

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии. Оно описывает новый антагонист интерлейкина-1 (IL-1) активный в отношении как IL-1a, так и IL-1B, новую последовательность DNA, кодирующую антагонист IL-1, и способ получения антагониста IL-1 методикой рекомбинантной DNA. Оно также описывает профилактическое, терапевтическое и диагностическое применение такого нового антагониста IL-1 при патологиях, зависящих от образования IL-1.

Предпосылки к созданию изобретения

Существуют два различных гена, кодирующих интерлейкин-1 (IL-1), названные IL-1a и IL-1B, которые кодируют белок IL-1a и IL-1B, соответственно.

Интерлейкины IL-1a и IL-1B являются плеiotропными цитокинами, которые, хотя их последовательности и обнаруживают недостаточную аналогию, оказывают множество сходных воздействий на различные ткани и влияют на многие патологии человека, в частности на иммунный ответ организма и на воспалительные процессы.

Оба белка имеют молекулярную массу около 17,5кД, и они предварительно синтезируются как молекула предшественника большего размера, имеющая молекулярную массу около 31кД.

IL-1'ы являются сильными воспалительными и пирогенными цитокинами, которые обычно имеют полезные эффекты, но могут также иметь эффекты, вредные для здоровья организма.

Они могут, например, принимать участие в патогенезе симптомов аутоиммунных патологий, подобных красной волчанке, в частности, они участвуют как медиаторы в провоцировании поражения тканей, как, например, при ревматоидном артрите.

Многие биологические эффекты IL-1 подобны тем, которые могут наблюдаться в случае сепсиса. Последние исследования продемонстрировали, что внутривенное введение IL-1 в дозах от 1 до 10нг/кг вызывает лихорадочное состояние, сонливость, отсутствие аппетита, общую миалгию, артралгию и сильную головную боль.

Так как IL-1 имеет плеiotропные биологические свойства, многие из которых отрицательно воздействуют на организм, мощные эффекты IL-1 должны находиться под четким физиологическим контролем.

Синтез IL-1 ингибируется противовоспалительными цитокинами, простагландинами и глюкокортикоидами, и наличие множества уровней ингибирования IL-1 указывает на необходимость точного регулирования этого медиатора.

IL-1 является единственным цитокином, для рецептора которого до настоящего момента описан антагонист-полипептид, третьим известным на сегодня компонентом семейства IL-1 является антагонист рецептора IL-1 (IL-1ra).

Все три компонента (IL-1a, IL-1B и IL-1ra) распознаются и связываются с одним и тем же рецептором на поверхности клетки (IL-1R); связывание IL-1a и IL-1B с IL-1R передает сигнал, а IL-1ra - нет.

Существует два типа рецепторов IL-1, названные IL-1RI и IL-1RII. IL-1ra является полипептидом, который связывает IL-1RI и обладает меньшим сродством к IL-1RII без какой-либо агонистической активности.

Образование IL-1ra вызывается IgG, цитокинами и бактериальными продуктами в различных клеточных типах, включая мононуклеарные фагоциты, полиморфнонуклеарные клетки (ПМН) и фибробласты.

До сих пор идентифицированы и клонированы две молекулярные формы IL-1ra: 1) секретируемый IL-1ra (sIL-1ra) содержит классическую лидерную последовательность из 25 аминокислот, дающую зрелый белок из 152 аминокислот; 2) внутриклеточный IL-1ra (icIL-1ra) испытывает недостаток в лидерной последовательности, а это предопределяет то, что белок остается внутриклеточным.

sIL-1a и icIL-1ra образуются из одного и того же гена. Транскрипты icIL-1ra берут начало от сайта альтернативной инициации и от сплайсинга первого альтернативного экзона во внутреннем акцепторном участке сплайсинга, размещенном в первом экзоне sIL-1ra. Прогнозируемые белки, таким образом, идентичны за исключением их NH<sub>2</sub>-концов, где первые 21 аминокислота sIL-1ra замещены четырьмя аминокислотами в icIL-1ra.

Экспрессия транскриптов, кодирующих sIL-1ra и icIL-1ra, регулируется по-разному. Биологическая значимость icIL-1ra еще не выяснена.

Подразумевается, что IL-1 принимает участие в патогенезе многих болезней, поэтому очевидна необходимость иметь доступные медикаменты, пригодные для ограничения вредных для здоровья эффектов IL-1.

Краткое описание изобретения

Цель настоящего изобретения - обеспечить антагонист IL-1 активный в отношении как IL-1a, так и IL-1B и их комбинации.

Следующая цель настоящего изобретения - обеспечить DNA последовательность, кодирующую антагонист IL-1, и способ получения такого нового антагониста методикой рекомбинантной DNA.

Другая цель настоящего изобретения - обеспечить антагонист в практически очищенной форме, чтобы он был пригоден для применения в фармацевтических композициях, действенных против патологий, которые требуют ингибирования IL-1.

Дальнейшие цели и преимущества изобретения станут очевидными в следующем описании.

Краткое описание фигур и списка последовательностей

Фигура 1 описывает последовательность DNA и последовательность белка для части вне общей, icIL-1raII (SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:9) в сравнении с тем же для sIL-1ra (icIL-1raI; SEQ ID NO:6) и sIL-1ra (SEQ ID NO:4 и SEQ ID NO:5), а также описывает DNA последовательность и кодируемый ею белок для общей части IL-1ra (SEQ ID NO:13 и SEQ ID NO:14).

Фигура 2 описывает RT-PCR анализ экспрессии icIL-1raII в различных типах клеток.

Фигура 3 описывает вестерн-блоттинг рекомбинантного icIL-1raII.

Фигура 4 описывает влияния icIL-1raII на индуцированную IL-1 экспрессию E-селектина в эндотелиальных клетках.

SEQ ID NO:1 представляет последовательность олигонуклеотида, названного IRA5, для применения в

RT-PCR.

SEQ ID NO:2 представляет последовательность олигонуклеотида, соответствующую нуклеотидам 69-70 В-актина cDNA, для применения в RT-PCR.

SEQ ID NO:3 представляет последовательность обратного олигонуклеотида, комплементарного нуклеотидам 430-449, для применения в RT-PCR.

SEQ ID NO:4 представляет DNA последовательность, кодирующую sIL-1ra, для части вне общей.

SEQ ID NO:5 представляет аминокислотную последовательность sIL-1ra для части вне общей.

SEQ ID NO:6 представляет DNA последовательность, кодирующую три аминокислоты icL-1ra, для части вне общей.

SEQ ID NO:7 представляет три аминокислоты icL-1ra для части вне общей.

SEQ ID NO:8 представляет DNA последовательность, кодирующую icL-1ra, для части вне общей.

SEQ ID NO:9 представляет аминокислотную последовательность icL-1ra для части вне общей.

SEQ ID NO:10 представляет DNA последовательность IL-1ra, для общей части. Что касается вопросов, относящихся к программе "Patent EPO", для получения последовательностей G нуклеотид присоединяют в первом положении последовательности для того, чтобы обеспечить кодирование первой аминокислоты Glu и с тем, чтобы избежать образования терминирующего кода на внутренней стороне последовательности.

SEQ ID NO:11 представляет аминокислотную последовательность IL-1ra для общей части.

SEQ ID NO:12 представляет последовательность из 21 аминокислоты, которая представляет фрагмент icL-1ra не общий с другими IL-1ra.

SEQ ID NO:13 представляет DNA последовательность, кодирующую полный icL-1ra.

SEQ ID NO:14 представляет аминокислотную последовательность полного icL-1ra.

Описание изобретения

Этот новый антагонист IL-1 получен путем инсерции в рамку DNA, кодирующей icL-1ra, новой последовательности из 63 пар оснований (bp) между первым icL-1ra специфичным экзоном и внутренним акцепторным участком первого экзона sIL-1ra.

Путем RT-PCR экспериментов авторы этого изобретения обнаружили, что этот новый транскрипт экспрессируется в активированных моноцитах и фибробластах и в полиморфнонуклеарных клетках (ПМН).

Экспрессия в клетках COS показала, что этот новый антагонист является в наибольшей степени внутриклеточным и имеет молекулярную массу (MW) приблизительно 25кД по SDS-PAGE.

Новый рекомбинантный антагонист обнаруживает способность ингибировать 1b-1.

В настоящей заявке, для ясности и простоты, известный в настоящее время icL-1ra обозначен как idL-1ra типа I (icL-1ra), в то время как новый антагонист, описанный здесь и являющийся предметом настоящего изобретения, определен как icL-1ra типа II (icL-1raII).

Примерами патологий, при которых новый антагонист в соответствии с настоящим изобретением может быть с успехом использован для профилактики, терапии или диагностики, являются ревматоидный артрит, септический шок, острый миеломоноцитарный лейкоз, иммунологическая реакция трансплантат против хозяина, синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), язвенный колит и все аутоиммунные заболевания вообще.

Воплощением изобретения является введение фармакологически активного количества icL-1raII людям, имеющим высокий риск развития патологий, требующих ингибирования IL-1, или людям, у которых уже проявляются патологии подобные сепсису.

Примером вышеуказанной категории являются пациенты, ожидающие хирургической операции.

Любой путь введения, совместимый с действующим началом, может быть использован, но особенно предпочтительным является парентеральное введение, так как позволяет получить за короткое время системные эффекты.

По этой причине предпочтительно введение внутривенного болюса непосредственно до, во время или после хирургической операции. Дозу icL-1raII, которая должна быть введена, подбирают на основе медицинских показаний в соответствии с возрастом, массой и индивидуальной реакцией пациента.

Дозировка может быть между 0,05 и 30мг/кг массы тела, а предпочтительная дозировка - между 0,1 и 10мг/кг массы тела.

Фармацевтическая композиция для парентерального применения может быть приготовлена в форме для вливания, содержащей действующее начало и подходящий носитель. Носители для парентерального введения хорошо известны на практике и содержат, например, воду, солевой раствор, раствор Рингера и декстрозу.

Носитель может содержать меньшие количества наполнителей для того, чтобы обеспечить стабильность и изотоничность раствора.

Приготовление указанных растворов может быть осуществлено в соответствии с обычными приемами, а предпочтительное содержание icL-1raII должно быть между 1мг/мл и 10мг/мл.

Кроме того, примерами патологий, при которых новый антагонист в соответствии с настоящим изобретением может быть с успехом применен в целях профилактики, терапии и диагностики, являются ревматоидный артрит, септический шок, острый миеломоноцитарный лейкоз, иммунологическая реакция трансплантат против хозяина, синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), язвенный колит и все аутоиммунные заболевания вообще.

Настоящее изобретение описано со ссылкой на специфические его воплощения, но содержание описания охватывает все модификации и замещения, которые могут быть произведены специалистом в этой области, не выходя за рамки содержания и целей пунктов формулы изобретения.

В следующей части будут описаны некоторые способы осуществления изобретения, хотя могут быть использованы и эквивалентные материалы и способы. Поэтому следующие примеры являются чисто иллюстративными и не ограничивающими изобретения.

Пример 1

## Клонирование и характеристика icIL-1raII

### Материалы и способы

#### Реагенты

Для культивирования и отделения клеток используют следующие коммерчески доступные реагенты: апиригенный солевой раствор и дистиллированную воду для клинического применения; среду RPMI 1640; среду DMEM; среду M199; L-глутамин; Percoll, Ficoll-Hispaque; взятую в асептических условиях сыворотку телячьих эмбрионов; ростовую добавку эндотелиальных клеток (ECGS), полученную из бычьего мозга; гепарин.

Все реагенты содержат менее 0,125 EU/мл эндотоксина, что проверено способом анализа с использованием лизата амёбоцитов *Limulus*.

#### Клетки

ПМН и моноциты человека, циркулирующие в кровеносной системе, выделяют из периферической крови здоровых доноров центрифугированием в ступенчатом (46% для моноцитов и 62% для ПМН) градиенте изотонического (285 mOsm) Percoll, как описано Colotta F., Peri G., Villa S.A., Mantovani A., Rapid killing of actinomycin D treated tumour cells by human mononuclear cells. *J. Immunol.* 132:936, 1984. Клетки выделяют на границе раздела, дважды промывают в солевом растворе и ресуспендируют в среде.

Процент выделяемых ПМН и моноцитов превышает 90%, а чистота - 98%, что определяют морфологическим изучением окрашенных центрифугированных в цитоцентрифуге клеток. Для ПМН и моноцитов обычно применяют среду для культивирования клеток RPMI 1640 с 2 mM L-глутамина и 10% FCS.

Эндотелиальные клетки человека (EC) получают из пупочных вен и культивируют, как подробно описано в литературе (Alavenna P., Paganin C., Martin-Padura I., Peri G., Gaboli M., Dejana E., Marchisio P.C., Mantovani A., Molecules and structures involved in the adhesion of natural killer cells to vascular endothelium, *J. Exp. Med.*, 173:439, 1991).

Обычно применяют конфлюэнтные клетки 2-го-5-го пассажей, поддерживаемые в среде M199 с 10% FCS с добавлением ECGS (50 мкг/мл) и гепарина (100 мкг/мл).

Клетки COS культивируют в среде DMEM с 10% FCS, а клетки фибробластов 8387 - в среде RPMI 1640 с 10% FCS.

После соответствующей обработки клетки исследуют на mRNA IL-1ra или белок IL-1ra, как описано ниже.

#### RT-PCR

Тотальную RNA экстрагируют способом с использованием изотио-цианата гуанидина с незначительными модификациями.

RT-PCR проводят как описано Colotta F., Polentarutti N., Sironi M., Mantovani A., *J. Biol. Chem.*, 267:18278, 1992.

Коротко говоря, проводят обратную транскрипцию 1 мкг тотальной RNA в обратном транскриптазном буфере (5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM трис-HCl; pH 8,3) с 2,5 mM случайных гексамеров, 1 mM каждого дезокси-нуклеотидтрифосфата, 1 ед/мл ингибитора RNазы и 2,5 ед/мл транскриптазы вируса лейкоза мышей moloney (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT).

Образцы инкубируют в течение 10 мин. при 25°C, а затем в течение 45 мин. при 42°C. Потом в реакцию cDNA добавляют специфичную пару праймеров, разработанных для амплификации cDNAs, кодирующих icIL-1raI или icIL-1raII, а также В-актин человека в качестве внутреннего контроля.

Амплификацию проводят в 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0,2 M каждого дезокси-нуклеотидтрифосфата, 2,5 единицы/100 мл полимеразы Taq (Perkin Elmer Cetus) и 4 мкг/мл каждого специфичного праймера (см. ниже). Амплификацию (30 циклов) ведут в автоматизированном термальном циклере (Perkin Elmer Cetus) при 95°C, при 55°C и при 75°C по 1,5 мин. для каждого условия.

Амплифицированные продукты проводят через агарозный гель, окрашенный 1% бромидом этидия вместе с стандартами молекулярной массы (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany).

Олигонуклеотиды синтезируют фосфоамиditным способом. Последовательности нуклеотидов, применяемые для селективной амплификации icIL-1ra идентичны описанным Haskill S. et al., *Natl Acad.*, USA, 88:3681, 1991.

В частности, авторы используют олигонуклеотиды GM397 (описаны здесь как IRA 1) и GM368 (IRA 4).

Для амплификации icIL-1raII авторы используют IRA 4 и IRA 5 (SEQ ID NO:1), которые специфично распознают дополнительный экзон, который, как описано здесь, входит в последовательность icIL-1raII.

Для амплификации В-актина описан "прямой" олигонуклеотид в SEQ ID NO:2, соответствующий нуклеотидам 60-79 cDNA В-актина.

"Обратный" олигонуклеотид, комплементарный нуклеотидам 430-449, представлен SEQ ID NO:3. Продукты амплификации субклонируют (TA Cloning System, Invitrogen, San Diego, CA) и секвенируют способом терминации дидезоксицепи.

#### Экспрессия продуктов icIL-1ra в клетках COS

cDNAs, содержащие 32 пары оснований 5'-нетранслируемого участка, полную открытую рамку считывания и 6 пар оснований (включающих стоп-кодон) 3'-нетранслируемого участка как icIL-1raI, так и icIL-1raII, получают RT-PCR с олигонуклеотидами IRA 4 и IRA 5, как подробно описано выше, и затем лигируют в экспрессирующий вектор pSF5. Достоверность обратной транскрипции и амплификации проверяют секвенированием.

Плазмиды, содержащие cDNA в корректной ориентации, очищают в градиенте CsCl, а затем трансфицируют ими клетки COS способом осаждения кальция, как описано Sambrook J. et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Через два дня супернатанты культуры и лизаты обработанных ультразвуком клеток исследуют ELISA или иммуноблоттингом, как подробно описано ниже. Пустую (нетрансфицированную) плазмиду используют в качестве контроля.

#### Идентификация иммунореактивного IL-1ra

Используют коммерческий тест ELISA (Amersham, Buckmamshire, UK), который идентифицирует как sIL-1ra, так и icIL-1ra. Для вестерн-блоттинга (анализа Western blot) используют поликлональные антисыворотки двух кроликов и одной козы.

Образцы лизатов и супернатанты клеток COS подвергают электрофорезу 12.5% SDS-PAGE, а затем блоттингу на нитроцеллюлозном фильтре (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

Инкубацию с первичными и вторичными антителами осуществляют согласно стандартным методикам. Первичные антитела представлены по-ликлональными антителами кролика против IL-1ra.

Вторичные антитела представлены фракцией козьего иммуноглобулина против кролика, связанной с пероксидазой хрена (Amersham). Бэнды фракции иммунореактивного белка обнаруживают способом на основе хемилюминесценции (ECL Detection, Amersham), осуществляемым согласно рекомендациям производителя.

Индукцируемая IL-1 экспрессия Е-селектина на ЕС

Конфлюэнтные ЕС, культивированные в 96-луночных планшетах (Falcon), инкубируют в течение 30 минут с количеством лизата трансфицированных клеток COS (см. выше), которое соответствует 25 до 100нг рекомбинантного IL-1ra (icIL-1ral или icIL-1ral), что определяют специфическим анализом ELISA (Amersham).

В качестве контроля параллельно используют равное количество лизата COS, полученного из "обманно" трансфицированных клеток. Затем ЕС обрабатывают в течение 6 часов 0,1-1нг/мл рекомбинантного IL-1B человека. Детекцию экспрессии Е-селектина осуществляют анализом ELISA на адгезионных ЕС с моноклональным антителом BB1G-E2 против Е-селектина в качестве первичного антитела и антисывороткой кроликов против мышиного Ig, конъюгированной с пероксидазой хрена, в качестве вторичного антитела. O.D. (оптическую плотность) образцов определяют детекцией планшетов на спектрофотометре (Flow) при длине волны 405.

Результаты

Идентификация icIL-1ral

Специфические олигонуклеотидные праймеры разрабатывают (указаны как IRA 1 и IRA 4 на Фиг.1) для получения полной кодирующей последовательности icIL-1ra (Фиг.1) с помощью RT-PCR. Амплифицированные продукты из ПМН человека субклонируют и секвенируют.

Дополнительно к ранее известной последовательности icIL-1ra изобретатель выделяет ряд клонов, последовательности которых идентичны опубликованной кодирующей последовательности icIL-1ra при важном исключении, которое составляет дополнительная последовательность из 63 пар оснований между нуклеотидами 132 и 133 последовательности icIL-1ra. С помощью описанных экзон-интронных связей icIL-1ra дополнительную последовательность вводят между первым безлидерным экзоном icIL-1ra и внутренним акцепторным сайтом первого экзона sIL-1ra (Фиг.1).

На Фиг.1 представлена рассчитанная аминокислотная последовательность. Новый белок (далее называемый icIL-1ra типа II) имеет первые три аминокислоты на NH<sub>2</sub>-конце как у классического icIL-1ra (icIL-1ra типа I), за которыми следует новая последовательность из 21 аминокислоты. Остальные части у двух белков идентичны.

Любопытно, что связывание с внутренним акцепторным сайтом первого экзона sIL-1ra всегда дает как у sIL-1ra, так и у icIL-1ral и icIL-1ral, остаток одной и той же аминокислоты, например глутаминовой кислоты (Фиг.1).

Наиболее удивительной характеристикой вставленной аминокислотной дополнительной последовательности является наличие семи остатков глицина, шесть из которых являются последовательными. Остатки глицина фланкированы с обеих сторон остатками глутаминовой кислоты. icIL-1ral состоит из 180 аминокислот.

В целом гидрофильный образец icIL-1ral близок к таковому icIL-1ral, но не имеет гидрофобного лидерного пептида на NH<sub>2</sub>-конце.

Экспрессия icIL-1ral

Для идентификации транскриптов icIL-1ral проводят анализ RT-PCR с парой специфически созданных олигонуклеотидов (IRA 5 и IRA 4, Фиг.1) с ожидаемым амплифицированным продуктом из 33 пар оснований.

Как показано на Фиг.2, транскрипты, кодирующие icIL-1ral, определяют в PMA-, IL-1- и TNF-активированных фибробластах. Слабый, но поддающийся определению бэнд отмечен в моноцитах, обработанных LPS.

ПМН, как обработанные, так и необработанные, (Фиг.2) также имеют очень слабый бэнд ожидаемого размера.

Специфичность амплифицированных продуктов, показанная на Фиг.2, подтверждают субклонированием и секвенированием.

Экспрессия рекомбинантного icIL-1ral

Клетки COS трансфицируют последовательностью DNA, кодирующей icIL-1ral, и, для сравнения, последовательностью, кодирующей icIL-1ral. Затем клеточные лизаты и супернатанты исследуют вестерн-блоттингом.

Поликлональные антисыворотки, используемые в этих экспериментах, одинаково хорошо распознают icIL-1ral и icIL-1ral (Фиг.3). Большинство, если не все, icIL-1ral и icIL-1ral обнаруживают в клеточных лизатах.

Рекомбинантный icIL-1ral мигрирует как преобладающий бэнд 22кД, тогда как icIL-1ral имеет массу приблизительно 25кД.

Ингибирование активности IL-1B рекомбинантным icIL-1ral

Рекомбинантный icIL-1ral исследуют на активность ингибирования IL-1. Для этой цели авторы выбирают индуцированную IL-1 экспрессию Е-селектина на эндотелиальных клетках, поскольку этот анализ является чувствительным (определяемая индукция 100пг/мл IL-1 или менее) и быстрым (6 часов инкубации с IL-1).

Лизаты "обманно" трансфицированных клеток COS не приводят к значительному снижению активности IL-1.

icIL-1raII не обладает агонистической активностью.

Как показано на Фиг.4, рекомбинантный icIL-1aII ингибирует доза-зависимым образом активность IL-1.

Эти данные доказывают, что icIL-1raII действительно является ингибитором IL-1.

#### Обсуждение

Изобретатели описывают новую молекулярную форму icIL-1ra. Новую молекулу получают инсерцией 63 пар оснований между первым безлидерным экзоном icIL-1ra и внутренним акцепторным сайтом первого экзона sIL-1ra.

Поскольку полученный белок частично идентичен классическому icIL-1ra, за исключением дополнительной последовательности из 21 аминокислоты, расположенной на NH<sub>2</sub>-конце молекулы, изобретатели предполагают назвать эту новую форму icIL-1ra типа II, считая классическую последовательность icIL-1ra как icIL-1ra типа I.

Эксперименты с использованием RT-PCR показывают, что транскрипты icIL-1raII индуцируются в моноцитах и фибробластах. Рекомбинантный icIL-1raII, экспрессирующийся в клетках COS, имеет среднюю мол. массу приблизительно 25кД и активность ингибирования IL-1, сравнимую с активностью, проявляемой icIL-1raI при экспрессии в тех же экспериментальных условиях.

Транскрипты, кодирующие icIL-1ra и sIL-1ra, получают с одного и того же гена, используя различный сплайсинг. icIL-1ra получают с помощью альтернативного начала транскрипции экзона, введенного во внутренний акцепторный сайт первого экзона, содержащего лидерную последовательность sIL-1ra.

Результаты, полученные изобретателями, предполагают новую организацию гена IL-1ra, при которой дополнительный экзон расположен между первым экзоном классического icIL-1ra и sIL-1ra, соответственно. При использовании этого нового экзона получают полипептидную молекулу, которая при отсутствии сигнального пептида отличается по N-концу от icIL-1raI инсерцией 21 аминокислоты, сохраняя при этом способность ингибировать IL-1.

Использование альтернативного сплайсинга для создания различных молекул IL-1ra представляется регулируемым в высокой степени. Транскрипты icIL-1raII индуцируют с помощью IL-1, TNF и фтороловых эфиров в фибробластах и с помощью LPS - в моноцитах. Обнаружено, что в фибробластах фтороловые эфиры селективно индуцируют транскрипты icIL-1ra, тогда как IL-1 и TNF индуцируют mRNAs как sIL-1ra, так и icIL-1ra. В моноцитах IL-13, увеличивающий транскрипцию как sIL-1ra, так и icIL-1raI, не индуцирует icIL-1raII.

Наконец, ПМН, в которых sIL-1ra и icIL-1ra конститутивно экспрессируются и индуцируются, экспрессируют очень мало транскриптов, как установлено RT-PCR. Более того, эти данные показывают, что механизмы, индуцирующие с помощью различного сплайсинга образование трех форм IL-1ra, регулируются различным образом в ответ на внешние сигналы.

Аминокислотная последовательность описанной здесь дополнительной последовательности удивительна тем, что она содержит семь остатков глицина, шесть из которых расположены последовательно.

Богатые глицином последовательности присутствуют в молекулах с различными биологическими активностями, включая предсердный рецептор натрийуретического клиренса, гомеобокс гена HOX11, промежуточные нити кератинов и ядерные белки, участвующие в связывании цетромера или сплайсинге RNA.

Однако, за исключением остатков глицина, очевидная гомология аминокислотных последовательностей, фланкирующих богатые глицином участки, не обнаружена между этими белками и icIL-1raII.

Система IL-1 демонстрирует необычайный уровень сложности, представленный двумя агонистами, двумя рецепторами, один из которых является ингибитором IL-1, и антагонистом рецептора, для которого могут существовать, по меньшей мере, три различные молекулярные формы, если принять во внимание полученные результаты.

Хотя биологическое значение внутриклеточных форм IL-1ra требует четкого установления, приведенные здесь данные указывают, что альтернативным сплайсингом можно получить две различные формы icIL-1ra с различными N-концами в ответ на выбранные внешние стимулы.

Наличие множественных и сложных уровней контроля IL-1 указывает на абсолютное требование жесткого физиологического контроля воспалительного потенциала этого цитокина.

#### Описание фигур

##### Фигура 1

Последовательность DNA и рассчитанная последовательность белка icIL-1raII в сравнении с классическим icIL-1ra (icIL-1raI) и sIL-1ra.

В верхней части Фигуры 1 показаны последовательности DNA и белка, специфично представленные в sIL-1ra, icIL-1raI и icIL-1raII. В нижней части Фигуры 1 показана последовательность, общая для трех форм IL-1ra.

Полные последовательности каждой молекулы таким образом получают связыванием каждой специфичной части с общей последовательностью. Для ясности, последовательность DNA icIL-1ra начинается с нуклеотида 91 опубликованной 5'-нетранслируемой последовательности, и описаны только 6 пар оснований 3'-нетранслируемой последовательности.

Общая последовательность IL-1ra начинается с внутреннего акцепторного сайта, расположенного в первом экзоне sIL-1ra, соответствующем нуклеотиду 133 полной последовательности icIL-1raI и нуклеотиду 88 полной последовательности sIL-1ra.

Стрелки указывают прямой (IRA 1 и IRA 5) и обратный (IRA 4) олигонуклеотиды, используемые для анализа RT-PCR, как описано в тексте. Олигонуклеотид IRA 5 распознает только DNA icIL-1raII.

##### Фигура 2

Анализ RT-PCR экспрессии icIL-1raII в клетках различных типов

Проводят обратную транскрипцию RNAs фибробластов 8387 (панель A), моноцитов (B) и ПМН (C). Продукты каждой реакции синтеза DNA затем разделяют на два образца, один из которых амплифицируют с олигонуклеотидами IRA 5 (прямой) и IRA 4 (обратный) с целью детекции транскриптов icIL-1raII, а другой амплифицируют с B-актин-специфичными олигонуклеотидами (см. Раздел Материалы и Способы),

Затем амплифицированные продукты исследуют в агарозном геле, окрашенном бромидом этидия. Амплифицированные продукты, соответствующие В-актину, приведены слева от стандарта, а амплифицированные продукты, соответствующие icIL-1raII (справа), указаны стрелкой. Специфичность этих бэндов подтверждают субклонированием и секвенированием.

#### Фигура 3

Вестрен-блоттинг рекомбинантного icDL-1raII

Клеточные лизаты из клеток COS, трансфицированных DNAs, которые кодируют icIL-1raI (2) или icIL-1raII (3) или "пустым" вектором, который не содержит такой DNA (1), исследуют иммуноблоттингом с поликлональными антителами кролика против icIL-1ra. Стандарты молекулярной массы указаны.

#### Фигура 4

Эффекты icIL-1raII на индуцированную EL-1 экспрессию Е-селектина на эндотелиальных клетках

Эндотелиальные клетки обрабатывают 0,1 или 1нг/мл IL-1В человека с или без 25-100нг/мл icIL-1raII или эквивалентными количествами лизатов клеток COS, полученных из клеток, которые "обманно" трансфицированы с помощью пустого вектора, как подробно описано в разделе Материалы и Способы.

Через 6 часов инкубации эндотелиальные клетки исследуют на экспрессию Е-селектина тестом ELISA, который проводят на адгезионных клетках.

Приведенные данные являются процентами индуцированной IL-1 экспрессии Е-селектина относительно контроля.

#### СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

(1) ГЛАВНАЯ ИНФОРМАЦИЯ: (i) ЗАЯВИТЕЛЬ:

(А) НАЗВАНИЕ: APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS HOLDING N.V. (Б) УЛИЦА: 14, JOHN B. GORSIRAMEG

(В) ГОРОД: CURACAO

(Г) СТРАНА: NETHERLANDS ANTILLES

(Д) ПОЧТОВЫЙ КОД (ZIP): HET

(Е) ТЕЛЕФОН: 599-9639300

(Ж) ТЕЛЕФАКС: 599-9614129

(и) ЗАГОЛОВOK ИЗОБРЕТЕНИЯ: АНТАГОНИСТ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 (iii) ЧИСЛО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ: 14

(iv) КОМПЬЮТЕРНАЯ ЧИТАЕМАЯ ФОРМА:

- (A) ТИП НОСИТЕЛЯ: Флоппи диск (дискета)
- (Б) КОМПЬЮТЕР: IBM PC совместимый
- (В) ОПЕРАЦИОННАЯ СИСТЕМА: PC-DOS/MS-DOS
- (Г) ПРОГРАМНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ: Patentin Release #1.0,  
Version #1.30 (EPO)

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO:1:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 25 пар оснований
- (Б) ТИП: нуклеиновая кислота
- (В) КОЛИЧЕСТВО НИТЕЙ МОЛЕКУЛЫ: одна
- (Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: cDNA

(iii) ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ : НЕТ

(iv) АНТИСМЫСЛОВАЯ: НЕТ

(ix) ПРИЗНАК:

- (A) НАЗВАНИЕ/КОД: misc-признак
- (Б) ПОЛОЖЕНИЕ: 1..25
- (В) ДРУГАЯ ИНФОРМАЦИЯ:/заметка= "RT-PCR олигонуклеотид,  
названный IRAS"

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 1:

СТGACCTTGTA TGAAGAAGGA

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 2:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

- (A) ДЛИНА: 20 пар оснований
- (Б) ТИП: нуклеиновая кислота
- (В) КОЛИЧЕСТВО НИТЕЙ МОЛЕКУЛЫ: одна
- (Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: cDNA

(iii) ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ : НЕТ

(iv) АНТИСМЫСЛОВАЯ: НЕТ

(ix) ПРИЗНАК:

- (A) НАЗВАНИЕ/КОД: misc-признак
- (Б) ПОЛОЖЕНИЕ: 1..20

(В) ДРУГАЯ ИНФОРМАЦИЯ:/заметка= "RT-PCR олигонуклеотид,  
соответствующий 60-79 В-актина"

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 2:

GCGCTCGTCTCG TCGAGAACGG

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO:3:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(А) ДЛИНА: 21 пара оснований

(Б) ТИП: нуклеиновая кислота

(В) КОЛИЧЕСТВО НИТЕЙ МОЛЕКУЛЫ: одна

(Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: cDNA

(iii) ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ : НЕТ

(iv) АНТИСМЫСЛОВАЯ: НЕТ

(ix) ПРИЗНАК:

(А) НАЗВАНИЕ/КОД: misc-признак

(Б) ПОЛОЖЕНИЕ: 1..21

(В) ДРУГАЯ ИНФОРМАЦИЯ:/заметка= "RT-PCR обратный  
олигонуклеотид, комплементарный 430-449"

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 3:

GATAGACAAC GTACATGGCT G

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO:4:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(А) ДЛИНА: 87 пар оснований

(Б) ТИП: нуклеиновая кислота

(В) КОЛИЧЕСТВО НИТЕЙ МОЛЕКУЛЫ: одна

(Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: cDNA

(iii) ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ : НЕТ

(iv) АНТИСМЫСЛОВАЯ: НЕТ

(ix) ПРИЗНАК:

(А) НАЗВАНИЕ/КОД: CDS

(Б) ПОЛОЖЕНИЕ: 24..86

(ix) ПРИЗНАК:

(А) НАЗВАНИЕ/КОД: misc-признак



(Б) ПОЛОЖЕНИЕ: 1..87

(В) ДРУГАЯ ИНФОРМАЦИЯ:/заметка= "Последовательность  
sIL-1ra необщая"

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 4:

GAATTCGGGG STGCAGTCAC AGA ATG GAA ATC TGC AGA GGC CTC CGC AGT 50

Met Glu Ile Cys Arg Gly Leu Arg Ser

1

5

CAC STA ATC ACT CTC CTC CTC TTC CTG TTC CAT TCA G 87

His Leu Ile Thr Leu Leu Leu Phe Leu Phe His Ser

10

15

20

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO:5:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(А) ДЛИНА: 21 аминокислота

(Б) ТИП: аминокислота

(Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 5:

Met Glu Ile Cys Arg Gly Leu Arg Ser His Leu Ile Thr Leu Leu Leu

1

5

10

15

Phe Leu Phe His Ser

20

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO:6:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(А) ДЛИНА: 42 пары оснований

(Б) ТИП: нуклеиновая кислота

(В) КОЛИЧЕСТВО НИТЕЙ МОЛЕКУЛЫ: одна

(Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: cDNA

(iii) ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ : НЕТ

(iv) АНТИСМЫСЛОВАЯ: НЕТ

(ix) ПРИЗНАК:

(А) НАЗВАНИЕ/КОД: CDS

(Б) ПОЛОЖЕНИЕ: 33..41

(ix) ПРИЗНАК:

(A) НАЗВАНИЕ/КОД: misc-признак

(Б) ПОЛОЖЕНИЕ: 1..42

(В) ДРУГАЯ ИНФОРМАЦИЯ:/заметка= "Последовательность  
внутриклеточного IL-1ra типа I необщая"

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 6:

CAGAAGACCT CCTGTCCTAT GAGGCCCTCC CC ATG GCT TTA G

42

Met Ala Leu

1

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO:7:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 3 аминокислоты

(Б) ТИП: аминокислота

(Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 7:

Met Ala Leu

1

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO:8:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) ДЛИНА: 105 пар оснований

(Б) ТИП: нуклеиновая кислота

(В) КОЛИЧЕСТВО НИТЕЙ МОЛЕКУЛЫ: одна

(Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: cDNA

(iii) ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ : НЕТ

(iv) АНТИСМЫСЛОВАЯ: НЕТ

(ix) ПРИЗНАК:

(A) НАЗВАНИЕ/КОД:CDS

(Б) ПОЛОЖЕНИЕ: 33..104

(ix) ПРИЗНАК:

(A) НАЗВАНИЕ/КОД: misc-признак

(Б) ПОЛОЖЕНИЕ: 1..105

(В) ДРУГАЯ ИНФОРМАЦИЯ:/заметка= "Последовательность

**внутриклеточного IL-1 $\alpha$  типа II необщая”**

**(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 8:**

```

CAGAAGACCT CCTGTCCTAT GAGGCCCTCC CC ATG GCT TTA GCT GAC TTG TAT 53
                                Met Ala Leu Ala Asp Leu Tyr
                                1           5
GAA GAA GGA GGT GGA GGA GGA GAA GGT GAA GAC AAT GCT GAC TCA 101
Glu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Glu Gly Glu Asp Asn Ala Asp Ser
      10           15           20
AAG G 105
Lys

```

**(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO:9:**

**(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:**

(А) ДЛИНА: 24 аминокислоты

(Б) ТИП: аминокислота

(Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

**(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: белок**

**(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 9:**

```

Met Ala Leu Ala Asp Leu Tyr Glu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Glu
  1           5           10           15
Gly Glu Asp Asn Ala Asp Ser Lys
      20

```

**(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO:10:**

**(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:**

(А) ДЛИНА: 474 пары оснований

(Б) ТИП: нуклеиновая кислота

(В) КОЛИЧЕСТВО НИТЕЙ МОЛЕКУЛЫ: одна

(Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

**(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: cDNA**

**(iii) ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ : НЕТ**

**(iv) АНТИСМЫСЛОВАЯ: НЕТ**

**(ix) ПРИЗНАК:**

(А) НАЗВАНИЕ/КОД: CDS

(Б) ПОЛОЖЕНИЕ: 1..468

**(ix) ПРИЗНАК:**

27

(А) НАЗВАНИЕ/КОД: misc-признак

(Б) ПОЛОЖЕНИЕ: 1..474

(В) ДРУГАЯ ИНФОРМАЦИЯ:/заметка= “Общая IL-1 $\alpha$  посл.; G был присоединен в первом положении по причине программного обеспечения, так что первый кодон кодирует Glu и так что возникновение терминирующего кодона во внутреннем регионе посл. исключается”

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 10:

```
GAG ACG ATC TGC CGA CCC TCT GGG AGA AAA TCC AGC AAG ATG CAA GCC 48
Glu Thr Ile Cys Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys Met Gln Ala
1 5 10 15
TTC AGA ATC TGG GAT GTT AAC CAG AAG ACC TTC TAT CTG AGG AAC AAC 96
Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Asn
20 25 30
CAA CTA GTT GCT GGA TAC TTG CAA GGA CCA AAT GTC AAT TTA GAA GAA 144
Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn Leu Glu Glu
35 40 45
AAG ATA GAT GTG GTA CCC ATT GAG CCT CAT GCT CTG TTC TTG GGA ATC 192
Lys Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe Leu Gly Ile
50 55 60
CAT GGA GGG AAG ATG TGC CTG TCC TGT GTC AAG TCT GGT GAT GAG ACC 240
His Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly Asp Glu Thr
65 70 75 80
AGA CTC CAG CTG GAG GCA GTT AAC ATC ACT GAC CTG AGC GAG AAC AGA 288
Arg Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser Glu Asn Arg
```

	85		90		95	
AAG CAG GAC AAG CGC TTC GCC TTC ATC CGC TCA GAC AGT GGC CCC ACC						336
Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser Gly Pro Thr						
	100		105		110	
ACC AGT TTT GAG TCT GCC GCC TGC CCC GGT TGG TTC CTC TGC ACA GCG						384
Thr Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Ala						
	115		120		125	
ATG GAA GCT GAC CAG CCC GTC AGC CTC ACC AAT ATG CCT GAC GAA GGC						432
Met Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro Asp Glu Gly						
	130		135		140	
GTC ATG GTC ACC AAA TTC TAC TTC CAG GAG GAC GAG TAGTAC						474
Val Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu						
145						

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO:11:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(А) ДЛИНА: 156 аминокислот

(Б) ТИП: аминокислота

(Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 11:

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

Thr Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Ala  
 115 120 125  
 Met Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro Asp Glu Gly  
 130 135 140  
 Val Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu  
 145 150 155

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO:12:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(А) ДЛИНА: 21 аминокислота

(Б) ТИП: аминокислота

(В) КОЛИЧЕСТВО НИТЕЙ МОЛЕКУЛЫ:

(Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: пептид

(iii) ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ : НЕТ

(iv) АНТИСМЫСЛОВАЯ: НЕТ

(v) ТИП ФРАГМЕНТА: N-концевой

(ix) ПРИЗНАК:

(А) НАЗВАНИЕ/КОД: Пептид

(Б) ПОЛОЖЕНИЕ: 1..21

(В) ДРУГАЯ ИНФОРМАЦИЯ:/заметка= "Часть внутриклеточного  
 IL-1ra вне общей"

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 12:

Ala Asp Leu Tyr Glu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Glu Asp  
 1 5 10 15  
 Asn Ala Asp Ser Lys  
 20

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO:13:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(А) ДЛИНА: 579 пар оснований

(Б) ТИП: нуклеиновая кислота

(В) КОЛИЧЕСТВО НИТЕЙ МОЛЕКУЛЫ: одна

(Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: cDNA

(iii) ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ : НЕТ

(iv) АНТИСМЫСЛОВАЯ: НЕТ

(ix) ПРИЗНАК:

(А) НАЗВАНИЕ/КОД: CDS

(Б) ПОЛОЖЕНИЕ: 34..573

(ix) ПРИЗНАК:

(А) НАЗВАНИЕ/КОД: misc-признак

(Б) ПОЛОЖЕНИЕ: 1..579

(В) ДРУГАЯ ИНФОРМАЦИЯ:/заметка= "Внутриклеточный  
 IL-1ra типа II"

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 13:

CAGAAGGACC TCCTGTCCTA TGAGGCCCTC CCC ATG GCT TTA GCT GAC TTG TAT 54  
Met Ala Leu Ala Asp Leu Tyr  
1 5  
GAA GAA GGA GGT GGA GGA GGA GAA GGT GAA GAC AAT GCT GAC TCA 102  
Glu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Glu Gly Glu Asp Asn Ala Asp Ser  
10 15 20  
AAG GAG ACG ATC TGC CGA CCC TCT GGG AGA AAA TCC AGC AAG ATG CAA 150  
Lys Glu Thr Ile Cys Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys Met Gln  
25 30 35  
GCC TTC AGA ATC TGG GAT GTT AAC CAG AAG ACC TTC TAT CTG AGG AAC 198  
Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu Arg Asn  
40 45 50 55  
AAC CAA CTA GTT GCT GGA TAC TTG CAA GGA CCA AAT GTC AAT TTA GAA 246  
Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn Leu Glu  
60 65 70  
GAA AAG ATA GAT GTG GTA CCC ATT GAG CCT CAT GCT CTG TTC TTG GGA 294  
Glu Lys Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe Leu Gly  
75 80 85  
ATC CAT GGA GGG AAG ATG TGC CTG TCC TGT GTC AAG TCT GGT GAT GAG 342  
Ile His Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly Asp Glu  
90 95 100  
ACC AGA CTC CAG CTG GAG GCA GTT AAC ATC ACT GAC CTG AGC GAG AAC 390  
Thr Arg Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser Glu Asn  
105 110 115

AGA AAG CAG GAC AAG CGC TTC GCC TTC ATC CGC TCA GAC AGT GGC CCC 438  
 Arg Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser Gly Pro  
 120 125 130 135  
 ACC ACC AGT TTT GAG TCT GCC GCC TGC CCC GGT TGG TTC CTC TGC ACA 486  
 Thr Thr Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr  
 140 145 150  
 GCG ATG GAA GCT GAC CAG CCC GTC AGC CTC ACC AAT ATG CCT GAC GAA 534  
 Ala Met Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro Asp Glu  
 155 160 165  
 GGC GTC ATG GTC ACC AAA TTC TAC TTC CAG GAG GAC GAG TAGTAC 579  
 Gly Val Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu  
 170 175 180

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO:14:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(А) ДЛИНА: 180 аминокислот

(Б) ТИП: аминокислота

(Г) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) ТИП МОЛЕКУЛЫ: белок

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO: 14:

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