 1 8 ポリペプチドを製造するための方法であって、
(i)カスパーゼ 5 を該ポリペプチド前駆体とポリシストロンの共発現させること；および、
(ii)活性ポリペプチドを精製すること
を含み、該プロテアーゼのポリシストロンの共発現が、単一のステップで細胞からの I L - 1 8 ポリペプチドの大規模産生を可能にする、方法。

【請求項 1 3】

I L - 1 8 ポリペプチド前駆体から活性 I L - 1 8 ポリペプチドを製造するための方法であって、
(i)ユビキチナーゼをユビキチン/活性 I L - 1 8 ポリペプチド融合物とポリシストロンの共発現させること；および、
(ii)活性 I L - 1 8 ポリペプチドを精製すること
を含み、該プロテアーゼのポリシストロンの共発現が、単一のステップで細胞からの I L - 1 8 ポリペプチドの大規模産生を可能にする、方法。

【請求項 1 4】

カスパーゼと I L - 1 8 ポリペプチド前駆体のポリシストロンの共発現により活性 I L - 1 8 ポリペプチドを製造するための方法であって、
(i)カスパーゼ 4 を I L - 1 8 ポリペプチド前駆体とポリシストロンの共発現させること；および、
(ii)活性 I L - 1 8 ポリペプチドを精製すること
を含み、該プロテアーゼのポリシストロンの共発現が、単一のステップで細胞からの I L - 1 8 ポリペプチドの大規模産生を可能にする、方法。

【請求項 1 5】

カスパーゼと I L - 1 8 ポリペプチド前駆体のポリシストロンの共発現により活性 I L - 1 8 ポリペプチドを製造するための方法であって、
(i)カスパーゼ 5 を I L - 1 8 ポリペプチド前駆体とポリシストロンの共発現させること；および、
(ii)活性 I L - 1 8 ポリペプチドを精製すること
を含み、該プロテアーゼのポリシストロンの共発現が、単一のステップで細胞からの I L - 1 8 ポリペプチドの大規模産生を可能にする、方法。

【請求項 1 6】

I L - 1 8 ポリペプチド前駆体がヒトの I L - 1 8 ポリペプチド前駆体である、請求項 1 3 記載の方法。

【請求項 1 7】

I L - 1 8 ポリペプチド前駆体がヒトの I L - 1 8 ポリペプチド前駆体である、請求項 1 4 記載の方法。

【請求項 1 8】

I L - 1 8 ポリペプチド前駆体がヒトの I L - 1 8 ポリペプチド前駆体である、請求項 1 5 記載の方法。

【請求項 1 9】

活性ヒト I L - 1 8 ポリペプチドが配列番号 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドである、請求項 1 6 記載の方法。

【請求項 2 0】

活性ヒト I L - 1 8 ポリペプチドが配列番号 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドである、請求項 1 7 記載の方法。

【請求項 2 1】

活性ヒト I L - 1 8 ポリペプチドが配列番号 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドである、請求項 1 8 記載の方法。

【請求項 2 2】

ヒト I L - 1 8 ポリペプチド前駆体から活性ヒト I L - 1 8 ポリペプチドを製造するための方法であって、

(i) ユビキチナーゼを、配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有するユビキチン/ I L - 1 8 と ポリシストロンの共発現させること；および、

(ii) 活性ヒト I L - 1 8 ポリペプチドを精製すること

を含み、該プロテアーゼの ポリシストロンの共発現が、単一のステップで細胞からの I L - 1 8 ポリペプチドの大規模産生を可能にする、方法。

【請求項 2 3】

カスパーゼとヒト I L - 1 8 ポリペプチド前駆体の ポリシストロンの共発現によりヒト活性 I L - 1 8 ポリペプチドを製造するための方法であって、

(i) 配列番号 4 のアミノ酸配列を有するカスパーゼ 4 を、ヒトの I L - 1 8 ポリペプチド前駆体と ポリシストロンの共発現させること；および、

(ii) 活性 I L - 1 8 ポリペプチドを精製すること

を含み、該プロテアーゼの ポリシストロンの共発現が、単一のステップで細胞からの I L - 1 8 ポリペプチドの大規模産生を可能にする、方法。

【請求項 2 4】

カスパーゼとヒト I L - 1 8 ポリペプチド前駆体の ポリシストロンの共発現により活性ヒト I L - 1 8 ポリペプチドを製造するための方法であって、

(i) 配列番号 6 のアミノ酸配列を有するカスパーゼ 5 を、ヒトの I L - 1 8 ポリペプチド前駆体と ポリシストロンの共発現させること；および、

(ii) 活性 I L - 1 8 ポリペプチドを精製すること

を含み、該プロテアーゼの ポリシストロンの共発現が、単一のステップで細胞からの I L - 1 8 ポリペプチドの大規模産生を可能にする、方法。

【請求項 2 5】

ヒト I L - 1 8 ポリペプチド前駆体から活性ヒト I L - 1 8 ポリペプチドを製造するための方法であって、

(i) 配列番号 4 のアミノ酸配列を有するカスパーゼ 4 をコードする遺伝子、ヒト I L - 1 8 ポリペプチド前駆体をコードする遺伝子および不完全な S h i n e - D a l g a r n o 配列を有する遺伝子間配列を含む ポリシストロンの発現カセットから、配列番号 4 のアミノ酸配列を有するカスパーゼ 4 をヒト I L - 1 8 ポリペプチド前駆体と ポリシストロンの共発現させること；および、

(ii) 活性 I L - 1 8 ポリペプチドを精製すること

を含み、該プロテアーゼの ポリシストロンの共発現が、単一のステップで細胞からの I L - 1 8 ポリペプチドの大規模産生を可能にする、方法。

【請求項 2 6】

ヒト I L - 1 8 ポリペプチド前駆体から活性ヒト I L - 1 8 ポリペプチドを製造するための方法であって、

(i) ヒト I L - 1 8 ポリペプチド前駆体をコードする核酸配列、不完全な S h i n e - D a l g a r n o 配列を含む遺伝子間核酸配列およびカスパーゼ 5 ポリペプチドをコードする核酸配列を有する ポリシストロンのエレメントを含む ポリシストロンの発現カセットから、配列番号 6 のアミノ酸配列を有するカスパーゼ 5 ポリペプチドおよびヒト I L - 1 8 ポリペプチド前駆体を共発現させること；および、

(ii) 活性 I L - 1 8 ポリペプチドを精製すること

を含み、該プロテアーゼの共発現が、単一のステップで細胞からの I L - 1 8 ポリペプチ

10

20

30

40

50

ドの大規模産生を可能にする、方法。

【請求項 27】

ヒト IL-18 ポリペプチド前駆体から活性ヒト IL-18 ポリペプチドを製造するための方法であって、

(i) ヒト IL-18 ポリペプチド前駆体をコードする核酸配列、不完全な Shine-Dalgarno 配列を含む遺伝子間核酸配列およびカスパーゼ 5 ポリペプチドをコードする核酸配列を有するポリシストロンの要素を含むポリシストロンの発現カセットから、配列番号 6 のアミノ酸配列の 10 から 282 のアミノ酸残基を有するカスパーゼ 5 ポリペプチドおよびヒト IL-18 ポリペプチド前駆体を共発現させること；および、

(ii) 活性 IL-18 ポリペプチドを精製すること

を含み、該プロテアーゼの共発現が、単一のステップで細胞からの IL-18 ポリペプチドの大規模産生を可能にする、方法。

【請求項 28】

ヒト IL-18 ポリペプチド前駆体をコードする核酸配列がポリシストロンのエレメントの 5' 末端に隣接しており、遺伝子間核酸配列がヒト IL-18 ポリペプチド前駆体をコードする核酸配列の 3' 末端に隣接しており、カスパーゼ 5 ポリペプチドをコードする核酸配列が遺伝子間核酸配列の 3' 末端に隣接している、請求項 27 記載の方法。

【請求項 29】

カスパーゼ 5 ポリペプチドがさらに、カスパーゼ 5 ポリペプチドのアミノ末端に隣接してヘキサ-ヒスチジンタグ配列を含む、請求項 28 記載の方法。

【請求項 30】

ヒト IL-18 ポリペプチド前駆体から活性ヒト IL-18 ポリペプチドを製造するための方法であって、

(i) 配列番号 6 のアミノ酸配列からなるカスパーゼ 5 ポリペプチドを、配列番号 1 のアミノ酸配列からなるヒトの IL-18 ポリペプチド前駆体とポリシストロンの共発現させること；および、

(ii) 活性 IL-18 ポリペプチド（配列番号 3）を精製すること

を含み、該プロテアーゼのポリシストロンの共発現が、単一のステップで細胞からの IL-18 ポリペプチドの大規模産生を可能にする、方法。

【請求項 31】

ヒト IL-18 ポリペプチド前駆体から活性ヒト IL-18 ポリペプチドを製造するための方法であって、

(i) 配列番号 4 のアミノ酸配列を有するカスパーゼ 4 を、ヒトの IL-18 ポリペプチド前駆体とポリシストロンの共発現させること；および、

(ii) 活性 IL-18 ポリペプチドを精製すること

を含み、該プロテアーゼのポリシストロンの共発現が、単一のステップで細胞からの IL-18 ポリペプチドの大規模産生を可能にする、方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

（発明の背景）

本発明は、生理的に活性なポリペプチドを製造するための方法、より詳細には、活性ヒト IL-18 を製造するための方法に関する。

インターフェロン- γ 誘導因子としても知られる IL-18 は、近年見出された新規なサイトカインである。活性 IL-18 は 157 のアミノ酸残基を含む。これは、T 細胞および脾臓細胞によるインターフェロン- γ 産生の誘導、NK 細胞の殺滅活性の増大、および未熟型 CD4+T 細胞の Th1 細胞への分化の促進を含む強い生物活性を有する。加えて、ヒト IL-18 は GM-CSF の産生を増し、そして IL-10 の産生を減らす。IL-18 は IL-12 よりも大きなインターフェロン- γ 誘導能力を有することが示されており、そして異なるレセプター経路でシグナル伝達し、および別個のシグナル伝達経路を利用する。

10

20

30

40

50

【0002】

IL-18、コードしているヌクレオチド配列、および精製タンパク質の一定の物理化学特性が公知である(Ushio, S., et al., 1996, J. Immunology, 156, 4274-4279; Dinarello, C.A., et al. 1998, J. Leukocyte Biology, 1998, 63, 658-664)。

株式会社ハヤシバラ生物化学研究所の(「ハヤシバラ」)、1996年1月17日に公開された、欧州特許第0692536号に対応する米国特許第5,192,324号は、免疫反応細胞によるIFN- γ の産生を誘導するマウスタンパク質、このタンパク質は一定の物理化学的特性および限定された部分アミノ酸配列を有するとしてさらに特徴づけられている、を開示する。さらに、157のアミノ酸配列、その2つのフラグメント、該タンパク質をコードしているDNA(471bp)、ハイブリドーマ、タンパク質精製法および該タンパク質を検出する方法も開示されている。

10

【0003】

1996年5月22日に公開された、欧州特許第0712931号に対応するハヤシバラの米国特許第6,214,584号は、157アミノ酸のヒトタンパク質およびその相同物、該タンパク質をコードしているDNA、形質転換体、該タンパク質の調製法、該タンパク質に対するモノクローナル抗体、ハイブリドーマ、タンパク質精製法、該タンパク質を検出する方法、および悪性腫瘍、ウィルス性疾患、細菌感染症、および免疫疾患の治療および/または予防法を開示する。

【0004】

1997年7月10日に公開されたIncyte Pharmaceuticals, Inc.の国際公開第97/24441号パンフレットは、IL-18前駆体に対応する193アミノ酸のタンパク質およびコードしているDNAを開示する。

20

ヒトの細胞では、遺伝子の発現により形成されたポリペプチドは、細胞内酵素により処理されて、部分消化され、および糖鎖を付加され得る。医薬に満足に組み込まれるポリペプチドは、ヒトの細胞中同様に加工されたものであってよい。ほとんどのサイトカインは、通常、生物活性のない前駆体として製造され、次いで細胞内酵素により加工されて活性ポリペプチドに変換されることが知られている。

【0005】

IL-18ポリペプチドは通常、ヒトの細胞中に、193のアミノ酸の前駆体の形態で、および生物活性のない形態で存在する。IL-18前駆体はプロ-IL-18とも呼ばれる。その前駆体から活性IL-18を製造する一つの方法が、1998年1月21日に公開された、欧州特許第0819757号に対応するハヤシバラの米国特許第5,879,942号により教示されている。該特許は、IL-18の前駆体を活性IL-18に変換する酵素またはタンパク質を開示する。

30

【0006】

活性IL-18をその前駆体から製造する他の方法は、1998年1月28日に公開されたハヤシバラの、欧州特許第0821005号に対応する米国特許第5,891,663号により教示されている。該特許は、IL-18前駆体をインターロイキン-1 β -変換酵素(「ICE」)と接触させることを開示する。該特許および引用文献の教示を、引用により組み込む。

40

【0007】

アポトーシスおよび炎症の媒介物質としてのICEの役割が、文献に広く研究されている。ICEがインターロイキン-1およびインターロイキン-18両方の前駆体を活性形態に加工することができることも知られている(Thornberry, NA, et al., 1992, Nature 356, 768-774; Ghayur, T et al., 1997, Nature 386, 619-623)。

【0008】

(発明の概要)

本発明は、活性化酵素を用いてヒトIL-18の前駆体(プロ-IL-18としても知られる)をインビトロで活性化するための方法であって、ヒトIL-18前駆体を活性化酵素、例えばカスパーゼ4およびカスパーゼ5などと接触させることを含む方法を提供する

50

。より詳細には、本発明は、カスパーゼ 4 およびカスパーゼ 5 が I L - 1 8 の前駆体に作用して、特異的部位を切断し、免疫反応細胞中での I F N - ガンマの産生を誘導する活性ポリペプチドを産生する方法を提供する。

【0009】

本発明はさらに、該タンパク質を活性化プロテアーゼと共発現させることを含む、ヒト I L - 1 8 の前駆体のインビボでの活性化のための方法を提供する。より詳細には、本発明は、I C E_{R E L} I I としても知られるカスパーゼ 4、I C E_{R E L} I I I としても知られるカスパーゼ 5、および I L - 1 ポリペプチドの前駆体に作用してそれを I F N - γ の産生を誘導する活性ポリペプチドへと変換するユビキチン特異的プロテアーゼなどのプロテアーゼを用いて、I L - 1 8 をインビボで活性化する方法を提供する。

10

【0010】

(発明の詳細な説明)

カスパーゼ 4 および 5 は、インターロイキン-1 β 変換酵素 (I C E)、これはアミノ酸配列 X E Y D (配列中、X は W、L、F、Y、I、V、D または E から成る群から選択され、E はグルタミン酸であり、Y は H、I、A、T、S、P または E から成るアミノ酸の群から選択され、および D はアスパラギン酸である) を含むプロテアーゼ活性化モチーフを含む基質を選択的に分解する、を含むシステインプロテアーゼのファミリーのメンバーである (Munday, N.A., et al., 1995, J. Biol. Chemistry, 270, 15870-15876; Talanian, R.V. et al, 1997, J. Biol Chemistry 272, 9677-82; Thornberry, N.A. et al. 1997 J. Biol. Chemistry 272, 17907-11)。カスパーゼ-5 の基質認識は、I C E およびカスパーゼ-4 と本質的に同一であり、カスパーゼの他のメンバーとは異なると考えられている (Talanian, R.V. et al, 1997, J. Biol. Chemistry 272, 9677-82; Thornberry, N.A. et al. 1997 J. Biol. Chemistry 272, 17907-11)。カスパーゼ 4 は、E P - B - 0 7 5 4 2 3 4 号に開示されている。カスパーゼ 5 は、米国特許第 5, 5 5 2, 5 3 6 号および米国特許第 5, 7 6 0, 1 8 0 号に開示されている。

20

【0011】

ユビキチン特異的プロテアーゼは、進化の過程で保存されている 7 6 アミノ酸のユビキチンペプチドを、それに融合しているタンパク質の N 末端から正確に切断することができる A T P 非依存性酵素のファミリーである。これらのプロテアーゼは、ユビキチンタンパク質のカルボキシ末端のアミノ酸残基とユビキチンが結合しているいずれかの非ユビキチンタンパク質の α -アミノ基の間のペプチド結合を特異的に切断する。サッカロマイセス セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来のユビキチン特異的プロテアーゼ、例えば U b p 1、U b p - 2 および U b p - 3 が公知であり、組換え発現されてユビキチン融合タンパク質をインビボおよびインビトロの両方で標的する脱ユビキチン化反応を触媒することができる (Baker, RT et al., 1992, J. Biol. Chem. 267: 23364-23375; Baker, RT et al., 1994 J. Biol. Chem. 269: 25381-25386)。サッカロマイセス セレビジエ ユビキチン特異的プロテアーゼの特異性により、プロリンから始まるものを除き、あらゆるペプチドからユビキチンを正確に除去することが可能である。マウスの U n p などの他の種由来のユビキチン特異的プロテアーゼおよびそのヒト相同物 U n p h は、プロリンの前でも有効に切断することができる (Gilchrist CA et al. 1997, J. Biol. Chem. 272: 32280-32285)。つまり、インビトロで組み合わせた場合、またはユビキチン特異的プロテアーゼと共発現させた場合に、正確には融合ユビキチンペプチドの除去により、実質上あらゆる所望の N 末端を作成することができる。ユビキチン特異的プロテアーゼは、米国特許第 5, 2 1 2, 0 5 8 号; 米国特許第 5, 6 8 3, 9 0 4 号; 米国特許第 5, 3 9 1, 4 9 0 号; および米国特許第 5, 4 9 4, 8 1 8 号に開示されている。

30

40

【0012】

免疫反応細胞中で、その構造、源、および起源とは無関係に I F N - γ の産生を誘導する活性ポリペプチドを産生する限りあらゆる天然および人工のカスパーゼ 4、カスパーゼ 5 またはユビキチンプロテアーゼを、本発明に用いることができる。

ヒト細胞においては、遺伝子の発現により形成されたポリペプチドは、細胞内酵素により

50

加工され得る。細胞内酵素はプロ-IL-18などの前駆体タンパク質をその活性形態に切断する。医薬に満足に組み込まれるポリペプチドは、ポリペプチドがヒト細胞において受けるプロセッシングと同様のプロセッシングを受けるべきである。ポリペプチドは通常ヒト細胞中では前駆体の形態で、および生物活性のない形態で存在する。IL-18ポリペプチドを含むほとんどのサイトカインは、生物活性のない前駆体として通常産生され、次いで細胞内酵素により加工されて活性ポリペプチドに変換されることが公知である。

【0013】

本発明中において言及するIL-18の前駆体は、例えば、ポリペプチドをコードする領域を含んでいるDNA、例えば、配列番号2のヌクレオチド配列を有するDNAを導入することにより形質転換された、ポリペプチドを固有に産生する細胞、哺乳動物の宿主細胞、および細菌系、例えばイー.コリ中に存在する。そのような哺乳動物および細菌宿主細胞を用いて、前駆体IL-18を、活性IL-18を生成するためのプロテアーゼと共発現させることができる。

【0014】

インビトロでの切断

本発明は、ポリペプチド前駆体を活性化酵素と接触させることを含む、ポリペプチド前駆体、例えばIL-18の前駆体などのインビトロでの活性化のための方法を提供する。

好ましい具体例において、本発明は、ヒトIL-18前駆体をカスパーゼ4またはカスパーゼ5と接触させることを含む、ヒトIL-18前駆体のインビトロでの活性化のための方法を提供する。

好ましい具体例において、IL-18前駆体は、アミノ酸配列XEYD、ここでXは、W、L、F、Y、I、V、DまたはEから成るアミノ酸の群から選択され、およびYはH、I、A、T、S、PまたはEから成るアミノ酸の群から選択される、を含む特異的プロテアーゼ活性化モチーフを認識する活性化酵素で切断することによりインビトロで活性化される。

【0015】

さらに好ましい具体例では、IL-18前駆体は、配列番号1中のアスパラギン酸36およびチロシン37の間のペプチド結合をカスパーゼ4またはカスパーゼ5で切断することによりインビトロで活性化され、免疫反応細胞中でIFN- γ の産生を誘導する活性ポリペプチドを生ずる。

【0016】

一般に、カスパーゼ4またはカスパーゼ5は、それを固有に産生する細胞および組換えDNA技術を適用することにより得られた形質転換体から得ることができる。そのような細胞の例は、哺乳動物およびヒトの細胞、例えば上皮細胞、内皮細胞、間質細胞、軟骨細胞、単核細胞、顆粒球、リンパ球、およびその確立された細胞系統などから確立されたものである。形質転換体の例には、カスパーゼ5をコードしているDNAを微生物および動物細胞に導入することにより得られる形質転換微生物および動物細胞が含まれる。カスパーゼ4またはカスパーゼ5は、当該分野で用いられる常套の培養媒地中でこれらの形質転換体を培養し、次いでそれらを未処置の培養物の形態で、または培養物から分離した後に超音波で処理するか、または低張溶媒にこれらの形質転換体を浸すことにより、生じた細胞残さ、または培養上清と細胞残さを含む混合物に、当該分野において酵素を精製するために用いられる以下の常套法、塩析、透析、濾過、濃縮、沈降分離、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、および等電点電気泳動を用いることにより調製される。これらの精製法の2またはそれ以上を組み合わせる用いることができる。カスパーゼ4（図5）

（配列番号5）およびカスパーゼ5（図7）（配列番号7）をコードしているDNA、およびカスパーゼ4およびカスパーゼ5を産生する形質転換体は当該分野で公知である。例えば、酵素は、開示されているように（Munday NA et al., 1996, J. Biol. Chem 26:15870-76）、プロ領域を欠いているN末端切断ペプチドの発現によりイー.コリ中で活性形態

10

20

30

40

50

で産生されてよい。

【0017】

ポリペプチド前駆体、例えばプロ-IL-18を固有に産生する細胞または前駆体を産生するために形質転換された細胞は、普通培養培地中で培養する。好ましい培養培地には、当該分野で周知の培養培地、例えばLuria-Bertani培地、またはトリプトンおよび酵母抽出物を含む、イー.コリを培養するための他の栄養培地が含まれる。

【0018】

前記の方法を用いて得られるカスパーゼ4またはカスパーゼ5は生じた培養物中に共存させてよく、または培養物から分離した、もしくは分離していない増殖細胞を粉碎した後に生じる混合物または細胞残さに添加する。所望されるカスパーゼ4またはカスパーゼ5の量は、前駆体の等モル未満である。カスパーゼ4またはカスパーゼ5は前駆体と、カスパーゼ4またはカスパーゼ5が前駆体に作用するのを許容する温度およびpHで反応させるが、通常は、カスパーゼ4またはカスパーゼ5は前駆体と、所望の量の活性ポリペプチドが原料である前駆体から形成されるまで、約4℃〜40℃の温度および約6〜9のpHにて反応させる。好ましい温度は約25℃であり、および好ましいpHは約7.2である。こうして、活性ポリペプチドを含む反応混合物を得ることができる。

【0019】

カスパーゼ4またはカスパーゼ5の活性は、1μgのカスパーゼ4またはカスパーゼ5当たり、1分当たりに産生される加工ポリペプチドのμgにより、活性に関するユニットにより測定および表してよい。

【0020】

インビボでの共発現

本発明は、ポリペプチド前駆体、IL-18の前駆体などのインビボでの活性化のための、タンパク質を活性化プロテアーゼと共発現させることを含む方法を提供する。より詳細には、本発明は、IL-18のインビボでの活性化のための、ポリペプチド、例えばIL-18などのプロテアーゼ、例えばICERELIIとしても知られるカスパーゼ4、ICERELIIIとしても知られるカスパーゼ5、およびユビキチンとの二シストロンの共発現(bicistronic co-expression)を含む、IL-18のインビボでの活性化のための方法を提供する。

【0021】

好ましい具体例では、ICERELIIとしても知られるヒトのカスパーゼ4が、ヒトのプロ-IL-18と二シストロンの共発現して、インビボでプロ-IL-18が活性IL-18にプロセッシングされる。

他の好ましい具体例では、切断されたヒトカスパーゼ4（配列番号4）がヒトプロ-IL-18と二シストロンの共発現して、プロ-IL-18（配列番号1）が活性IL-18（配列番号3）へとインビボでプロセッシングされる。

他の好ましい具体例では、ICERELIIIとしても知られるヒトカスパーゼ5がヒトプロ-IL-18と二シストロンの共発現して、プロ-IL-18が活性IL-18（配列番号3）へとインビボでプロセッシングされる。

【0022】

さらに他の好ましい具体例では、ユビキチンプロテアーゼ1（Ubp-1）がUb-IL-18の活性IL-18へのインビボでのプロセッシングのために、ユビキチン-IL-18（Ubp-IL-18）と二シストロンの共発現される。

さらに他の好ましい具体例では、ユビキチンプロテアーゼ1（Ubp-1）が、UB-IL-18（配列番号9）の活性IL-18（配列番号3）へのインビボプロセッシングのためにユビキチン-IL-18（Ubp-IL-18）と二シストロンの共発現する。

最も好ましい具体例では、切断されたヒトカスパーゼ5（配列番号5）がヒトプロ-IL-18と二シストロンの共発現して、プロ-IL-18（配列番号1）が活性IL-18（配列番号3）へとインビボでプロセッシングされる。

【0023】

カスパーゼ 4 またはカスパーゼ 5 をコードしている DNA およびポリペプチドの前駆体をコードしている DNA を共に適当な細菌または哺乳動物宿主細胞中に導入して、それを形質転換する。この場合、DNA の発現により形成されたカスパーゼ 4 またはカスパーゼ 5 が、同じ形質転換体中での DNA の発現により形成されたポリペプチド前駆体に作用して、活性ポリペプチドを形成する (図 11 および 15)。好ましい宿主細胞は、ヒト、サル、マウスおよびハムスター由来の、通常宿主として用いられる表皮細胞系統、間細胞、神経芽細胞系統、造血細胞系統、例えば 3 T 3 スイスアルビノ細胞 (ATCC CCL 92) を含む 3 T 3 細胞、C 1 2 7 1 細胞 (ATCC CRL 1616)、CHO-K 1 細胞を含む CHO 細胞 (ATCC CCL 61)、CV-1 細胞 (ATCC CCL 70)、COS-1 細胞を含む COS 細胞 (ATCC CCL 1650)、HeLa 細胞 (ATCC CCL 2)、MOP-8 細胞を含む MOP 細胞 (ATCC CRL 1709) およびその変異体である。最も好ましい宿主細胞はイー.コリ.である。カスパーゼ 4 または 5 をコードしている DNA およびポリペプチドの前駆体をコードしている DNA をイー.コリ.に導入するのに最も好ましい方法は、当該分野で周知の、ルビジウムクロライドを用いるケミカルトランスフォーメーションである。カスパーゼ 4 またはカスパーゼ 5 をコードしている DNA および該ポリペプチドの前駆体をコードしている DNA を哺乳動物宿主細胞へ導入する方法には、常套の DEAE-デキストラン法、リン酸-カルシウム法、エレクトロポレーション、リポフェクション、マイクロインジェクション、およびレトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルスおよびワクシニアウイルスを用いるウイルス感染法が含まれる。この場合、適当なプロモーター、エンハンサー、複製起点、末端部位、スプライシング配列、ポリアデニル化配列および/または選択マーカーを含む pCD、pcDL-SRα、pKY4、pCDM8、pCEV4、pME18S および pSV2-gpt を、Ausubel FM et al., 1994 Current Protocols in Molecular Biology, New York: Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience に記載される常套法に従い利用することができる。活性ポリペプチドを製造するために、免疫検出により観察されたクローンを、普通培養培地中で培養後に形質転換体から所望のクローンを選択することにより選択する。活性ポリペプチドを含む培養物は、クローン化された形質転換体を当該分野で用いられる通常の普通培養を用いて培養することにより得ることができる。ポリペプチドの前駆体を固有に産生する細胞およびポリペプチドを産生するために形質転換された他の細胞に関しては、それらは、ポリペプチドを活性化する活性化酵素、例えばカスパーゼ 4、カスパーゼ 5 およびユビキチンと共に前駆体を産生し得る。哺乳動物宿主細胞を用いる組換え DNA 技術は、Glutzman, Cell, 23: 175 (1981) Mulligan, PNAS78:2072(1981) に詳細に開示されている。細菌宿主細胞を用いる組換え DNA 技術は、Protein Expression: A Practical Approach, S.J. Higgins and B.D.Hames eds. 1999, New York, Oxford University Press に開示されている。

【0024】

好ましい具体例では、活性 IL-18 ポリペプチドを含む生じた反応混合物および培養物をそのまま IFN-γ インデューサーとして用いることができる一方で、培養物中の細胞を超音波、細胞溶解酵素および/または界面活性剤により粉碎した後、濾過、遠心分離等、タンパク質精製に関して記載されている以下の常套の工業的方法: Principles and Practice, Cantor, C.R. ed. 1993, New York, Springer-Verlag を行ない、生じた細胞および細胞残さからポリペプチドを分離する。細胞および細胞残さを含まないポリペプチドは、生物活性物質を精製するために当該分野で用いられる常套の精製法、例えば、塩析、透析、濾過、濃縮、沈降分離、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、ゲル電気泳動および等電点電気泳動により精製してよい。所望の場合、これらの精製法の 2 またはそれ以上を組み合わせ用いることができる。生じる精製ポリペプチドは、その最終用途に沿うように、液体または固体精製物へと濃縮および凍結乾燥することができる。

【0025】

本発明のニシストロンの発現カセットは、既の開示されているような (Tobias, J.W. et al

10

20

30

40

50

l., Journal of Biological Chemistry 1991. 266(18): p.12021.12028) 適当なカスパーゼ4/カスパーゼ5またはユビキチナーゼ切断認識部位を含む実質上あらゆるペプチドをインビボでプロセシングするために用いることができる多用途のベクターである。ニシストロンの発現は、両遺伝子が同じ転写ユニットに結合して両遺伝子の少しずつの持続的な発現を確実にするので、他の共発現法に勝る利点を提供する。これは、一のプラスミドが徐々に失われる可能性のあるデュアルプラスミド系、または実験間で各プロモーターからの発現が変動する可能性のある単一プラスミドデュアルプロモーター系と対照的である。特に、ここに記載するニシストロンの発現系は、酵素、サイトカイン、成長因子および他のタンパク質分解を活性化することのできるタンパク質のインビボでの活性化に理想的であり、それゆえ単一のステップで細胞からそのようなタンパク質を大規模で産生すること、および別のインビトロでの活性化ステップの必要性を除去することができる。

10

【0026】

活性化プロテアーゼ、カスパーゼ4 (Ala105からAsn377)またはカスパーゼ5 (Ile146からAsn418)を、2つの遺伝子の転写融合物を作成するために、プロ-IL-18配列の直後にN-末端-6-His融合物としてサブクローニングした。T7ターミネーター配列は、ニシストロンの転写ユニットの転写終結のために、カスパーゼ4配列の下流に配置する。不完全なShine-Dalgarno配列を含む小さな遺伝子間領域も、カスパーゼ4配列から最小限の翻訳の開始のみを可能とするように付加した(図10および14)。他の調節領域には、17塩基対のプロモーター領域のすぐ下流に位置する25塩基対のlacオペレーター配列が含まれるが、17塩基対のプロモーター領域には、プラスミド上に位置するlac-I遺伝子のコピーによりコードされ、T7 RNAポリメラーゼがない場合に基本的転写を抑制するlacリプレッサーが結合する。プロIL18/Casp4およびプロIL18/Casp5と名付けた合成プラスミドは、T7ポリメラーゼ遺伝子の誘導性染色体コピーを含むイー.コリBL21(DE3)株に次いで別々に感染させた。

20

【0027】

ニシストロンカセットの転写は、T7 RNAポリメラーゼ遺伝子の溶原性のコピーからコードされるファージT7 RNAポリメラーゼタンパク質により制御される、T7プロモーターの管理下にある。T7ポリメラーゼのこの染色体コピーそれ自体は、イソプロピル-1-チオ-b-Dガラクトピラノシドの添加により誘導されるlacUV5プロモーターのコントロール下にある。誘導によりプロ-IL-18およびHis-カスパーゼ-4またはHis-カスパーゼ-5が協調して転写および翻訳される。発生期に翻訳されたカスパーゼ-4またはカスパーゼ-5は、プロIL-18のタンパク質分解の活性化を起こす活性体到自己プロセスされる。翻訳された両IL-18前駆体ならびに転写後に活性化されたIL-18はイー.コリ中において大概是溶性である。N-末端チロシンを含む成熟活性IL-18は、常套のクロマトグラフィー法による誘導後に細菌細胞溶解物から直接精製する。カスパーゼ-4での成熟IL-18への切断は、4時間37℃または18時間29℃により完了し(図11)、カスパーゼ5での成熟IL-18への切断は、18時間29℃にて完了する(図15)。

30

【0028】

最も好ましい具体例では、本発明は図4(配列番号4および配列番号5)に示す切断カスパーゼ4または図5(配列番号6および配列番号7)に示す切断カスパーゼ5を用いる。カスパーゼ4およびカスパーゼ5の切断は、Munday, N.A., et al., 1995, J. Biol. Chemistry, 270, 15870-15876に開示されている。

40

【0029】

本発明により、ユビキチンc-末端ヒドロラーゼの活性により活性IL-18へと変換されるN-末端ユビキチンIL-18融合物(前駆体)とのユビキチン特異的プロテアーゼの共発現により活性ポリペプチドを作成する方法が提供される。オーセンティックなN末端チロシンを含む76のアミノ酸のユビキチンタンパク質をヒトIL-18の成熟N末端に融合し、そして例えば配列番号10および配列番号11に示すように、イー.コリ中でユビ

50

キチン特異的プロテアーゼと共発現する。ユビキチンは分解に備えてタンパク質をマークする機能を持つ、真核細胞中に見出される高度に保存された76残基のタンパク質である(Baker, R.T., Current Opinion in Biotechnology, 1996. 7(5): p.541-6)。ユビキチンは、真核細胞中では内部発現されるが細菌中には存在しないユビキチン特異的プロテアーゼの活性によりタンパク質から特異的に切断される。ユビキチン融合タンパク質とユビキチン特異的プロテアーゼのイー.コリ中での共発現によっても、ユビキチンが効果的に除去される(Baker, R.T. et al., Journal of Biological Chemistry, 1992. 267(32): p. 23364-75)(図20)。加えて、これらの脱ユビキチン化酵素のほとんどは、プロリンを除く事実上あらゆるアミノ酸の前で切断することができる。つまり、成熟IL-18からのユビキチンの切断が、P1'位での大きな芳香族チロシン残基の存在にも関わらず、可能である。

10

【0030】

ユビキチン-IL-18(Ub-IL-18)およびユビキチンプロテアーゼ-1(Ubp-1)の共発現(Tobias, J.W. et al., Journal of Biological Chemistry, 1991, 266(18): p.12021.12028)は、誘導性T7プロモーターのコントロール下の2つの遺伝子のニシストロンの発現によりなされる。成熟IL-18は、進化上保存された76アミノ酸のユビキチンペプチドとのN末端融合物として発現される。Ub-IL-18cDNAを、pET28aベクター内に、T7RNAポリメラーゼプロモーターのコントロール下にサブクローニングする。その結果、全長のユビキチン特異的プロテアーゼをコードしているcDNAがT7終結配列の下流にサブクローニングされる(図19)。両Ub-IL-18およびユビキチン特異的プロテアーゼcDNAは、Ub-IL-18およびユビキチン特異的プロテアーゼタンパク質が別個に翻訳される単一のmRNA転写産物へと転写される。

20

【0031】

前記のように、本発明により得られる活性ヒトIL-18ポリペプチドは、有用な生物活性物質としてのIFN- γ の産生を誘導する活性を有し、KG-1(ヒトmyelomonocytic1細胞系統)細胞(図21)および精製されたヒトPBMCs(図22)からのIFN γ の産生を刺激する。

全公開文献および特許文献はここに、引用により組み込む。以下の実施例により本発明をさらに説明するが、本発明を制限するものではない。

【0032】

30

実施例1-IL-18前駆体(プロ-IL-18)の調製

ヒト-IL-18前駆体を、イー.コリ中で、N-末端ヘキサ-ヒスチジンタグ標識融合物として発現させた。発現プラスミド、プロEx-hIL18は、イソプロピル-1-チオ- β -D-ガラクトピラノシド(IPTG)を用いる誘導性発現のためのTrcプロモーターおよびIacIqを含むベクター、pPROEX-1(Life Technologies)から得た。組換え発現ベクターを構築するために、完全なカスパーゼ5-前駆体遺伝子を含むDNAフラグメントを、5'にNdeIを、そして3'にBamHI制限エンドヌクレアーゼ部位をテイリングしたcDNAクローンからPCR増幅した。増幅産物をpPROEX-中のこれら2つの制限部位の間にサブクローニングし、こうしてベクター中に存在するヘキサヒスチジンコーディング配列とのインフレームのN末端融合物を作成した。

40

結果として生じるプラスミドを、1mMのIPTGを5時間37℃にて用いる誘導の後、DH10B宿主細胞中で発現させた。組換えタンパク質を、誘導した培養物の遠心分離後に得られた細胞ペレットから回収した。

【0033】

実施例2-プロ-IL-18の精製

実施例1記載のごとくプロ-IL-18を発現しているイー.コリ細胞1.5kgを、3.6Lの溶解バッファーC(50mMのトリスHCl、10mMのBME、0.5MのNaCl、5%のグリセロール、1 μ g/mlのペプスタチンA、1 μ g/mlのロイペプシン、0.4mMのAEBSF)中に懸濁し、マイクロフルイディクス(Microfluidics)を12,000psiにて通す2回のパスにより溶解し、28,000 $\times$ gにて遠心分離し、次い

50

で3.7 Lの上清を回収した。5 mMのイミダゾールを含有するバッファーC(バッファーD)で前平衡した600 mlのNiNTAアガロースを上清に添加し、スラリーを1時間インキュベートし、ブローIL-18を捕獲した。スラリーを低速(3,000 rpm)で遠心分離し、上清をデカントし、次いでスラリーをカラムにつめた。カラムをバッファーDで洗浄し、次いでブローIL-18をバッファーC中300 mMのイミダゾールで溶離した。プールをバッファーE(25 mMのHEPES、10 mMのBME、pH 8.0)にて透析し、次いで同じバッファーで平衡化したDEAE ToyoPearl 650 mMカラムにのせた。カラムをバッファーE中0~0.5 MのNaClの線形勾配で溶離した。プールは、650 mgの>90%の純粋なブローIL-18を含んだ。

【0034】

10

実施例3—カスパーゼ4の調製

ヒトのカスパーゼ4をN末端ヘキサヒスチジンタグ標識融合物としてイー.コリ中で発現させた。発現プラスミド、pET16b—カスパーゼ4は、ファージT7プロモーターを含むベクターpET16b(Novagen)から得た。組換えベクターを、N末端にヘキサヒスチジンコーディング配列を組み込み、NcoIおよびXhoI制限エンドヌクレアーゼ部位をテイリングしているカスパーゼ4活性ドメイン(アミノ酸1146からAsn418)のPCR増幅により構築した。生じたPCR産物を次いでこれら2つの制限部位の間にサブクローニングし、N末端ヘキサヒスチジンのカスパーゼ4融合ベクターを作成した。

【0035】

20

生じたプラスミドを、1 mMのIPTGを用いる誘導後にカスパーゼ4の誘導性の発現を可能とするlacUV5プロモーターコントロール下にT7RNAポリメラーゼの染色体コピーを含む、溶原性のBL21DE3イー.コリ株に形質転換した。活性タンパク質を、37℃にて3時間誘導後に単離した細胞ペレットから精製した。

【0036】

実施例4—カスパーゼ4の精製

実施例2記載のN末端ヘキサヒスタグ標識ヒトカスパーゼ4を発現しているイー.コリ細胞を溶解した場合、カスパーゼ4の活性は、溶解物上清中にて検出することができる。タンパク質を上清からNiNTAアガロースビーズ上に捕獲した場合、p10およびp20の両方が回収される。これは、カスパーゼ4プロテアーゼドメインが、細胞培養の間に、p10とp20の連結部分での自己切断により活性化され、溶解性の非共有ヘテロダイマーとして残っていることを示す。この情報を用いて、ヘキサヒスタグ標識p20/p10ヘテロダイマーを精製することができる。全プロセスは、分子のあらゆる更なる崩壊を回避するために、4℃にて行う。

30

【0037】

約400 gの湿ったイー.コリ細胞ペレットを、25 mMのHEPES、0.1%のCHAPS、500 mMのNaCl、pH 7.4の10 mMのベータメルカプトエタノール(BME)、および10%のグリセロール(バッファーA)を含む1.6 Lの溶解バッファーに懸濁し、次いでマイクロフルーイディックスを12,000 psiにて通す2回のパスにより溶解した。溶解物を30,000×gで1時間遠心分離し、次いで1.7 Lの溶解上清を回収した。5 mMのイミダゾールを含む溶解バッファーで前平衡した150 mlのNiNTAアガロースを溶解上清に添加し、懸濁液をpH 8.0へと2 NのNaOHで調整し、次いでカスパーゼ4を1時間バッチ式吸着した。NiNTAアガロースをカラムにつめ、バッファーA中5 mMおよび25 mMのイミダゾールで続けて洗浄して不純物を除去し、次いでカスパーゼ5を、バッファーA中300 mMのイミダゾールで溶離した。タンパク質をバッファーB(25 mMのHEPES、0.1%のCHAPS、10%のグリセロール、10 mMのBME、pH 8.0)に対して透析し、次いで同じバッファーで前平衡したDEAE ToyoPearl 650 Mカラムにのせた。カスパーゼ4を同じバッファー中100 mMのNaClを含むカラムから溶離した。蛍光ペプチド基質、LEED-AMCを用いてカスパーゼ4の最高の特異活性を示しているフラクションをプールした。

40

50

【0038】

実施例5ーポリペプチドのインビトロでの活性化および精製

実施例2記載のごとく精製したプロ-IL-18をカスパーゼ4と共に1:500w/w比で3時間室温にてインキュベートした。プロドメインの切断反応は、SDS-PAGE分析により>90%で完了した。反応混合液に、バッファーD中140mlのNINTAアガロースを添加し、1時間インキュベートし、焼結ガラス漏斗に注ぎ、主として成熟IL-18を含む非結合物質を回収した。少量の残るプロ-IL-18、プロドメイン、カスパーゼ4、および他の不純物がNINTAアガロースに結合した。非結合溶液を25mMのDTTへ調整し、1時間インキュベートして還元反応を完了させ、溶液のpHを2Mのリン酸を添加することにより6.0へと調整し、次いでYM10膜を用いて86mlへと濃縮した。濃縮したサンプルを0.1MのNaClを含む10mMのNaPhosphate pH6.0で平衡化したSuperdex75カラムにのせた。プールしたフラクションは、560mgの成熟IL-18を含んだ。

10

【0039】

実施例6ーポリペプチドのインビボでの活性化および調製

IL-18の活性化は、ヒトIL-18前駆体およびカスパーゼ-4の同時発現によりインビボで達成することもできる。プロ-IL-18は、発現プラスミド、pET28-プロ-IL-18/Casp4内のヒトカスパーゼ-4と共に単一の転写物から、イー.コリ中でニシストロンの共発現される。ヒトのプロ-IL-18遺伝子は、T7プロモーターのコントロール下、プロ-IL-18配列からの最適の翻訳開始のための有効なShine-Dalgarno配列を含んでいるpET28a(Novagen)にサブクロニングした(図8)。カスパーゼ4遺伝子(Ile146からAsn418)は、カスパーゼ4配列からの最小限の翻訳の開始を可能とする不完全なShine-Dalgarno配列を含んでいるプロ-IL-18配列直後にサブクロニングした。T7終結配列を、ニシストロンの転写ユニットの後に翻訳終結のために含めた。生じた構築物を次いで、T7ポリメラーゼ遺伝子の誘導性染色体コピーを含むBL21(DE3)宿主へトランスフェクトした。この宿主中での、1mMのIPTGを用いたこの構築物の誘導により、プロ-IL-18およびプロカスパーゼ4が協調転写および協調翻訳された。発生期に翻訳されたプロ-カスパーゼ4は、プロ-IL-18のタンパク質分解の活性化を起こす活性体に自己プロセスされる。図8は、1mMのIPTGによる誘導後の、18時間に渡るIL-18の活性化のタイムコースを示す(0-18時間)。

20

30

【0040】

実施例7ーカスパーゼ4のインビボでの活性化

カスパーゼ4のインビボでの活性化は、Munday, N.A., et al, 1995, J. Biol. Chemistry, 270,15870-15876に開示されている。Ala59に始まる、プロ領域を欠いているカスパーゼ-4の切断形態のイー.コリ中での発現により、活性酵素ヘテロダイマーへと会合するP10およびP20サブユニットへの切断による自己活性化が導かれる。カスパーゼ4の活性化の遅延は、切断およびプロ-IL-18の成熟IL-18への活性化の遅延と言い換えられる(図9)。これより、細胞中で安定性の低い成熟IL-18へそれが切断されるより前に、より安定なプロ-IL-18が蓄積される。

40

【0041】

実施例8ーカスパーゼ4と共発現したヒトIL-18の精製

実施例6記載のごとくIL-18を発現しているイー.コリ細胞66gを、1mMのEDTAおよび10MのDTTを含む130mlの0.1MのHEPES pH7.5中に懸濁し(全プロセスは、遊離SHを保護するための最終段階以外は、4℃にて10mMのDDTの存在下に行った。)、マイクロフルーイディックスを12,000psiにて通す2回のパスにより溶解した。溶解物(230ml)を34,000×gにて30分間遠心分離した。上清(200ml)を1Lへと、25mMのHEPES pH7.0を用いて希釈した後、タンデムに2つのカラム、ToyoPearl SP 650MおよびToyoPearl DEAE 650Mに流した。イー.コリ細胞から誘導した不純物の多くがカラムに

50

結合した。流出した物質をpH9.5へと、25mMのビストリスプロパンを用いて調整し、2Lへと希釈し、次いで25mMのビストリスプロパンHCl pH9.5で平衡化したSource 15Qカラムにのせた。カラムを同じバッファー中1~0.5MのNaClの線形勾配を用いて溶離した。IL-18を含んでいるフラクションを、Vydac C4 RP-HPLCを用いて同定し、次いでプールした(250ml)。プールをYM10膜を用いて50mlへと濃縮し、1mMのEDTAおよび0.15MのNaClを含む(インビボ使用のためにはDTTは含まず)10mMのNaPO₄、pH6.0で前平衡したSuperdex 75カラムにのせた。

【0042】

実施例9ー切断カスパーゼ5の調製

10

ヒト切断カスパーゼ5も、イー.コリ中で、N-末端ヘキサ-ヒスチジンタグ標識融合物として発現させた。発現プラスミド、pET16b-切断カスパーゼ5を、ファージT7プロモーターを含んでいるベクターpET16b(Novagen)から誘導した。組換えベクターは、N末端にヘキサ-ヒスチジンコーディング配列を組み込み、かつNcoIおよびXhoI制限エンドヌクレアーゼ部位をテイリングしている切断カスパーゼ5活性ドメイン(アミノ酸Ile146からAsn418)のPCR増幅により構築した。生じたPCR産物を次いで、これら2つの制限部位の間にサブクローニングし、N-末端ヘキサ-ヒスチジン-切断カスパーゼ5融合ベクターを作成した。

【0043】

合成プラスミドを、1mMのIPTGでの誘導後に切断カスパーゼ5の誘導性の発現を可能とするlacUV5プロモーターコントロール下にT7RNAポリメラーゼの染色体コピーを含んでいる溶原性のBL21DE3イー.コリ株に形質転換した。活性タンパク質を、37℃にて3時間誘導した後に単離した細胞ペレットから精製した。

20

【0044】

実施例10ーカスパーゼ5の精製

実施例9に記載のN末端ヘキサ-Hisタグ標識ヒト切断カスパーゼ5を発現しているイー.コリ細胞を溶解した場合、切断されたカスパーゼ5の活性は、溶解上清中で検出することができる。タンパク質をNiNTAアガロースビーズ上に捕獲する場合、p10およびp20の両方が回収される。これは、切断されたカスパーゼ5プロテアーゼドメインが、p10およびp20の接合部分で自己切断により細胞培養の間に活性化され、溶解性の非共有ヘテロダイマーとして残っていることを示す。この情報を用いて、ヘキサ-Hisタグ標識p20/p10ヘテロダイマーを精製することができる。全プロセスは、分子のあらゆるさらなる崩壊を回避するために4℃で行う。

30

【0045】

およそ400gの湿ったイー.コリ細胞ペレットを、25mMのHEPES、0.1%のCHAPS、500mMのNaCl、pH7.4の10mMのベータメルカプトエタノール(BME)、および10%のグリセロール(バッファーA)を含む1.6Lの溶解バッファー中に懸濁し、マイクロフルーイディックスを12,000psiにて通す2回のパスにより溶解した。溶解物を30,000×gで1時間遠心分離し、次いで溶解上清1.7Lを回収した。5mMのイミダゾールを含む溶解バッファーで前平衡した150mlのNiNTAアガロースを溶解上清に添加し、懸濁液を2NのNaOHでpH8.0へと調整し、次いでカスパーゼ5を1時間バッチ式吸収した。NiNTAアガロースをカラムにつめ、バッファーA中5mMおよび25mMのイミダゾールで続けて洗浄して不純物を除き、次いでカスパーゼ5をバッファーA中300mMのイミダゾールで溶離した。タンパク質をバッファーB(25mMのHEPES、0.1%のCHAPS、10%のグリセロール、10mMのBME、pH8.0)に対して透析し、次いで同じバッファーで前平衡したDEAE Toyopearl 650Mカラムにのせた。切断されたカスパーゼ5を同じバッファー中100mMのNaClを用いてカラムから溶離した。蛍光ペプチド基質LEED-AMCを用いて切断カスパーゼ5の最高の特異活性を示しているフラクションをプールした。

40

【0046】

50

実施例 11 - ポリペプチドのインビボでの活性化および調製

実施例 1 および 2 記載のごとく調製および精製したプロ-IL-18 を、切断されたカスパーゼ 5 と 1 : 500 w/w 比で 3 時間室温にてインキュベートした。プロドメインの切断反応は、SDS-PAGE 分析により > 90 % にて完了した。反応混合物に、バッファード中 140 ml の NiNTA アガロースを添加し、1 時間インキュベートし、次いで焼結ガラス漏斗に注ぎ、主として成熟 IL-18 を含む非結合物質を回収した。残っている少量のプロ-IL-18、プロドメイン、切断カスパーゼ 5、および他の不純物が NiNTA アガロースに結合した。非結合溶液を 25 mM の DTT に対して調整し、1 時間インキュベートして還元反応を完了させ、2 M のリン酸を添加することにより溶液の pH を 6.0 へと調整し、YM10 膜を用いて 86 ml へと濃縮した。濃縮したサンプルを、0.1 M の NaCl を含む 10 mM の NaPhosphate pH 6.0 で平衡化した Superdex 75 カラムにのせた。プールしたフラクションは、560 mg の成熟 IL-18 を含んだ。

【0047】

実施例 12 - ポリペプチドのインビボでの活性化および調製

IL-18 の活性化は、ヒトの IL-18 前駆体および切断カスパーゼ 5 の同時発現によりインビボで活性化することもできる。プロ-IL-18 が、発現プラスミド、pET28-プロIL18/Casp5 内のヒト切断カスパーゼ 5 と共に単一の転写産物からイー.コリ中でニシストロ的に共発現した(図 9)。ヒトのプロ-IL-18 遺伝子を、T7 プロモーターのコントロール下にプロ-IL-18 配列からの最適の翻訳の開始のための有効な Shine-Dalgarno 配列を含んでいる pET28a (Novagen) にサブクローニングした(図 10)。切断カスパーゼ 5 遺伝子 (Ile146~Asn418) を、不完全な Shine-Dalgarno 配列を含んでいるプロ-IL-18 配列直後にサブクローニングし、切断カスパーゼ 5 配列から最小限の翻訳開始を可能とした。T7 終結配列を、ニシストロ的な転写ユニットの後に、翻訳の終結のために含めた。生じた構築物を、T7 ポリメラーゼ遺伝子の誘導性染色体コピーを含む BL21(DE3) 宿主に次いでトランスフェクトした。この構築物のこの宿主中での 1 mM の IPTG を用いた誘導により、プロ-IL-18 およびプロ-カスパーゼ 5 が協調転写および協調翻訳された。発生期に翻訳されたプロ-カスパーゼ 5 は、プロ-IL-18 のタンパク質分解活性を開始する活性種に自己プロセスする。

【0048】

実施例 13 - 切断カスパーゼ 5 と共発現したヒト IL-18 の精製

実施例 12 記載のごとく IL-18 を発現しているイー.コリ細胞 66 g を、1 mM の EDTA および 10 mM の DTT を含む 130 ml の 0.1 M HEPES pH 7.5 に懸濁し(全プロセスは、遊離 SH を保護するための最終段階以外は、4 °C にて 10 mM の DTT の存在下で行った。)、次いでマイクロフルーイディックスを 12,000 psi にて通す 2 回のパスにより溶解した。溶解物(230 ml)を 34,000 × g にて 30 分間遠心分離した。上清(200 ml)を、25 mM の HEPES pH 7.0 を用いて 1 L へと希釈し、次いで Toyo Pearl SP650M および Toyo Pearl DEAE650M の 2 つのカラムにタンデムに流した。イー.コリ細胞由来の不純物の多くがカラムに結合した。流出した物質を 25 mM のピストリスプロパンを用いて pH 9.5 へと調整し、2 L へと希釈し、次いで 25 mM のピストリスプロパン HCl pH 9.5 にて平衡化した Source 15Q カラムにのせた。カラムを同じバッファード中 0 ~ 0.5 M の NaCl の線形勾配を用いて溶離した。IL-18 を含むフラクションを、Vydac C4 RP- HPLC を用いて同定し、次いでプールした(250 ml)。プールを YM10 膜を用いて 50 ml に濃縮し、1 mM の EDTA および 0.15 M の NaCl を含む(インビボ使用のためには DTT を含まない) 10 mM の NaPO₄ にて前平衡した Superdex 75 カラムにのせた。

【0049】

実施例 14 - ユビキチン/プロ-IL-18/Ubp1 の調製

76アミノ酸のユビキチンコーディング配列を、成熟IL-18の最初のチロシンコドンがユビキチンのグリシン76コドンの直後にくるように、プラントエンドライゲーションにより、成熟ヒトIL-18のスタートコドンとインフレーション融合させた。遺伝子融合物を次いで、T7プロモーターのコントロール下にユビキチン-IL-18遺伝子配列からの最適の翻訳開始のための有効なShine-Dalgarno配列を含んでいるpETベクター中にサブクローニングした。全長のUbp-1遺伝子を、Ubp-1の最小限の翻訳のための不完全なShine-Dalgarno配列を含んでいるIL-18の直後に次いでサブクローニングした。図11は、pET28内のUbp-1/IL-18/Ubp-1発現カセットの配列を示す。図13は、pET28内のUbp-1/IL-18/Ubp-1の注釈をつけた配列を示す。番号はpET28内の位置に対応する。

10

【0050】

実施例15-IL-18のインビボでの活性化および調製

実施例14の構築物を次いでBL21(DE3)宿主にトランスフェクトした。1mMのIPTGを用いた誘導により、ユビキチン-IL-18とUbp-1が協調転写および協調翻訳された。Ubp-1の酵素活性により、Ubp-IL-18は、次いで常套法によりイー.コリ溶解物から直接精製することができる成熟活性IL-18へと効率よくプロセッシングされる。図16はIL-18の発現、および1mMのIPTGで誘導後の30℃および37℃でのIL-18の発現およびプロセッシングのタイムコースを示す。上の矢印はレーン1におけるプロセッシングされていないUB-IL-18の部分を示す。下の矢印は、レーン3におけるプロセッシングされたIL-18の部分を示す。(抗-IL-18抗血清を用いるウェスタンブロット検出)。

20

【0051】

実施例16-ユビキチンと共発現されたヒトIL-18の精製

実施例15記載のごとくIL-18を発現しているイー.コリ細胞66gを、1mMのEDTAおよび10mMのDTTを含む130mlの0.1M HEPES pH7.5中に懸濁し(全プロセスは、遊離のSHを保護する最終段階以外は、4℃にて、および10mMのDTTの存在下で行った)、次いでマイクロフルーイディックスを12,000psiにて通す2回のパスにより溶解した。溶解物(230ml)を34,000×gにて30分間遠心分離した。上清(200ml)を25mMのHEPES pH7.0を用いて1Lへと希釈し、次いでToyoPearl SP 650MおよびToyoPearlの2つのカラムにタンデムに流した。イー.コリ細胞由来の不純物の多くがカラムに結合した。流通物質を、25mMのピストリスプロパン pH9.5を用いて平衡化したSource15Qカラムにのせた。カラムを同じバッファー中0~0.5のNaClの線形勾配で溶離した。IL-18を含んでいるフラクションを、Vydac C4 RP-HPLCを用いて同定し、次いでプールした(250ml)。プールをYM10膜を用いて50mlへと濃縮し、1mMのEDTAおよび0.15MのNaClを含む10mMのNaPO₄ pH6.0(インビボ使用のためにはDTTは含まない)で前平衡した。

30

【0052】

現在発明の好ましい具体例であると考えられているものを記載したが、種々の変更をなしよく、および本発明の精神および範囲内にある全てのそのような変更を添付の請求の範囲内に含むことを意図していることが理解されよう。

40

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、ヒトIL-18前駆体のアミノ酸配列を示す(配列番号1)。

【図2】 図2は、全長のヒトIL-18をコードしている核酸配列を示す(配列番号2)。

【図3】 図3は、活性ヒトIL-18のアミノ酸配列を示す(配列番号3)。

【図4】 図4は、6-hisタグ付N末端切断カスパーゼ4のアミノ酸配列を示す(配列番号4)。

【図5】 図5は、6-hisタグ付N末端切断カスパーゼ4のアミノ酸配列をコードしている核酸配列を示す(配列番号5)。

50

【図6】 図6は、6-hisタグ付N末端切断カスパーゼ5のアミノ酸配列を示す（配列番号6）。

【図7】 図7は、6-hisタグ付N末端切断カスパーゼ5のアミノ酸配列をコードしている核酸配列を示す（配列番号7）。

【図8】 図8は、プロ-IL-18および切断カスパーゼ4のイー.コリ.中での共発現のためのpET28-プロIL-18/Casp4内に含まれるニシストロンの発現カセットの概略図である。

【図9】 図9は、pET28内のプロIL-18/カスパーゼ4発現カセットの配列を示す（配列番号8）。

【図10】 図10は、プロIL-18/カスパーゼ4発現カセットの注釈を付した配列を示す。番号は、pET28aベクター内での位置に対応する。

10

【図11】 図11は、プロIL-18/カスパーゼ4の誘導を示す。

【図12】 図12は、イー.コリ.中でのプロ-IL18とカスパーゼ5の共発現のためのpET28-プロ-IL18/切断カスパーゼ5内に含まれるニシストロンの発現カセットの概略図である。

【図13】 図13は、pET28内のプロ-IL18/カスパーゼ5発現カセットの配列を示す（配列番号9）。

【図14】 図14は、調節配列の特徴およびプロ-IL-18および切断カスパーゼ-5の翻訳を示している、プロ-IL-18/切断カスパーゼ-5発現カセットの注釈を付した配列図を示す。番号は、pET28aベクター内での位置に対応する。

20

【図15】 図15は、プロ-IL-18/カスパーゼ5の誘導を示す。

【図16】 図16は、Ub-IL-18のアミノ酸配列を示す（配列番号10）。

【図17】 図17は、Ub-IL-18のアミノ酸配列をコードしている核酸配列を示す（配列番号11）。

【図18】 図18は、pET28ベクター内のUb-IL-18/Ubp-1発現カセットの核酸配列を示す（配列番号12）。

【図19】 図19は、pET28ベクター内のUb-IL-18/Ubp-1の注釈を付した配列を示す。番号はpET28内の位置に対応する。

【図20】 図20は、Ub-IL-18の発現およびUbp-1によるプロセッシングを示す。

30

【図21】 図21は、KG-1（ヒト骨髓単核細胞系統）細胞を用いた、IFN-γの産生を測定するためのIL-18活性のアッセイを示す（IL-18は表記のごとく、種々の方法で発現させた）。

【図22】 図22は、精製ヒトPBMCを用いた、IFN-γの産生を測定するためのIL-18活性のアッセイを示す（IL-18は表記のごとく、種々の方法で発現させた）。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION

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

<130> P51137

<140> TO BE ASSIGNED

10

<141> Herewith

<150> 60/211,832

<151> 2000-06-15

<150> 60/224,128

<151> 2000-08-10

<150> 60/264,923

<151> 2001-01-30

20

<160> 12

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 193

<212> PRT

<213> Homo sapien

<400> 1

Met Ala Ala Glu Pro Val Glu Asp Asn Cys Ile Asn Phe Val Ala Met
 1 5 10 15
 Lys Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ile Ala Glu Asp Asp Glu Asn
 20 25 30
 Leu Glu Ser Asp Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile
 35 40 45
 Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro
 50 55 60
 Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg
 65 70 75 80

30

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

10

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

20

<400> 2
 atggctgctg aaccagtaga agacaattgc atcaactttg tggcaatgaa atttattgac 60
 aatacgcttt actttatagc tgaagatgat gaaaacctgg aatcagatta ctttggaag 120
 cttgagagca aactatcggt cattcgtaat ttaaatgacc aggtcctatt tatcgaccaa 180
 gggaaatgct cactattcga ggacatgaca gacagtgact gccgagacaa tgcgcgcgca 240
 accattttca ttatatctat gtacaaggat totcagcgcg gcggaatggc cgtaactatt 300
 tctgtcaaat gtgaaaagat atccacgctg tcgtgtgaga acaagattat tagtttcaaa 360
 gagatgaatc ogccggataa tatcaaggac acgaagtctg atatcatatt ttccagcgc 420
 agcgtgccgg ggcacgataa caagatgcaa tttgaatcat ccagctatga agggtaacttt 480
 cttgcatgcg agaaggaacg cgatctcttt aaacttattt taaagaaaga ggacgagcta 540
 ggcgatcgca gcattatggt cactgtccaa aatgaagact ag 582

30

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

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

20 25 30
 Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile
 35 40 45
 Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile
 50 55 60
 Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile
 65 70 75 80
 Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys
 85 90 95
 Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys
 100 105 110
 Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu
 130 135 140
 Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp
 145 150 155

<210> 4

<211> 282

<212> PRT

<213> Homo sapien

10

<400> 4

Met Gly His His His His His His Gly Ala Leu Lys Leu Cys Pro His
 1 5 10 15
 Glu Glu Phe Leu Arg Leu Cys Lys Glu Arg Ala Glu Glu Ile Tyr Pro
 20 25 30
 Ile Lys Glu Arg Asn Asn Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ile Ile Cys Asn
 35 40 45
 Thr Glu Phe Asp His Leu Pro Pro Arg Asn Gly Ala Asp Phe Asp Ile
 50 55 60
 Thr Gly Met Lys Glu Leu Leu Glu Gly Leu Asp Tyr Ser Val Asp Val
 65 70 75 80
 Glu Glu Asn Leu Thr Ala Arg Asp Met Glu Ser Ala Leu Arg Ala Phe
 85 90 95
 Ala Thr Arg Pro Glu His Lys Ser Ser Asp Ser Thr Phe Leu Val Leu
 100 105 110
 Met Ser His Gly Ile Leu Glu Gly Ile Cys Gly Thr Val His Asp Glu
 115 120 125
 Lys Lys Pro Asp Val Leu Leu Tyr Asp Thr Ile Phe Gln Ile Phe Asn
 130 135 140
 Asn Arg Asn Cys Leu Ser Leu Lys Asp Lys Pro Lys Val Ile Ile Val

20

30

10

20

30

<210>	6
<211>	282
<212>	PRT

<213> Homo sapien

<400> 6

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

<210> 7

<211> 849

<212> DNA

10

20

30

<213> Homo sapien

<400> 7

```

atgggocato atcatcatca tcatggcata ctcaaacttt gtctctcgtga agaattcctg      60
agactgtgta aaaaaaatca tgatgagatc tatccaataa aaaagagaga ggaccgcaga      120
cgcttggtct tcatcatatg caatacaaaag tttgatcacc tgccctgcaag gaatggggct      180
cactatgaca tcgtggggat gaaaaggctg cttcaaggcc tgggctacac tgtgggtgac      240
gaaaagaatc tcacagccag ggatatggag tcagtgtgta gggcatttgc tgccagacca      300
gagcacaagt cctctgacag cacgttcttg gtactcatgt ctcattggcat cctagaggga      360
atctgoggaa ctgcgcataa aaagaaaaaa ccggatgtgc tgctttatga caccatcttc      420
cagatattca acaaccgcaa ctgcctcagt ctaaaggaca aaccaaggt catcattgtc      480
caggcctgca gaggtgaaaa acatggggaa ctctgggtca gagactctcc agcatccttg      540
gcagtcatct cttcacagtc atctgagaac ctggaggcag attctgtttg caagatccac      600
gaggagaagg acttcattgc tttctgttct tcaacaccac ataactgtgc ctggagagac      660
cgcacaaagg gctccatctt cattacggaa ctcatcacat gcttccagaa atattcttgc      720
tgtgtccacc taatggaaat atttcggaag gtacagaaat catttgaagt tccacaggct      780
aaagcccaga tgcccaccaa agaacgagca accttgacaa gagatttcta cctctttcct      840
ggcaattga

```

10

<210> 8

<211> 1743

<212> DNA

<213> Homo sapien

20

<400> 8

```

agatctcgat cccgcgaaat taatacgact cactataggg gaattgtgag cggataacaa      60
ttcccctcta gaccacacct taaggaggat ataacatag gctgctgaac cagtagaaga      120
caattgcato aactttgttg caatgaaatt tattgacaat acgctttact ttatagctga      180
agatgatgaa aacctggaat cagattactt tggcaagctt gagagcaaac tatcggtcat      240
togtaattta aatgaccagg tcctatttat cgaccaaggg aatcgtccac tattcgagga      300
catgacagac agtgactgcc gagacaatgc gccgcgaacc attttcatta tatctatgta      360
caaggattct cagccgcgcg gaatggccgt aactatttct gtcaaatgtg aaaagatata      420
cacgctgtcg tgtgagaaca agattattag tttcaaagag atgaatccgc cggataatat      480
caaggacacg aagtctgata tcataatttt ccagcgcagc gtgcgggggc acgataacaa      540
gatgcaattt gaatcatoca gctatgaagg gtactttctt gcatgcgaga aggaacgcga      600
tctcttttaa cttattttta agaaagagga cgagctaggc gatcgcagca ttatgttcac      660
tgtccaaaat gaagactagt ggaggatata ataccaggaa taaataaaat ccatgggcca      720
tcatcatcat catcatggcg ccctcaagct ttgtctcat gaagaattcc tgagactatg      780
taaagaaaga gctgaagaga totatccaat aaaggagaga aacaaccgca cagccctggc      840
tctcatcata tgcaatacag agtttgacca tctgcctccg aggaatggag ctgactttga      900
catcacaggy atgaaggagc tacttgaggg tctggactat agtgtagatg tagaagagaa      960
tctgacagcc agggatatgg agtcagcgtc gagggcattt gctaccagac cagagacaaa      1020
gtcctctgac agcacattct tgggtactcat gtctcatggc atcctggagg gaatctgcgg      1080

```

30

```

aactgtgcat gatgagaaaa aaccagatgt gctgctttat gacaccatct tccagatatt 1140
caacaaccgc aactgcctca gtctgaagga caaaccgaag gtcacattg tccaggcctg 1200
cagaggtgca aaccgtggg aactgtgggt cagagactct ccagcatcct tggagtggtg 1260
ctcttcacag tcatctgaga acctggagga agatgctgtt tacaagaccc acgtggagaa 1320
ggacttcatt gctttctgct cttcaacgco acacaacgtg tcctggagag acagcacaat 1380
gggctctatc ttcacacac aactcatcac atgcttcag aaatattott ggtgctgcca 1440
cctagaggaa gtatttcgga aggtacagca atcatttgaa actccaaggg ccaaagctca 1500
aatgccacc atagaacgac tgtccatgac aagatatttc tacctctttc ctggcaattg 1560
aaaatggatc cgaattcgag ctccgtcgac aagcttgagg ccgcactcga gcaccaccac 1620
caccaccact gagatccggc tgctaacaaa gcccgaaagg aagctgagtt ggctgctgcc 1680
accgctgagc aataactagc ataaccctt ggggcctcta aacgggtott gaggggtttt 1740
ttg 1743

```

10

<210> 9

<211> 1464

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 9

```

atggctgctg aaccagtaga agacaattgc atcaactttg tggcaatgaa atttattgac 60
aatacgcttt actttatagc tgaagatgat gaaaacctgg aatcagatta ctttggaag 120
cttgagagca aactatcggc cttcgtaat ttaaatgacc aggtcctatt tatcgaccaa 180
gggaatcgtc cactattcga ggacatgaca gacagtgact gccgagacaa tgcgccgcga 240
accattttca ttatatctat gtacaaggat tctcagccgc gcggaatggc cgtaactatt 300
tctgtcaaat gtgaaaagat atccacgctg tctgttgaga acaagattat tagtttcaa 360
gagatgaatc cgcgcgataa tatcaaggac acgaagtctg atatcatatt ttccagcgc 420
agcgtgccgg ggacagataa caagatgcaa tttgaatcat ccagctatga agggtaactt 480
cttgcatgct agaaggaacg cgtctctttt aaacttattt taaagaaaga ggacgagcta 540
gggatcgca gcattatgtt cactgtccaa aatgaagact agtggaggat ataataccag 600
gaataaataa aatccatggg ccacatcat catcatcatg gcatactcaa actttgtcct 660
cgtgaagaat tcctgagact gtgtaaaaaa aatcatgatg agatctatcc aataaaaaag 720
agagaggacc gcagacgcct ggctctcatc atatgcaata caaagtittg tcacctgct 780
gcaagggaatg gggctcacta tgacatcgtg gggatgaaaa ggctgcttca aggcctgggc 840
taactgtgg ttgaagaaaa gaatctcaca gccagggata tggagtcagt gctgagggca 900
tttgtgccca gaccagagca caagtcctct gacagcacgt tcttggtact catgtctcat 960
ggcatcctag agggaaatctg cggaaactgcg cataaaaaaga aaaaaccgga tgtgctgctt 1020
tatgacacca tcttcagat attcaacaac cgcaactgcc tcagtctaaa ggacaaaccc 1080
aaggtcatca ttgtccaggc ctgcagaggt gaaaaacatg gggaactctg ggtcagagac 1140
tctccagcat ccttggcagt catctcttca cagtcatctg agaacctgga ggcagattct 1200
gtttgcaaga tccacgagga gaaggacttc attgctttct gttcttcaac accacataac 1260
gtgtcctgga gagaccgcac aaggggctcc atcttcatta cggaaotcat cacatgcttc 1320
cagaaatatt cttgctgctg ccacctaattg gaaatatttc ggaaggtaca gaaatcattt 1380
gaagttccac aggtctaaagc ccagatgcc accatagaac gagcaacctt gacaagagat 1440

```

20

30

ttctacctct ttcctggcaa ttga

1464

<210> 10

<211> 233

<212> PRT

<213> Homo sapien

<400> 10

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

10

20

30

<210> 11

<211> 702

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 11

atgcagatct	tctcaagac	gttaaccggt	aaaaccataa	ctctagaagt	tgaatcttcc	60
gataccatcg	acaacgttaa	gtcgaaaatt	caagacaagg	aaggcattcc	acctgatcaa	120
caaagattga	tctttgcggg	taagcagctc	gaagacggta	gaacgctgtc	tgattacaac	180
attcagaagg	agtcgacctt	acatcttgct	ttaagactaa	gaggagggtg	ctttggcaag	240
cttgagagca	aactatcggt	cattcgtaat	ttaaatgacc	aggctctatt	tatcgaccaa	300
gggaatcgtc	cactattoga	ggacatgaca	gacagtgaat	gcccagacaa	tgcgccgcga	360
accattttca	ttatatctat	gtacaaggat	tctcagccgc	gcggaatggc	cgtaactatt	420
tctgtcaaat	gtgaaaagat	atccacgctg	tctgttgaga	acaagattat	tagtttcaaa	480
gagatgaatc	cgcgcgataa	tatcaaggac	acgaagtctg	atatcatatt	tttccagcgc	540
agcgtgcogg	ggcacgataa	caagatgcaa	tttgaatcat	ccagctatga	aggggtacttt	600
cttgcacgtc	agaaggaacg	cgatctcttt	aaacttattt	taaagaaaga	ggacgagcta	660
ggcgatcgca	gcattatggt	cactgtccaa	aatgaagact	ag		702

10

<210> 12

<211> 3419

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 12

agatctcgat	ccgcgaaaat	taatacgact	cactataggg	gaattgtgag	cggataacaa	60
ttccctctta	gaccacacct	taaggaggat	ataacatctg	cagatcttct	tcaagacgtt	120
aaccggtaaa	accataactc	tagaagttga	atcttccgat	accatcgaca	acgttaagtc	180
gaaaattcaa	gacaaggaag	gcattccacc	tgatcaacaa	agattgatct	ttgccggtaa	240
gcagctcgag	gaaggtagaa	cgctgtctga	ttacaacatt	cagaaggagt	cgaccttaca	300
tcttgtctta	agactaagag	gaggggtactt	tggcaagctt	gagagcaaac	tatcggtcat	360
tctgaattta	aatgaccagg	tcctatttat	cgaccaaggg	aatcgccac	tattcgagga	420
catgacagac	agtgaatgcc	gagacaatgc	gcccgcgaac	atcttcatta	tatctatgta	480
caaggattct	cagccgcgcg	gaatggcgtg	aactatttct	gtcaaatgtg	aaaagatata	540
cacgctgtcg	tgtgagaaca	agattattag	tttcaaagag	atgaatccgc	cggataatat	600
caaggacacg	aagtctgata	tcatattttt	ccagcgcagc	gtgccggggc	acgataacaa	660
gatgcaattt	gaatcatcca	gctatgaagg	gtactttctt	gcatgcgaga	aggaacgcga	720
tctcttttaa	cttattttta	agaaagagga	cgagctaggg	gatcgagaca	ttatgttcac	780
tgtccaaaat	gaagactagt	ggaggatata	ataccaggaa	taaataaaat	ccatgggcca	840
tcatcatcat	catcatggca	tggatgaaag	caagataaac	agttttattac	aattttttatt	900
tggttccoga	caggattttt	tgagaaattt	taaaacttgg	agtaacaaca	ataacaatct	960
atcgatttat	ttattaattt	ttggcatagt	agtatttttt	tataaaaaac	cagacctctt	1020
aaactacatt	gttgagagcg	ttagtgaaat	gacaacaaac	ttcagaaata	ataatagcct	1080
tagccgttgg	ttgccagaa	gtaagtttac	ccacttagac	gaagagatct	tgsaaagagg	1140
tggtttcoatt	gctggtttag	ttaatgatgg	taacacttgt	tttatgaact	ctgttttgca	1200
atcattggca	tcatccagag	aattaatgga	gttcttggac	aataatgtca	taaggacctt	1260
tgaggagata	gaacaaaatg	aacacaatga	agaaggaaac	gggcaagaat	ctgctcaaga	1320

20

30

tgaagccact	cataagaaaa	acactcgtaa	gggtggcaaa	gtttatggta	agcataagaa	1380
gaaattgaat	aggaagtcaa	gttcgaaaga	agacgaagaa	aagagccagg	agccagatat	1440
cactttcagt	gtcgccttaa	gggatctact	ttctgcctta	aatgcgaagt	attatcggga	1500
taaaccctat	ttcaaaacca	atagtttatt	gaaagcaatg	tccaaatctc	caagaaaaaa	1560
tattcttctt	ggctacgacc	aagaggacgc	gcaagaattc	ttccagaaca	tactagccga	1620
gttggaaagt	aacgttaaat	cattgaatac	tgaaaaacta	gataccactc	cagttgcgaa	1680
atcagaatta	ccgatgatg	ctttagtagg	tcaacttaac	cttgggtgaag	ttggcactgt	1740
ttacattcca	actgaacaga	ttgatcctaa	ctctatacta	catgacaagt	ccattcaaaa	1800
tttcacacct	ttcaaaactaa	tgactccttt	agatgggtatc	acggcagaaa	gaattgggtg	1860
tttacagtg	gggtgagaacg	gtggcataag	atattccgta	ttttcgggat	taagcttaaa	1920
tttacccaac	gagaatattg	gttccacttt	aaaatttatct	cagttattga	gcgactggag	1980
taaacctgaa	atcatogaag	togtagaatg	taaccgttgt	gccctcacag	cagcgccactc	2040
tcattttatt	ggtcagttga	aagaatttga	aaaaaaacct	gagggttcga	tcccagaaaa	2100
gccaatatac	gctgtaaaag	ataggttcca	tcaaatcgaa	gaagttcttg	ccaaaccagt	2160
tattgacgat	gaagattata	agaagttgca	tacagcaaat	atggtacgta	aatgctctaa	2220
atciaagcag	attttaatat	caagacctcc	accattatta	tccattcata	tcaacagatc	2280
cgtatttgat	ccaagaacgt	acatgattag	aaaaaataac	tcgaaagtat	tgtttaagtc	2340
aacgttgaat	cttgcctctt	ggtgttgtga	tattaatgaa	atcaatttgg	atgctcgttt	2400
gccaatgtca	aaaaaggaaa	aagctgcgca	acaagattca	agtgaagatg	aaaacatttg	2460
cgttgaatac	tatacgaaat	tacatgaacg	cttcgagcag	gaatttgaag	acagcgagga	2520
agaaaaagaa	tacgatgacg	cagaggggaa	ctatgcgtct	cattacaatc	ataccaagga	2580
tatcagtaac	tatgatcccc	taaacggtga	agtogatggc	gtgacatccg	atgatgaaga	2640
tgagtacatt	gaagaaaccg	atgctttagg	gaatacaatc	aaaaaaagga	tcatagaaca	2700
ttctgatgtt	gaaaacgaga	atgtasaaga	taattgaagaa	ctgcaagaaa	tcgacaatgt	2760
gagccttgac	gaaccaaaaga	tcaatgttga	agatcaacta	gaaacatcat	ctgatgagga	2820
agatgttata	ccagctccac	ctatcaatta	tgctaggtca	ttttccacag	ttccagccac	2880
tccattgaca	tattcattgc	gctctgtcat	tgttcactac	ggtaccata	attatggtca	2940
ttacattgca	tttagaaaaat	acaggggttg	ttggtggaga	atatctgatg	agactgtgta	3000
cgttgtggac	gaagctgaag	tcctttcaac	accoggtgta	tttatgttat	tttacgaata	3060
tgactttgat	gaagaaactg	ggaagatgaa	ggatgatttg	gaagctattc	agagtaataa	3120
tgaagaagat	gatgaaaaag	agcaggagca	aaaaggagtc	caggagccaa	aggaaagcca	3180
agagcaagga	gaaggtgaag	agcaagagga	aggtcaagag	cagatgaagt	tcgagagaac	3240
agaagaccat	agagatat	ctggtaaaga	tgtaaaactaa	gctcgagcac	caccaccacc	3300
accactgaga	tccggctgct	aacaaagccc	gaaagggaagc	tgagttggct	gctgccaccg	3360
ctgagcaata	actagcataa	cccttggggg	cctotaaacg	ggtcttgagg	ggttttttg	3419

10

20

30

【図 1】

FIGURE 1

SEQ ID NO:1
1 MAARPVEDNC INFVAMKFID NTLFYIAREDD RNLESUYFGK LESKLSVIRN
51 LNDQVLVIDQ GNRPLFEDMT DSDCRDNAPR TIFIISMYED SQPRGMVATI
101 SVKCEKISTL SCENKIISPK EMNPPDNIKD TKSDIIFQOR SVFGHDNKMQ
151 FESSSYEGYF LACHEKRDLF KLILKKEDEL GDRSIMPTVQ NED

【図 2】

FIGURE 2

SEQ ID NO:2
1 50
ATGGGCTGCTG AACCAAGTAGA AGACAAATTGC ATCAACTTTG TGGCAATGAA
51 100
ATTTATTGAC AATACGCTTT ACTTTATAGC TGAAGATGAT GAAAACCTGG
101 150
AATCAGATTA CTTTGGCAAG CTTGAGAGCA AACTATCGGT CATTCGTAAAT
151 200
TTAAATGACC AGGTGCTATT TATCGACCAA GGGAAATGTC CACTATTGCA
201 250
GGACATGACA GACAGTGACT GCGAGACAA TGGCGCCGCA ACCATTTTCA
251 300
TTATATCTAT GTACAAGGAT TCTCAGCCGC GCGGAATGCG CGTAACATATT
301 350
TCTGTCAAAAT GTGAAAAGAT ATCCACGCTG TCGTGTGAGA ACAAGATtAT
351 400
tAGTTTCAAA GAGATGAATC CGCCGGATAA TATCAAGGAC ACGAAGTCIG
401 450
ATATCATATT TTTCCAGCGC AGCGTGCCGG GGCACGATAA CAAGATGCAA
451 500
TTTGAATCAT CCAGCTATGA AGGGTACTTT CTTCGATGCG AGAAGGAACG
501 550
CGATCTCTTT AAACCTTATT TAAAGAAAGA GGACGAGCTA GCGCATGCGA
551 582
GCATtATGTT CACTGTCCAA AATGAAGACT AG

【図 3】

FIGURE 3

SEQ ID NO:3
1 YPKLESKLS VIRNLNDQVL FIDQGNPLF EDMTSDCRD NAPRTIFIIS
51 MYKDSQPRGM AVTISVCKEK ISTLSCHENKI ISFKEMNPPD NIKDKSDII
101 FFQRSVPFGHD MNMQFBSSSY EGYFLACRKE RDLFKLILKK EDELGDRSIM

151 FTVQNEE

【図 6】

FIGURE 6

SEQ ID NO:6
1 MGHHEHHHGI LKLCPRREFL RLCKKNHDEI YPIKKREDRR RLALIICNTE
51 FDHLPPENGA HYDIVGMKEL LQGLGYTVVD EKNLTARDME SVLRAPFAARF
101 EHKSSDSTFL VLMSHGILEG ICGTVHDEKK PDVLLYDTIF QIFNNRNCLS
151 LKDKPKFVIIV QACRGEKHGE LWRVDSPASL AVISSQSSSEN LEADSVCKIH
201 BEKDFIAFCS STPHNVSWRD RTRGSIFITE LITCFQKYSC CCHLMEIFRK
251 VQKSFEPQKA KAQMPTIERL TLTDRFYLFP GN

【図 7】

FIGURE 7

SEQ ID NO:7
1 50
ATGGGCCATC ATCATCATCA TCATGGGCAFA CTCAAACTTT GTCTCTCATGA
51 100
AGAAITTCCTG AGACTATGTA AAAAAATCA tGATGAGATC TATCCAAATA
101 150
AAAGAGAGGA GGACCGCAGA CGCTTGCTTC tCATCATATG CAATACAAG
151 200
TTTGATCACC TGCTTGCAGG GAATGGGGCT CACTATGACA TCGTGGGGAT
201 250
GAAAAAGCTG CTTCAGAGCC TGCGCTACAC TGTGTGTGAC GAAAAAGATC
251 300
TCACAGCCAG GGATATGGAG TCAGTGTGA GGGCAITTTG TGCCAGACCA
301 350
GAGCACAAAT CCTCTGACAG CAGGTTCTTG GTACTCATGT CTCAITGGCAT
351 400
CCTAGAGGGA ATCTGCGGAA CTGCGCATAA AAGAAAAA CCAGATGTGC
401 450
TGCTTTATGA CACCACTTTC CAGATATTA ACAACGCGAA CTGCTTCAGT
451 500
CTAAAGGACA AACCAAGGT CATCATGTGC CAGGCTGCA GAGGTGAAAA
501 550
ACATGGGGAA CTCTGGGTCA GAGACTCTCC AGCATCTCTG CGAGTCATCT
551 600
CTTCACAGTC ATCTGAGAAC CTGGAGGCGC ATTCTGTCTG CAAGATCCAC
601 650
GAGGAGAAGG ACTTCATTGC TTTCTGTCTT tCAACACAC ATAACTGTGC
651 700
CTGGAGAGAC CGCACAAAGG GCTCCATCTT CATTACGGA CTCATCACAT
701 750
GCTTCCAGAA ATATTCTTGC TGCTGCCACC TAAAGGAAT ATTTGGGAAG
751 800
GTACAGAAAT CATTGAAAT TCACAGGCT AAAGCCGAGA TGCCACACAT
801 849
AGAACGACA ACCTTGACAA GAGATTCTTA CCTCTTCTCT GGCATTTGA

【図 4】

FIGURE 4

SEQ ID NO:4
1 MGHHEHHHGA LKLCPHEEFL RLCKERAEEI YPIKERNNRT RLALIICNTE
51 FDHLPPENGA DFDITGMKEL LEGLDYSVDV BENLTARDME SALRAFAATRP
101 EHKSSDSTFL VLMSHGILEG ICGTVHDEKK PDVLLYDTIF QIFNNRNCLS
151 LKDKPKFVIIV QACRGANRGE LWRVDSPTSL EVASSQSSSEN LEEDAVYKTH
201 VEKDFIAFCS STPHNVSWRD STMOSIPITQ LITCFQKYSW CCHLEEVFRK
252 VQKSFETPRA KAQMPTIERL SMTRYFYLFP GN

【図 5】

FIGURE 5

SEQ ID NO: 5
1 50
ATGGGCCATC ATCATCATCA TCATGGGCGC CTCAGGCTTT GTCTCATGA
51 100
AGAAITTCCTG AGACTATGTA AAGAAAGAGC TGAAGAGATC TATCCAAATA
101 150
AGGAGAGAAA CAACCGCACA CGCTTGCTTC TCATCATATG CAATACAGAG
151 200
TTTGACCATC TGCTTCCGAG GAATGGAGCT GACTTTGACA TCACAGGGAT
201 250
GAAGGAGCTA CTTCAGGGCT TGACTATAG TGTAGATGTA GAAGAGATC
251 300
TGACAGCCAG GGATATGGAG TCAGCGCTGA GGGCAITTTG TACCAGACCA
301 350
GAGCACAAAT CCTCTGACAG CACATCTCTG GTACTCATGT CTCAITGGCAT
351 400
CCTGGAGGGA ATCTGCGGAA CTGTGCATGA TGAGAAAAA CCAGATGTGC
401 450
TGCTTTATGA CACCATCTTC CAGATATTA ACAACGCGAA CTGCTTCAGT
451 500
CTGAAGGACA AACCAAGGT CATCATGTGC CAGGCTGCA GAGGTGCAAA
501 550
CCGTGGGGAA CTGTGGGTCA GAGACTCTCC AGCATCTCTG GAAGTGGCTT
551 600
CTTCACAGTC ATCTGAGAAC CTGGAGGAAG ATGCTGTGTA CAAGACCCAC
601 650
GTGGAGAAG ACTTCATTGC TTTCTGCTCT tCAACGCGAC ACAACGTGTC
651 700
CTGGAGAGAC AGCACAATGG GCTCTATCTT CATCACAAA CTCATCACAT
701 750
GCTTCCAGAA ATATTCTTGG TGCTGCCACC TAGAGGAAT ATTTGCGAAG
751 800

GTACAGCAAT CATTGAAAC TCACAGGCGC AAAGCTCAA TGCCACCAT
801 849
AGAACGAGTC TCATGACAA GATATTCTA CCTCTTCTCT GGCAATTGA

【図 8】

FIGURE 8.

T7→RBS プロ IL18 RBS Casp4

【図 9】

FIGURE 9.

SEQ ID NO:8
1 50
AGATCTCGAT CCCGCGAAAT TAAACGACT CACTATAGGG GAATTTGTGAG
51 100
CGGATAACAA TTCCCTCTTA GAACACACT taaggaggat ataacatATG
101 150
GCTGCTGAAC CAGTAGAAGA CAATTGCAAT AACTTTGTGG CAATGAAATT
151 200
TATTGACAAAT ACGCTTTACT TTATAGCTGA AGATGATGAA AACCTGGAAT
201 250
CAGATTACTT TGGCAAGCTT GAGAGCAAC TATCGTCAAT tCGTAATTTA
251 300
AATGACCAGG TCCTATTTAT CGACCAAGGG AATCGTCCAC TATTGAGGA
301 350
CATGACAGAC AGTGACTGCC GAGACAAATG GCCGCGAACC ATtTTCAITTA
351 400
TATCTATGTA CAAGGATTTT CAGCGCGCGG GAATGGCCGT AACTATTTCCT
401 450
GTCAAAATGTG AAAAGATATC CACGCTGTGC TGTGAGAACA AgATtATtAG
451 500
TTTCAAAGAG ATGAATCCGC CGGATAATAT CAAGGACACG AAGTCTGATA
501 550
TCATATTTT CCAGCGCAGC GTGCGGGG ACGATACAA GATGCAATTT
551 600
GAATCATCCA GCTATGAAGG GTACTTTCTT GCATGCGAGA AGGAACGCGA
601 650
tCTCTTTTAA CTATTTTAA AGAAAGAGGA CGAGCTAGGC GATCGCAGCA

【図 10 B】

【図 10 A】

[illegible]

【図 10 C】

b
 K E R A B E I Y P I K E R N H N R T R L A -
 T C T C A C T A T G C A T C A G A G T T T T C A C A T T C C T C T G A G A A T G A G A C T T T G G A
 5804
 A G A T A G T A G C A G T A T T C T C A A G T T G T A C A C G A G A G C T C T A C T A C T G A A A C T
 b
 L I I C N T E T G T G D H F L F P R N G A D F D -
 C A T C A G A G A G A G A G A G T A G T T G T G G T G C A T A T T G T A G A T G T A G A G A G A A
 5864
 G T A G T T C C T C A T C C T C T C A T A G A A C T T C C T C A G A C T A T A C A C A C T A C A T A T T C T T T
 b
 I T G M K K L L E G L D T S V D V E E N -
 T C T G A C A C A G G A T A G G A T C A G C C T C C A G G C A T T C T T A C A C A C A G A C A G A A
 5928
 A G A T T C T C C T C T A C A C C A T C C A G C C G A C T C C C T A A A G A C T C T G A T C T C T T T T
 b
 L T A R D K E S A L R A F A T R P R H K -
 G T C T C T G A C A C A C A C A T C T T T G T A C T A C T C T A C T A G G A T G A G A G G A G A C T T G G G
 5984
 C A G A G A C T C T C T T A T A A C A G T A T G C A G A G A T A C T T A G A C T C C C T T A T A G C T
 b
 S E D S T F L L V L M E H Q I L E G I C G -
 A C T T T G C A T A G A A A A A A A C A G A T T C C T G T T T T A T A C A C A C A C T C T C A G A T A T
 6044
 T T G A C A G T A C A C T T T T T T T G G T T A C A C A G A A A T A G T G T T G A T A C A G T C A T A A
 b
 T V E D E K F P D V L L Y D T I F Q I Y -
 C A A C A C G C A A C T C T C A G T C T G A G A C A A C C A G G A C A T A T T T G C A A G G C T G
 6104
 T T G A G A T T T A G A G A T T A A T T C C T T T T T T G G T C A G A T A C A G T C C G A C
 b
 N N R N C L S L E D K E D I S V Q A C -
 C A G A G T G A A A C T G G G A A G T T G T G A G A G T C T C A C A T A C T G A G T G A G G C
 6164
 G T C T C A G C T T T G A C A C C C T T A C A C A G C T T T G A G A G G T G A T A G A A C T C A G C N

【図 10 D】

b R C A N R Q E L W V A D S F A S L E V A -
 C T C T C A C A T C A T C T C T G A G A C C T G A G A G A G A G T C T T P T A C A A C C C A C C T G A G A A
 6224
 G A G A G T C T C A T A G A C T C T T G A C C T C T T C A C A G A A A T C T T G T G T G C A C C C T T
 b S S Q S S B N L E R E D A V Y K T H V E E -
 G G A C T T C A T T G C T T C T T C T T C A A C C C A C A C A C T C T C T G A G A G A C A C A A T
 6284
 C C T G A A G T A C G A A A G A G A G A G T G C G T G T G T G C A G A G A C T C T T G T G T G A T T A
 b D F I A F C S S T F H N V S W R D S T M -
 G G C T T A C T C T C A C A C A C A C A C A T C T C C A A A A T A T C T T G T G T G C A
 6344
 C C G A G A T A G A A G T A G T G T G T G A G T A T T C A C A A A T C T T A T A G A G A C C A C A C T T
 b G S I F I T Q L I T C F Q K Y S W C C H -
 C C T A G A A A G A T T C G A A G T A C A C A C A T C A T T A A A C T C A A G C C A A A C T C A
 6404
 G G A C T C C T C A T A A G C C T C A T G C T A T G T A A A C T T G A G T T C C G T T T C A G T
 b L E H V P R E V Q Q S P E T P R A K A Q -
 A A T G C C C A C A T A G A A C T C T C A T G A C A A G A T A T T T T A C C T T T C T T G C A A T G
 6464
 T T C G G T G T A T C T T G C T G A C A G T A C T T C T A A A A G A T G A A A A G C C T T A A C
 b M F T I E R L E M T K R Y F Y L F F G N * -
 A A A T G A T C G A A T T C G A A C T C C T G A C A G C T T G C G C A C T G A G A C A C A C A C
 6524
 T T T A C T T A G C T T A A G C T G A G C A C T T T C A A C C C G A C C G T G A C T C T G T G T G
 b K W I R I R A P S T S L R P H S S T T T -
 C A C C A C A C T G A G A T C C G C T C T A A C A A C C C A A A G A A A G T G T G T G C C C T G C
 6584
 G T G T G T G A C T C A G C C A G A T T G T C G A G C T T C T T G A C T C A C C A C C A G A C G

【図 10 E】

b T T T E I A L L T K F E R K L S M L L P -
 ターミナーター
 A C C C T G A C A A T A T T A C A T A C C C C T G C C C T C A A G G G T C T G A G G G T T T T
 6544
 T G G A C T C C T A T C A T C A T T G A G A C C C G A A T T G C C A A A T C C C A A A
 b F L S N N * H N F L G P L H G S * Q V F -
 6704
 A A C

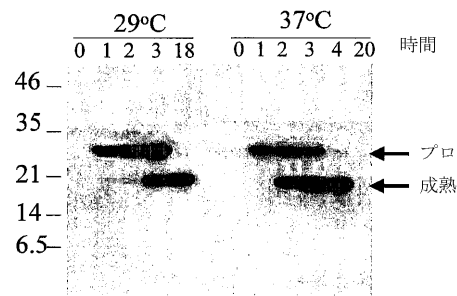
【図 13】

FIGURE 13.
SEQ ID NO:9

1 50
 A T G G C T G C T G A A C A G T A G A G A C A A T T G C A T C A A T T T G T G G C A A T G A A
 51 100
 A T T T A T T G A C A A T A G C T T T A C T T A T A G C T G A A G A T A T G A A A A C C T G G
 101 150
 A A T C A G A T A C T T T G G C A A G C T T G A G A G C A A A C T A T G G T C A T T C G T A A T
 151 200
 T T A A A T G A C C A G G T C C T A T T T A T G C A C C A A G G A A T G C T C A C T A T T C G A
 201 250
 G G A C A T G A C A G A C A G T A C T G C C G A G A C A A T G C G C G C G A A C C A T T T T C A
 251 300
 T T A T A T C T A T G T A C A A G G A T T C T C A G C C G C G C G A A T G C C G T A A C T A T T
 301 350
 T C T G T C A A A T G T G A A A A G A T A T C C A C G C T G T C G T G A G A A C A A G A T T A T
 351 400
 T A G T T T C A A A G A G A T G A A T C C G C G G A T A A T A C A A G G A C A C G A A G T C T G
 401 450
 A T A T C A T A T T T T T C A G C G C A G C G T G C C G G C A C A G A T G C A A C A A G A T G C A A
 451 500
 T T T G A A T C A T C C A G C T A T G A A G G T A C T T T C T T G C A T G C G A G A G G A A C G
 501 550
 C G A T C T C T T T A A C T T A T T T T A A G A A A G A G A C A G A G T A G C G C A T C G C A
 551 600
 I G C A T T A T G T T C A C T G T C C A A A A T G A A G A C T A G T G G A G A G A T A A T A C C A G
 601 650
 G A T A A A A A A A A T C C A T G G C C A T C A T C A T C A T C A T G A T G C A T A C T C A A
 651 700
 A C T T T G T C C T C T G A A G A A T T C C T G A G A C T G T G A A A A A A A A T C A T G A T G
 701 750
 A G A T C T A T T C A A T A A A A A A A G A G A G G A C C G A G A C G C C T G C T C T A T C
 751 800
 A T A T G C A A T A C A A A G T T T G A T C A C T G C C T G C A A G G A A T G G G G C T C A C T A
 801 850
 T G A C A T C G T G G G A T G A A A A G C T G C T A A A G S C C T G G G C T A C A C T G T G G
 851 900
 T T G A C A A A A G A A T C T C A C A C C A G G A T A T G G A T C A G T G C T G A G G G C A
 901 950
 T T T G T G C C A G A C C A G A G A C A A G T C C T C T G A C A G A C G T T C T T G G T A C T
 951 1000
 C A T G T C T C A T G G C A T C C T A G A G G A A T C G C G A A C T G C G C A T A A A A A A G A
 1001 1050

【図 11】

FIGURE 11.



【図 12】

FIGURE 12.

T7 → [RBS] [プロ IL18] [RBS] [Casp5]

AAAAACCGGA TGTGCTGCTT TATGACACCA TCTCCAGAT ATTCAACAAC
 1051 1100
 CGCAACTGCC TCAGTCTAAA GGACAAACCC AAGGTCATCA TTGTCCAGGC
 1101 1150
 CTGCAGAGGT GAAAAACATG GGAACCTCTG GGTGAGAGAC TCTCCAGCAT
 1151 1200
 CCTTGGCAGT CATCTCTTCA CAGTCATCTG AGAACCTGGA GGCAGATTCT
 1201 1250
 GTTTGCAAGA TCCACGAGGA GAAGGACTTC ATTGCTTTTC GTTCTTCAAC
 1251 1300
 ACCACATAAC GTGTCTGGA GAGACCGCAC AAGGGGCTCC ATCTTCATTA
 1301 1350
 CGGAACTCAT CACATGCTTC CAGAAATATT CTGCTGCTG CCACTAATG
 1351 1400
 GAAATATTC GGAAGGTACA GAAATCATTT GAGTTCAC AGGCTAAAGC
 1401 1450
 CCAGATGCC ACCATAGAAC GAGCAACCTT GACAAGAGAT TTCTACCTCT
 1451 1464
 TTCTTGGCAA TTGA

【図 14 A】

FIGURE 14.

GCCTCGATGACCGGACAGATGCTCGGCTAGAGGATCGATCTCATCCCGCA
 4921 4980
 GCCTCGATGACCGGACAGATGCTCGGCTAGAGGATCGATCTCATCCCGCA
 c A G D A G H D A S G V E D R D L D P A K -
 77 プロモーター
 A A T A A T A G A C T A C T A T T G G G A A T T G A G A C A T A C A A T C C C C T G A G A C A C A
 4981 5040
 T T A A T A T G C T A G A T A T C C C C T A A C T C G C C A T T G T T A A G G G A G A T C T G T G T
 c L I R L E I G R L A D N N S P L D H T -
 shine-Dalgarno プロ IL18 スタート
 C C T T G G G A T A T A C A T A G C T C T G A C C A G T A G A G A C A A T T G A T C A C T T G
 5041 5100
 G G A T C C C C A T A T G T A T A C C A G A C T T G G T C A T C T T G T T A A C T A G T G A A C
 c L R R I H M A A E P V E D N C I N F V -
 T G C A A T G A A A T T A T T G A C A T A C C T T A C T T T A T A C C T G A G A T G A A A C C T G G
 5101 5160
 A C C T T A C T T T A A A T A C T G T A T G C A A G A A A T A T G A C T T A C T A C T T T T G G A C C
 c A N K F I D N T L Y F I A E D D E N L E -

```

      TGCTGAAAGGAGGAACATATATCCGGT
6661 -----+-----+----- 6687
      ACGACTTTCCTCCTTGATATAGGCCA
C          L K G G T I S G  -

```

AAGGCAITCC ACCTGATCAA CAAAGATTGA TCTTTGCCGG TAAGCAGCTC
151 200
GAAGACGGTA GAACGCTGTC TGAATTACAAC ATTCAGAAGG AGTCGACCTT
201 250
ACATCTTGTC TTAAGACTAA GAGGAGGGTA CTTTGSCAAG CTTGAGAGCA
251 300
AACTATCCGT CATTCGTAAT TTAAGTAGCC AGGTCCATATT TATCGACCAA
301 350
GGGAATCGTC CACTATTGGA GGACATGACA GACAGTGACT GCGGAGACAA
351 400
TGCGCCGCGA ACCATTITICA TTTATCTCTAT GTACAAGGAT TCTCAGCCGC
401 450
GCGGAATGGC CGTAACATATT TCTGTCAAAT GTGAAAAGAT ATCCACGCTG
451 500
TCGTGTGAGA ACAAGATTAT TAGTTTCAAA GAGATGAATC CGCCGGATAA
501 550
TATCAAGGAC ACGAAGTCTG ATATCATATT TTTCCAGCGC AGCGTGCCGG
551 600
GGCAGGATAA CAAGATGCAA TTTGAATCAT CCAGCTATGA AGGGTACTTT
601 650
CTTGCAATGC AGAAGGAACG CGATCTCTTT AAACCTTATTT TAAAGAAAGA
651 700
GGACGAGCTA GCGGATCGCA GCATTATGTT CACTGTCCAA AATGAAGACT
701
AG

【図 18】

FIGURE 18.

SEQ ID NO:12

1 50
AGATCTCGAT CCCGGGAAAT TAATACGACT CACTATAGGG GAATTGTGAG
51 100
CGGATAACAA TTCCCTCTTA GACCACACCT TAAGGAGGAT ATAACATATG
101 150
CAGATCTTCG TCAAGACGTT AACCCGTAAA ACCATAACTC TAGAAGTTGA
151 200
ATCTTCCGAT ACCATCGACA ACGTTAAGTC GAAAAATCAA GACAAGGAAG
201 250
GCATTTCCACC TGATCAACAA AGATTGATCT TTGCGGTGTA GCAGCTCGAG
251 300
GACGGTAGAA CGCTGTCTGA TTACAACAAT CAGAAGGAGT CGACCTTACA
301 350

1401 1450
GTTCCGAAAGA AGACGAAGAA AAGAGCCAGG AGCCAGATAT CACTTTCAAT
1451 1500
GTCCGCTTAA GGGATCTACT TTCTGCCCTTA AATGCGAAGT ATTATCGGGA
1501 1550
TAAACCCPAT TTCAAACCAA ATAGTTTAFT GAAAGCAATG TCCAAATCTC
1551 1600
CAAGAAAAAA TATTCTTCTT GGCTCAGACC AAGAGGACGC GCAAGAAATC
1601 1650
TTCCAGAACCA TACTAGCCGA GTTGGAAGAT AACGTTAAAT CATTTGAATAC
1651 1700
TGA AAAACTA GATACCACTC CAGTTGCGAA ATCAGAAATTA CCGCATGATG
1701 1750
CTTTAGTAGG TCAACTTAAAC CTGTGTGAAG TTGGCAGCTGT TTACATTCOA
1751 1800
ACTGAACAGA TTGATCCTAA CTCTATACTA CATGACAAGT CCATTCAAAA
1801 1850
TTTCACACCT TTCAAACATA TGACTCCTTT AGATGCTATC ACGGCAGAAA
1851 1900
GAATTGGTTG TTTACAGTGT GGTGAGAACG GTGGCAATAG ATATTCCGTA
1901 1950
TTTTCGGGAT TAAGCTTAAA TTTACCGAAC GAGAAATATT GTTCCACTTT
1951 2000
AAAAATTATCT CAGTTATTGA GCGACTGGAG TAAACCTGAA ATCATGGAAG
2001 2050
TCGTAGAAAG TAACCGTTGT GCCCTCACNG CAGCGCACTC TCATTTATTT
2051 2100
GGTCAGTTGA AAGAATTGTA AAAAAACCT GAGGGTTTGA TOCCAGAAAA
2101 2150
GCCAATTAAAC GCTGTAAAG ATAGGGTTCCA TCAAAATCGAA GAACTTCTTG
2151 2200
CCAAACCAAT TATTGAAGAT GAAGATTATA AGAAGTTGCA TACAGCAAAAT
2201 2250
ATGGTAAGTA AATGCTCTAA ATCTAAGCAG ATTTTAATAT CAAGACCTCC
2251 2300
ACCAATTATTA TCCATTCATA TCAACAGATC CGTATTGTAT CCAAGAACGT
2301 2350
ACATGATTAG AAAAAATAAC TCGAAGTAT TGTTTAAGTC AACGTTGAAT
2351 2400
CTTGCCCTTT GGTGTTGTGA TATTAATGAA ATCAATTTGG ATGCTCGTTT
2401 2450
GCCAATGTCA AAAAAGGAAA AAGCTGCGCA ACAAGATTCA AGTGAAGATG
2451 2500

TCTTGTCTTA AGACTAAGAG GAGGGTACTT TGGCAAGCTT GAGAGCAAAAC
351 400
TATCGGTCTAT TCGTAATTTA AATGACCAGG TCCTATTATT CGACCAAGGG
401 450
AATCGTCCAC TATTGAGGGA CATGACAGAC AGTGACTGCC GAGACAATGC
451 500
GCCGCGAACC ATTTTCATTA TATCTATGTA CAAGGATFCT CAGCCGCGCG
501 550
GAATGGCCGT AACTATTTCCT GTCAAAATGTG AAAAGATATC CACGCTGTGC
551 600
TGTGAGAAAC AGATTATTAG TTTCAAAGAG ATGAATCCGC CGGATAAATAT
601 650
CAAGGACACG AAGTCTGATA TCATATTTTT CCAGCGCAGC GTGCCGGGGC
651 700
ACGATAACAA GATGCAATTT GAATCATCCA GCTATGAAGC GTACTTTCTT
701 750
GCATGCGAGA AGGAACGCGA TCTCTTTAAA CTATTTTAAA AGAAAGAGGA
751 800
CGAGCTAGGC GATCGCAGCA TTATGTTTAC TGTCCAAAT GAAGACTAGT
801 850
GGAGGATATA ATACCAGGAA TAAATAAAAT CCATGGGCCA TCATCATCAT
851 900
CATCATGGCA TGGATGAAG CAAGATAAAC AGTTTATTAC AATTTTATAT
901 950
TGGTTCCCGA CAGGATTTTT TGAGAAATTT TAAAACTTGG AGTAACAACA
951 1000
ATAACAATCT ATCGATTTAT TTATTAAATTT TTGGCATAGT AGTATTTTTT
1001 1050
TATAAAAAAC CAGACCATCT AAACATACAT GTTGAGAGCG TTAGTGAAT
1051 1100
GACAACAAAC TTCAGAAATA ATATATGCTT TAGCCGTGG TTGCCAGAA
1101 1150
GTAAGTTTAC CCACCTTAGAC GAAGAGATCT TGAAAAGAGG TGGTTTCAT
1151 1200
GCTGGTTTAG TTAATGATGG TAACACTTGT TTTATGAACT CTGTTTTGCA
1201 1250
ATCATTTGGCA TCATCCAGAG AATTAAATGGA GTTCTTGGAC AATAATGTCA
1251 1300
TAAGGACCTA TGAGGAGATA GAACAAATG AACACAATGA AGAAGGAAC
1301 1350
GGGCAAGAA CTGCTCAAGA TGAAGCCACT CATTAAGAAA ACATCTGTAA
1351 1400
GGGTGGCAAA GTTTATGGTA AGCATAAGAA GAAATTGAAT AGGAAGTCAA

AAAAACATTGG CGGTGAATAC TATACGAAAT TACATGAACG CTTGAGCAG
2501 2550
GATTTTGAAG ACAGCGAGGA AGAAAAAGAA TACGATGACG CAGAGGGGAA
2551 2600
CTATGCTCTT CATTACAATC ATACCAAGGA TATCAGTAAC TATGATCCCC
2601 2650
TAAACGGTGA AGTCGATGGC GTGACATCCG ATGATGAAGA TGATACAT
2651 2700
GAAGAAACCG ATGCTTTAGG GAATACAATC AAAAAAGGA TCATGAACA
2701 2750
TTCTGATGTT GAAAAAGAGA ATGTAAAGAA TAATGAAGAA CTGCAAGAAA
2751 2800
TCGACAAATGT GAGCCTTGAC GAACCAAGA TCAATGTTGA AGATCAACTA
2801 2850
GAAACATCAT CTGATGAGGA AGATGTTATA CCAGCTCCAC CTATCAATTA
2851 2900
TGCTAGGTCA TTTTCCACAG TTCCAGCCAC TCCATTGACA TATTCAATTG
2901 2950
GCTCTGTCTAT TGTTCACATC GGTACCCATA ATTATGGTCA TTACATTGCA
2951 3000
TTTAGAAAAAT ACAGGGGTTG TTGTTGAGGA ATATCTGATG AGACTGTGTA
3001 3050
CGTTGTGGAC GAAGCTGAAG TCCTTTCAAC ACCCGTGTGA TTTATGTTAT
3051 3100
TTTACGAATA TGACTTTGAT GAAGAACTG GGAAGATGAA GGATGATTTG
3101 3150
GAAGCTATTC AGAGTAATAA TGAAGAAGAT GATGAAAAAG AGCAGGAGCA
3151 3200
AAAAAGAGTC CAGGAGCCAA AGGAAAGCCA AGAGCAAGGA GAAGGTGAAG
3201 3250
AGCAAGAGGA AGGTCAAGAG CAGATGAAGT TOGAGAGAAC AGAAGACCAT
3251 3300
AGAGATATTT CTGGTAAAGA TGTAAACTAA GCTCGAGCAC CACCACCACC
3301 3350
ACCACTGAGA TCCGCTGCT AACAAAGCCC GAAAGGAAGC TGAATTGGCT
3351 3400
GCTGCCACCG CTGAGCAATA ACTAGCATAA CCCCTTGGGG CCTCTAAACG
3401 3419
GGTCTTGAGG GGTTTTTTG

【图 19 B】

FIGURE 19.

[illegible]

5328
aGCATTAATTAATATGTCCTGAGTAATAAGTGTCTCTTACGAGGTGTAAAGTCTCT
b R N L N D Q V L F I D I Q Q N R P L F R D -
CATGTACAGCAGTGTCTCCGACAGCAATGTCGACAGCAATGTCATATATCTATGTA
5364
GTATCTGTTCATGTAAGTGCTCTGTTGTAAGGCTCTGTGTAAAGTAATATAGATACAT
b M T D S D C R D N A P T X T I F I I S K Y -
CAAGATCTGTGACGCGCGCGAGATGCTGTAACTATCTGTCAATGTGAAAGATATC
5444
GTCTCTAGAGTGTGCGCGCTCTCAACGCGATGTAAAGACAGCTTACATCTTTCTATCT
5501
b K D S Q R B G N A V T I S V E K E K I S -
CACCTGTCTGTGTAGAACAGCATATATGTTGTCAAGAGATGATCTCCCGGCAATATC
5504
GTTCGACGACAGCATCTGTCTGTATTAATATAAATCTCTACTGTAAGCGGCTATATTA
5561
b T L S C E N K I I S P K E N M P P D N I -
CAAGACGACAGATCTGATATGATCTTTTCGACGCGACCTGTCTGGGACGACATACAA
5564
GTCTCTGTCTCTACGATATATGTAATAAAGAGTCTGTGTCTGTGCGCGCGGTGCTATGTT
5621
b K D T K E T I F F P Q R E V P G S G A G A
GTGTCAATTTGAATCATCGCTGCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
5624
GTAGCTTTAACTATGTGTGTGTGTCTTCCTGTATTAAGAGTGTGTGTCTCTCTGTGCTCT
5681
b M Q F R E E S Y E G Y F L A C E X E R D -
TCTCTTTAAATCTATTTTAAAGAGAGAGAGATGTAAGGATCTGCGATCATATTTTTCAC
5684
AGAGAAATTTGAATTAATTTCTTCTCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
5741
b L P K L I L I K K E D E L C D R S I M P T -
L P K L I L I K K E D E L C D R S I M P T -

【图 19 D】

[illegible][illegible]

b

87 ターミナーター配列

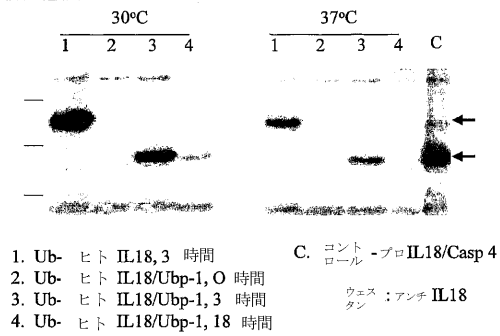
CTGAGCAATACAGGCATACCCCTTGGGSCCTCTAAACGGCTCTAGGGCTTTCTT

8324 8362

GACTCGTTACTGATCGTATTGGGGAACCCCGGAGATTGCCCAGACTCCCCAAAAAC

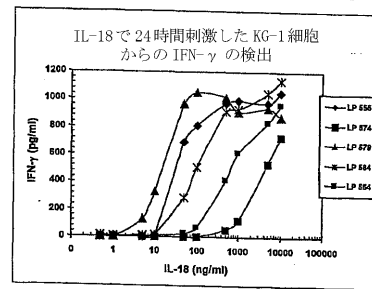
【図 20】

FIGURE 20.



【図 21】

FIGURE 21:

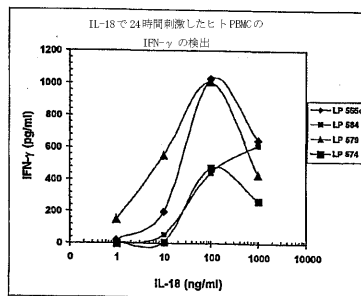


異なるヒト/ネズミ IL-18サンプルの
説明 (異なるロット/構築物)

LP555d (スタンダード) イー・コリ ICE- 切断 (インビトロ)
LP 554 イー・コリ ネズミ IL-18 Ice- 切断 (インビトロ)
LP559 イー・コリは、N-末端メチオニンを含んでいる 成熟 IL-18を発現した。
LP574 イー・コリは、N-末端メチオニンを含んでいる 成熟 IL-18を発現した。
LP579 ビキアは、成熟 IL-18を発現、分泌した。
LP584 イー・コリ IL-18/ICE ニシストロン共発現 (インビボ)
LP594 イー・コリ ICE- 切断 (インビトロ)
LP613 イー・コリ 切断カスパーゼ 4 (インビトロ)
LP614 イー・コリ ICE 共発現 (インビトロ)
LP623 カスパーゼ 4 共発現 (インビボ)

【図 22】

Figure 22



異なるヒト/ネズミ IL-18サンプルの
説明 (異なるロット/構築物)

LP555d (スタンダード) イー・コリ ICE- 切断 (インビトロ)
LP 554 イー・コリ ネズミ IL-18 Ice- 切断 (インビトロ)
LP559 イー・コリは、N-末端メチオニンを含んでいる 成熟 IL-18を発現した。
LP574 イー・コリは、N-末端メチオニンを含んでいる 成熟 IL-18を発現した。
LP579 ビキアは、成熟 IL-18を発現、分泌した。
LP584 イー・コリ IL-18/ICE ニシストロン共発現 (インビボ)
LP594 イー・コリ ICE- 切断 (インビトロ)
LP613 イー・コリ 切断カスパーゼ 4 (インビトロ)
LP614 イー・コリ ICE 共発現 (インビトロ)
LP623 カスパーゼ 4 共発現 (インビボ)

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 60/264,923

(32)優先日 平成13年1月20日(2001.1.20)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 キュン・オー・ジョハンソン

アメリカ合衆国ペンシルベニア州19406-0939、キング・オブ・プルシア、スウェードラ
ンド・ロード709番

(72)発明者 ロバート・ビー・カークパトリック

アメリカ合衆国ペンシルベニア州19406-0939、キング・オブ・プルシア、スウェードラ
ンド・ロード709番

(72)発明者 アラン・アール・シャッツマン

アメリカ合衆国ペンシルベニア州19406-0939、キング・オブ・プルシア、スウェードラ
ンド・ロード709番

(72)発明者 イェン・セン・ホ

アメリカ合衆国ペンシルベニア州19312、バーウィン、オールド・ステイト・ロード362番

(72)発明者 パトリック・マクデビット

アメリカ合衆国ペンシルベニア州19406-0939、キング・オブ・プルシア、スウェードラ
ンド・ロード709番

審査官 池上 文緒

(56)参考文献 国際公開第97/022619 (WO, A1)

特開平10-080270 (JP, A)

特表平02-501618 (JP, A)

国際公開第99/037793 (WO, A1)

特開平10-271998 (JP, A)

Nature (1997) vol.386, no.6625, p.619-623

J. Immunol. (1995) vol.154, no.5, p.2321-2332

Bio/technology (1989) vol.7, no.7, p.698-704

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P 21/06

C12N 15/09

C07K 14/54

PubMed

BIOSIS/WPI(DIALOG)