

PETITORIO



02 113247 C

Radicación : 02113247 00000000 Folios: 70
 Fecha (Año): 2002-12-13 16:25:55
 Trámite : 011 PCT-PATENT 378 FASE NDCI 411 PRESENTIN
 Dependencia: 2920 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
 ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE:

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☒

Capítulo I

☐

Capítulo II

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION**

Dirección: One Franklin Plaza

Nacionalidad o domicilio: Filadelfia, Estado de Pennsylvania, E.U.A.

Lugar de Constitución: Estado de Pennsylvania

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: **GERMAN CASTILLO GRAU**

Dirección: Carrera 13 No. 37-43 Piso 12

Teléfono: 285 7460 Fax: 28 9267

E-mail info@castillograu.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ OTRO ☐

Cual

Número 17'017.671 TP 2.978

4

INVENTOR(ES)
(72)

Nombre: Kyung O, Johanson, Robert B. Kirkpatrick, Allan R. Shatzman, Yen Sen Ho, Patrick McDevitt

Dirección 709 Swedeland Road (excepto Yen Sen Ho)
362 Old State Road

Nacionalidad o Domicilio: King of Prussia, Pennsylvania, E.U.A.

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US01/18804Fecha: Junio 11, 2001Publicación Internacional No. WO 01/98455 A2Fecha: Diciembre 27, 2001

6

Título (54)

METODO PARA PREPARAR UN POLIPEPTIDO IL-18 FISIOLÓGICAMENTE
ACTIVO

7

Clasificación Internacional (51) C12N 15/10

8

Prioridad

Si

☒

No

☐

(33) País de origen

E.U.A.

E.U.A.

E.U.A.

(32) Fecha

Junio 15, 2000

Ago. 10, 2000

Enero 30, 2001

(31) Número de Solicitud

80/211,832

60/224,128

60/264,923

9

Comprobante de pago N°:

83966 y 83967

Fecha:

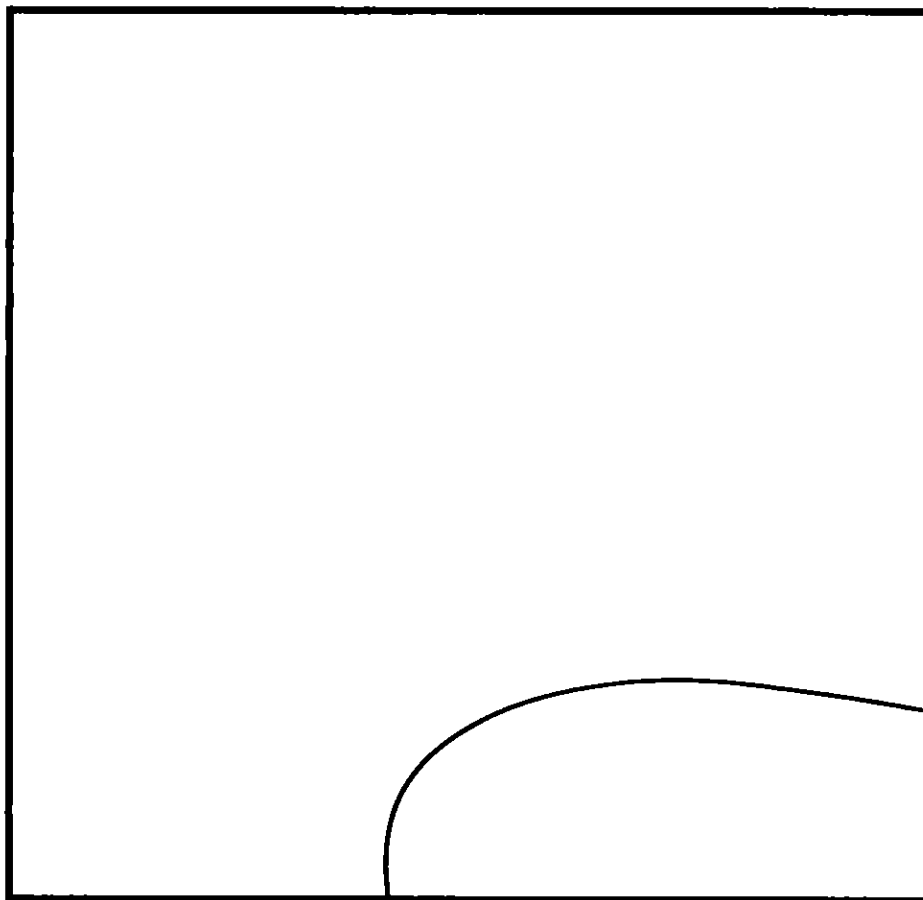
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso No. 15.479
- ☒ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Documento de Cesión del Inventor al solicitante o a su acusante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud Internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito de material biológico.
- ☐ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ Otros

11 FIGURA CARACTERISTICA



12 Solicito la concesión de patente,

NOMBRE: GERMAN CASTILLO GRAU

FIRMA: _____

C.C. 17'017.671
de BogotáT.F No. 2978
del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página



3

Industria y Comercio

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 02113247 00000000

Folios: 70

DENENCIA

Fecha (AMD): 2002-12-13 16:25:35

Trámite : 011 PCT-PATENT 370 FASE NACI 411 PRESENTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONESRECIBO OFICIAL DE CAJA : 02 - 83,766
FECHA : DICIEMBRE 13 DE 2002

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PASO	BANCO	CUENTA	No. PASO	FECHA PASO	Vr. PASO
CASTILLO BRAU Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	2981275	13/12/2002	537,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. CONTABILITICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	379,000.00
	TOTAL :	\$ 379,000.00

SON: TRESCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia



4

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

MIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 02 - 83,767
FECHA : DICIEMBRE 13 DE 2002

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PASO	BANCO	CUENTA	No. PASO	FECHA PGO	Vr. PASO
CASTILLO GRAU Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	2981275	13/12/2002	537,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	02 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN NU	106,000.00
	TOTAL :	\$ 106,000.00

SON: CIENTO SEIS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

MÉTODO PARA PREPARAR UN POLIPÉPTIDO IL-18 FISIOLÓGICAMENTE ACTIVO

IX
5

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un proceso para producir un polipéptido fisiológicamente activo, más especialmente, a un proceso para producir IL-18 humano activo.

IL-18, conocido también como un factor inductor de interferón- γ , es una novedosa citoquina descubierta hace poco. El IL-18 activo contiene 157 residuos de aminoácidos; tiene potentes actividades biológicas, incluida la inducción de la producción del interferón- γ por células T y esplenocitos, mejoramiento de la actividad destructora de células NK y promoción de la diferenciación de células CD4+ simples en células Th1. Además, el IL-18 humano aumenta la producción de GM-CSF y disminuye la producción de IL-10. IL-18 ha demostrado tener mayores capacidades de inducción del interferón- γ que el IL-12, envía señales por medio de un receptor diferente y utiliza un trayecto distinto para la transducción de señales.

Se conoce el IL-18, la secuencia nucleótida codificador y algunas propiedades químicas y fisicoquímicas de la proteína purificada (Ushio S. y colab. 1996, *J. Immunology*, 156, 4274-4279; Dinarello, C.A. y colab. 1998, *J. Leukocyte Biology*, 1998, 63, 658-664).

La publicación de Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kayaku Kenkyujo ("Hayashibara"), Patente estadounidense 5,192,324 la cual corresponde a la EP 0892536 publicada el 17 de enero de 1996, divulga una proteína de ratón que induce la producción gamma IFN por células inmunocompetentes; la proteína se caracteriza además por tener ciertas propiedades fisicoquímicas y una secuencia aminoácida parcial definida. También se divulga una proteína que tiene una secuencia 157 aa, dos fragmentos de la misma, ADN (471 bp) que codifica la proteína, hibridomas, métodos de purificación de la proteína y métodos para detectar la proteína.

La patente estadounidense 6,214,584 de Hayashibara, que corresponde a la EP 0712931, publicada el 22 de mayo de 1996, divulga una proteína humana de

157 aminoácidos y homólogos de la misma, ADN que codifica la proteína, transformantes, procesos para preparar la proteína, anticuerpos monoclonales contra la proteína, hibridomas, métodos de purificación de la proteína, métodos para detectar la proteína y métodos de tratamiento y/o prevención de tumores malignos, enfermedades virales, enfermedades bacterianas infecciosas y enfermedades inmunes.

La patente WO 97/24441 de Incyte Pharmaceuticals, Inc, publicada el 10 de julio de 1997, divulga una proteína de 193 aminoácidos correspondiente al precursor IL-18 y que codifica ADN.

En células humanas, los polipéptidos formados por la expresión de genes pueden ser procesados por enzimas intracelulares para que sean digeridos parcialmente y reciban cadenas de azúcares. Polipéptidos que sean incorporados satisfactoriamente en fármacos pueden ser aquellos procesados de igual forma que en las células humanas. Se sabe que la mayoría de las citoquinas son producidas normalmente como precursores sin actividad biológica, y luego procesadas por enzimas intracelulares para ser convertidas en polipéptidos activos.

Usualmente, el polipéptido IL-18 existe en las células humanas en la forma de un precursor de 193 aminoácidos y sin ninguna actividad biológica. El precursor IL-18 también se conoce como Pro-IL-18. La Patente US 5,879,942 de Hayashibara, la cual corresponde a la EP 0819757 publicada el 21 de enero de 1998, enseña un método para producir IL-18 activo de su precursor. La patente divulga una enzima o proteína que convierte un precursor de IL-18 en IL-18 activo.

Otro método para producir IL-18 activo de su precursor lo enseña la Patente US 5,891,663 de Hayashibara, la cual corresponde a la EP 0821005, publicada el 28 de enero de 1998. La patente divulga contactar el precursor IL-18 con la enzima convertidora interleukin-1 β ("ICE"). Las enseñanzas de las patentes y referencias se incorporan en este contexto por referencia.

La función de la ICE como mediadora de apoptosis e inflamación ha sido estudiada ampliamente en la literatura. Se sabe también que la ICE puede procesar precursores tanto de formas activas de Interleukin-1 como de Interleukin-18 (Thomberry, NA y colab. 1992, *Nature* 356, 768-774; Chayur y colab. 1997 *Nature* 386, 619-623)

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención provee métodos para la activación *in vitro* del precursor de IL-18 humano (conocido también como Pro-IL-18) con una enzima activadora que consiste en contactar el precursor humano IL-18 con una enzima activadora, tal como caspasa 4 o caspasa 5. Más específicamente, la presente invención provee un método mediante el cual caspasa 4 y caspasa 5 actúan sobre un precursor de IL-18 para separar un sitio específico y producir un polipéptido activo que induzca la producción de IFN- γ en células inmunocompetentes.

La presente invención provee además métodos para la activación *in vivo* del precursor de IL-18 humano que consiste en co-expresar la proteína con una proteasa activadora. Más específicamente, la presente invención provee métodos para la activación *in vivo* de IL-18 usando proteasa tal como caspasa 4, también conocida como ICE_{RELII}, caspasa 5, también conocida como ICE_{RELIII}, y proteasa específica de ubiquitina, que actúa en un precursor del polipéptido IL-18 para convertirlo en un polipéptido activo que induzca la producción de IFN- γ .

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS A DJUNTOS

La FIGURA 1 muestra la secuencia aminoácida del precurso humano IL-18 (SEQ ID NO:1)

La FIGURA 2 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica el precursor humano IL-18 de longitud completa (SEQ ID NO:2)

La FIGURA 3 muestra la secuencia aminoácida del IL-18 humano activo (SEQ ID NO:3)

La FIGURA 4 muestra la secuencia aminoácida de la caspasa 4 truncada de terminal N indicador 6-his (SEQ ID NO:4).

La FIGURA 5 muestra la secuencia aminoácida que codifica la secuencia aminoácida de la caspasa 4 truncada de termina N, indicador 6-his (SEQ ID NO:5)

La FIGURA 6 muestra la secuencia aminoácida de la caspasa 5 truncada de terminal N indicador 6-his (SEQ ID NO:6)

La FIGURA 7 muestra la secuencia aminoácida que codifica la secuencia aminoácida de la caspasa 5 truncada de terminal N indicador 6-his (SEQ ID NO:7)

La FIGURA 8 es un diagrama esquemático de un casete de expresión bicistrónica contenida dentro de pET28-ProIL-18/Casp 4 para la co-expresión de Pro-IL-18 y caspasa 4 truncada en *E. coli*.

La FIGURA 9 muestra una secuencia del casete de expresión Pro-IL-18/Caspasa 4 dentro de pET28 (SEQ ID NO:8).

La FIGURA 10 muestra la secuencia anotada del casete de expresión de Pro-IL-18/Caspasa 4. La numeración corresponde a la posición dentro del vector pET28a.

La FIGURA 11 muestra la inducción de Pro-IL-18/Caspasa 4.

La FIGURA 12 es un diagrama esquemático del casete de expresión bicistrónica contenido dentro de pET28-Pro-IL-18/caspasa 5 truncada para co-expresión de Pro-IL8 y Caspasa 5 en *E. coli*.

La FIGURA 13 muestra una secuencia del casete de expresión Pro-OL-18/Caspasa 5 dentro de pET28 (SEQ ID NO:9)

La FIGURA 14 muestra el diagrama de la secuencia anotada del casete de expresión de Pro-IL-18/caspasa-5 truncada que describe las funciones reguladoras de la secuencia y la translación de Pro-IL-18 y I CASPASA-5 TRUNCADA. La numeración corresponde al posicionamiento dentro del vector pET28a.

La FIGURA 15 muestra la inducción de Pro-IL-18/Caspasa 5.

La FIGURA 16 muestra la secuencia aminoácida de Ub-IL-18 (SEQ ID NO:10)

La FIGURA 17 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia aminoácida de Ub-IL-18 (SEQ ID NO:11).

La FIGURA 18 muestra el casete de expresión de la secuencia de ácido nucleico de Ub-IL-18/Ubp dentro del vector pET28 (SEQ ID NO:12)

La FIGURA 19 muestra la secuencia anotada de Ub-IL-18/Ubp-1 dentro del vector pTE28. La numeración corresponde a la posición dentro de pET28.

La FIGURA 20 muestra la expresión de UB-IL-18 y procesamiento por Ubp-1.-

La FIGURA 21 muestra el ensayo de la actividad IL-18 usando células KG-1 (línea celular mielomonocítica humana) y monitorea la producción de IFN- γ . (según se indica, IL-18 se expresa de varias formas como se indica)

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La caspasa 4 y la caspasa 5 son miembros de una familia de proteasas de cisteína que incluyen la enzima convertidora Interleukin-1 β (ICE), la cual preferencialmente separa sustratos que contengan un motivo de activación de proteasa que comprende las secuencias aminoácidas XEYD, en donde X es seleccionado de un grupo de aminoácidos consistentes de W, L, F, Y, I, V, D o E; E es ácido glutámico; Y es seleccionado del grupo de aminoácidos compuestos por H, I, A, T, S P o E; y D es ácido aspártico (Munday, N.A. y colab. 1995, *J. Biol. Chemistry*, 270, 15870-15876; Talanian R.V. y colab. 1997, *J. Biol. Chemistry* 272, 9677-82; Thornberry, N.A. y colab. 1997 *J. Biol. Chemistry* 272, 17907-11). Se cree que el reconocimiento de sustrato de caspasa-5 es esencialmente el mismo que para ICE y caspasa-4 y distinto de otros miembros de la caspasa (Talanian, R.V. y colab. 1997, *J. Biol. Chemistry* 272, 9677-82; Thornberry, N.A. y colab. 1997 *J. Biol. Chemistry* 272, 17907-11). La patente EP-B-0-754 234 divulga la caspasa-4. Las patentes US 5,552,536 y US 5,760,180 divulgan la caspasa-5.

Las proteasas específicas de ubiquitina son una familia de enzimas independientes de ATP que pueden separar con precisión el péptido de ubiquitina evolucionariamente conservado de 76 aminoácidos de la terminal N de las proteínas que están fusionadas al mismo. Estas proteasas separan específicamente el enlace péptido entre el residuo aminoácido de terminal carboxilo de una proteína de ubiquitina y el grupo α -amino de cualquier proteína que no sea de ubiquitina a la cual esté ligada la ubiquitina. Se conocen proteasas específicas de ubiquitina de *Saccharomyces cerevisiae*, Ubp1, Ubp-2 y Ubp-3, por ejemplo, y éstas pueden ser expresadas en forma recombinante para catalizar las reacciones de desubiquitinación que dirigen las proteínas de fusión de ubiquitina, tanto *in vivo* como *in vitro* (Baker, RT y colab. *J. Biol. Chem.* 267: 23364-23375; Baker, RT y colab. 1994, *J. Biol. Chem.* 269: 25381-25386). La especificidad de

las proteasas específicas de ubiquitina *Saccharomyces cerevisiae*, permiten la remoción precisa de ubiquitina de cualquier péptido con la excepción de los que comienzan con prolina. La proteasa específica de ubiquitina de otras especies tales como ratón Unp y su homóloga humana, Unph, pueden hacer una separación eficiente, aún frente a prolina (Gilchrist CA y colab. 1997 *J. Biol. Chem.* 272:32280-32285). Por ello, prácticamente se puede generar cualquier terminal N no deseado mediante la remoción de un péptido de ubiquitina fusionado precisamente, en combinación *in vitro* o coexpresada con proteasas específicas de ubiquitina. Las patentes U.S. 5,212,058; US.5,683,904; U.S. 5,391,490, y U.S. 5,494,818.

En la presente invención se puede usar cualquier caspasa 4, caspasa 5 o proteasa de ubiquitina producida natural y artificialmente, siempre y cuando produzcan polipéptidos activos que induzca la producción del interferón (IFN) γ en células inmunocompetentes independientemente de sus estructuras, fuentes y orígenes.

En las células humanas, se pueden procesar los polipéptidos formados por la expresión de genes por enzimas intracelulares. Las enzimas intracelulares mediante enzimas separan las proteínas precursoras, como la Pro-IL-18 en su forma activa. Para que los polipéptidos se incorporen satisfactoriamente en los fármacos deben recibir un procesamiento similar a los que los polipéptidos de procesamiento reciben en las células humanas. Normalmente, los polipéptidos existen en las células humanas en forma de precursores y sin ninguna actividad biológica. Se sabe que la mayoría de las citoquinas, incluido el polipéptido IL-18, son producidas normalmente como precursores sin ninguna actividad biológica, y luego procesadas por enzimas intracelulares para ser convertidas en polipéptidos activos.

El precursor de IL-18 tal como se refiere en la presente invención, existe por ejemplo, en células que inherentemente producen el polipéptido, en células mamarias anfitrionas y en el sistema bacteriano, como *E. coli*, transformadas mediante la introducción de un ADN, por ej: un ADN con la secuencia nucleótida de SEQ ID NO:2, que contiene un región que codifica el polipéptido. Con el uso de dichas células mamarias y bacterianas anfitrionas, el precursor IL-18 puede ser co-expresado con proteasas para generar el IL-18 activo.

Separación *in vitro*

La presente invención provee métodos para la activación *in vitro* de un polipéptido precursor, tal como el precursor de IL-18, que consiste en contactar el polipéptido precursor con una enzima de activación.

En una realización preferida, la presente invención provee un método para la activación *in vitro* del precursor de IL-18 humano, que consiste en contactar el precursor humano IL-18 con caspasa 4 o caspasa 5.

En una realización preferida, el precursor de IL-18 es activado *in vitro* mediante separación con la enzima de activación la cual reconoce un motivo de activación de proteasa específica que comprende la secuencia aminoácida XEYD, en donde X es seleccionado de un grupo de aminoácidos consistentes en W, L, F, Y, I, V, D o E; y Y es seleccionado del grupo de aminoácidos consistentes en H, I, A, T, S, P o E.

En otra realización preferida, el precursor de IL-18 es activado *in vitro* mediante separación del enlace de péptidos entre ácido aspártico 36 y tirosina 37 en la SEQ ID NO:1 con caspasa 4 o caspasa 5 para producir un polipéptido activo que induce la producción de IFN- γ en células inmunocompetentes.

Generalmente, la caspasa 4 o la caspasa 5 se puede obtener de células, que inherentemente la producen, y obtenerse los transformantes mediante la aplicación de tecnología recombinante ADN. Ejemplos de este tipo de células que se establecieron de células mamíferas y humanas, tales como células epiteliales, células endoteliales, células intersticiales, células cartílagos, monocitos, granulocitos, linfocitos y líneas celulares establecidas de las mismas. Ejemplos de los transformantes incluyen microorganismos transformados y células animales obtenidas mediante la introducción de una caspasa 5 codificadora de ADN en microorganismos y células animales. La caspasa 4 o la caspasa 5 se prepara cultivando estos transformantes en medios de cultivo convencionales utilizados en este campo, bien sea tratándolos con ultrasónica en forma de cultivos intactos o luego de separarlos de los cultivos, o remojando los transformantes en solventes hipotónicos, aplicando a la célula resultante desechos o mezclas que contengan sobrenadantes de cultivo y desechos de células, las siguientes técnicas convencionales utilizadas para purificar las enzimas en este campo; salación, diálisis, filtración, concentración, sedimentación separadora, cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de filtración de gel, cromatografía de

adsorción, cromatografía isoelectrica, cromatografía hidrofóbica, cromatografía de fase inversa, cromatografía de afinidad, electroforesis de gel y enfoque isoelectrico. Se pueden utilizar dos o más de estos métodos en combinación. En la técnica se conoce la caspasa 4 que codifica ADN (FIGURA 5) (SEQ ID NO:5) y la caspasa 5 (FIGURA 7) (SEQ ID NO:7) y los transformantes que producen la caspasa 4 y la caspasa 5. Por ejemplo, las enzimas se pueden producir en forma activa en *E. coli* mediante la expresión de péptidos truncados de terminal N a los que le falta la región Pro, según lo describe (Munday NA y colab. 1996 J. Biol. Chem 26:15870-76).

Las células que producen el polipéptido precursor, tal como el Pro-IL-18, inherentemente o aquellas que fueron transformadas para producir el precursor, son cultivadas en medios de cultivo nutrientes. Los medios de cultivo preferidos incluyen medios de cultivo conocidos en la técnica, tal como el medio *Luria-Bertani* u otro medio rico para cultivo de *E. coli* que comprende triptona y extracto de levadura.

La caspasa 4 o la caspasa 5 que se obtiene por el método anterior, se deja que coexista en los cultivos resultantes o se agregan a las mezclas resultantes o desechos celulares luego de interrumpir las células proliferadas separadas o no separadas de los cultivos. La cantidad de caspasa 4 o de caspasa 5 requerida es menor que el equimolar del precursor. La caspasa 4 o la caspasa 5 es contactada con el precursor a temperaturas y pHs que permiten que la caspasa 4 o la caspasa 5 actúe en el precursor, normalmente, se deja que la caspasa 4 o la caspasa 5 reaccione con el precursor hasta que se forme la cantidad deseada del polipéptido activo del material precursor, a temperaturas entre 4° y 40° y pH entre 6 y 9. La temperatura preferida es de aproximadamente 25°C y el pH preferido es de 7.2. De este modo se obtienen las mezclas de reacción que contienen el polipéptido activo.

La actividad de caspasa 4 o caspasa 5 puede ensayarse y expresarse por unidades para actividad según el polipéptido procesado µg producido por la caspasa 4 o caspasa 5 µg por minuto.

Co-expresión *In Vivo*

La presente invención además provee métodos para la activación *in vivo* de un polipéptido precursor, tal como un precursor IL-18 que consiste en co-expresar la proteína con una proteasa de activación. Más específicamente, la presente

invención provee métodos para la activación *in vivo* de IL-18 que comprende la co-expresión bicistónica de polipéptidos, como el IL-18, con proteasa tal como caspasa 4, también conocida como ICE_{RELII}, caspasa 5, también conocida como ICE_{RELI}, y ubiquitina.

En una realización preferida, la caspasa 4 humana, también conocida como ICE_{RELII} es co-expresada bicistónicamente con Pro-IL-18 humano para permitir el procesamiento *in vivo* de Pro-IL-18 en IL-18 activo.

En otra realización preferida, la caspasa 4 humana truncada (SEQ ID NO:4) es co-expresada bicistónicamente con Pro-IL-18 humano para permitir el procesamiento *in vivo* de Pro-IL-18 (SEQ ID NO:1) en IL-18 activo (SEQ ID NO:3)

En otra realización preferida, la caspasa 5 humana, también conocida como ICE_{RELI}, es co-expresada bicistónicamente con Pro-IL-18 humano para permitir el procesamiento *in vivo* de Pro-IL-18 en IL-18 activo (SEQ ID NO:3)

Aún en otra realización preferida, la proteasa 1 de ubiquitina (Ubp-1) es co-expresada bicistónicamente con Ubiquitina-IL-18 (Ubp-IL-18) para el procesamiento *in vivo* de Ub-ILK-18 en IL-18 activo.

Aún en otra realización preferida, la proteasa 1 ubiquitina (Ubp-1) es co-expresada bicistónicamente con Ubiquitina-IL-18 (Ubp-IL-18) para el procesamiento *in vivo* de UB-IL-18 (SEQ ID NO:9) en IL-18 activo (SEQ ID NO:3).

En la realización más preferida, la caspasa 5 humana truncada (SEQ ID NO:5) es co-expresada bicistónicamente con Pro-IL-18 humano para permitir el procesamiento *in vivo* de Pro-IL-18 (SEQ ID NO:1) en IL-18 activo (SEQ ID NO:3)

Una caspasa 4 o caspasa 5 que codifique ADN y un ADN que codifique u precursor del polipéptido son introducidos en una célula anfitriona bacteriana o mamífera apropiada para transformarla. En este caso, caspasa 4 o caspasa 5, formada por la expresión de ADN actúa en un precursor del polipéptido, formado por la expresión ADN en el mismo transformante, para formar un polipéptido activo (Figuras 11 y 15). Las células anfitrionas preferidas son epidérmicas-, intersticiales-, neuroblastos, líneas de células hematopoiéticas, las cuales son derivadas de seres humanos, monos, ratones y hamsters y son utilizadas convencionalmente como anfitriones, tal como las células 3T3 incluidas las células 3TS Suizo albinas (TCC CCL 92), células C1271 (ATCC CRL 1616), células CHO incluidas células CHO-K1 (ATCC CCL 81), células CV-1 (TCC CCL 70), células

3
X
14

COS incluidas células COS-1 (ATCCF CCL 1650), células HeLa (ATCC CCL 2), células MOP incluidas células MOP-8 (ATCC CRL 1709) y mutantes de las mismas. Las células anfitrionas más preferidas con *E. coli*. El método más preferido es introducir caspasa 4 ó 5 que codifique ADN y un ADN que codifique un precursor del polipéptido en *E. coli* es una transformación química con cloruro de rubidio bien conocido en la técnica. Los métodos para introducir una caspasa 4 ó 5 que codifiquen ADN y un ADN que codifique un precursor del polipéptido en células mamarias anfitrionas incluyen el método convencional DEAE-extram, el método calcio-ácido fosfórico, los métodos de electroporación, lipofección, microinyección e infección por virus mediante el uso de retrovirus, Adenovirus, herpesvirus y virus de vacuna. En este caso, vectores tales como pCD, pcDL-SRα, pKY4, pCDM8, pCEV4, pME188S y pSV2-gpt, incluidos los correctos promotores, realzadores, orígenes de replicación, sitios de terminación, secuencias de empalme, secuencias de poliadenilación y/o marcadores de selección pueden usarse siguiendo las técnicas estándar descritas en la publicación de Ausubel FM y colab. *Current Protocols in Molecular Biology*, New York: Green Publishing Associ. y Wiley Interescience. Se seleccionaron clones, los cuales fueron observados mediante detección inmunológica para producir un polipéptido activado escogiendo el clon deseado de transformantes luego de cultivar en medios de cultivo nutrientes. Se pueden obtener cultivos que contengan el polipéptido activo cultivando el transformante clonado con el cultivo nutriente convencional que se usa en este campo. En cuanto a células que de por sí producen un precursor del polipéptido y otras células que fueron transformadas para producir el polipéptido, pueden producir el precursor junto con las enzimas activadoras las cuales activan el polipéptido, tal como caspasa 4 o caspasa 5 y ubiquitina. Las tecnologías recombinantes ADN que usan células mamíferas anfitrionas se divulgan en detalle en la publicación de Glutzman, *Cell* 23:175 (1981) Mulligan, *PNAS* 78:2072 (1981). Las tecnologías recombinantes ADN que usan células bacterianas anfitrionas se describen en *Protein Expression: A Practical Approach*, S.J. Higgins y B.D. Hames eds. 1999, N.Y., Oxford University Press.

Si bien las mezclas de reacción resultantes y cultivos que contengan un polipéptido IL-18 activo pueden usarse intactas como inductor de INF- γ , en una realización preferida, las células en los cultivos son interrumpidas mediante ultrasónica, enzimas de lisis celular y/o surfactantes, seguido por la separación del polipéptido de las células resultantes y desechos celulares mediante filtración, centrifugación, etc. siguiendo los procedimientos estándar de la industria descritos

en *Protein Purification: Principles and Practice*, Cantor, C.R. ed. 1993, N.Y., Springer-Verlag. El polipéptido libre de células y de desechos celulares puede ser purificado por medio de métodos de purificación convencional para purificar sustancias biológicamente activas en este campo, por ejemplo, salación, diálisis, filtración, concentración, sedimentación separadora, cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de filtración de gel, cromatografía de adsorción, cromatografía isoelectrica, cromatografía hidrofóbica, cromatografía de fase inversa, cromatografía de afinidad, electroforesis de gel y enfoque isoelectrico. Si se requiere, se pueden usar en combinación dos o más de estos métodos de purificación. El polipéptido purificado que resulte puede ser concentrado y liofilizado en un producto líquido o sólido para que se adapte a sus usos finales.

Los casetas de expresión bicistronica de la presente invención son vectores versátiles que pueden usarse para el procesamiento *in vivo* prácticamente de cualquier péptido que contenga los sitios de reconocimiento de separación de caspasa 4/caspasa 5 o ubiquitinasa que se describieron previamente (Tobias, J.W. y colab. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(18): p.12021-12028; Talanian, R.V. y colab. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(15): p.9677-9682). La expresión bicistronica ofrece ventajas sobre otras estrategias de co-expresión, puesto que ambos genes están ligados a la misma unidad de transcripción, garantizando la expresión coherente de ambos genes con el tiempo. Esto es en contraste con los sistemas plásmidos duales, donde un plásmido se puede perder con el tiempo, o sistemas promotores plásmidos duales, donde la expresión puede variar de cada promotor de un experimento al siguiente. En particular, los sistemas de expresión bicistronica que se describen aquí sirven idealmente para la activación *in vivo* de enzimas, citoquinas, factores de crecimiento y otras proteínas activables proteolíticamente, permitiendo de este modo la producción a grande escala de dichas proteínas de células en un solo paso y eliminando la necesidad de un paso de activación *in vitro* por separado.

Las proteasas de activación, caspasa 4 (Ala105 a Asn377) o la caspasa 5 (Ile146 a Asn418) fueron subclonadas como fusiones 6-his de terminal N inmediatamente luego de la secuencia Pro-IL-18 con el fin de generar una fusión transcripcional de los dos genes. Una secuencia terminadora T7 se localiza aguas debajo de la secuencia de la caspasa 4 para la terminación translacional de la unidad de transcripción bicistronica. También se agregó una pequeña región intergénica que incluía una secuencia Shine-Dalgarno para permitir solo la mínima iniciación de translación de la secuencia de la caspasa 4 (Figuras 10 y 14). Otras

regiones reguladoras incluyen una secuencia de operador *lac* de 25 pares base localizada inmediatamente aguas debajo de la región promotora de 17 bases pares la cual es ligada por el represor *lac* codificado por una copia del gen *lac-I* localizado en el plásmido, eliminando de este modo la transcripción basal en ausencia de la polimerasa ARN T7. Luego se transfectaron por separado los plásmidos resultantes designados Pro-IL18/Casp4 y ProIL18/Casp5 en la cepa *E. coli* BL21 (DE3) la cual contiene una copia cromosómica inducible del gen de polimerasa T7.

La transcripción del casete bicistrónico está bajo la dirección del promotor T7, el cual es controlado por la proteína fago de polimerasa T7 ARN, codificada de la copia lisogénica del gen de polimerasa T7 ARN. Esta copia cromosómica de polimerasa T7 es está en sí bajo el control del promotor *lacUV5*, inducible por la adición de isopropilo-1-tio- β -D-galactopiranosida. La inducción lleva a coordinar la transcripción y traslación de Pro-IL-18 e His-caspasa-4 o His-caspasa 5. La caspasa 4 o la caspasa 5 trasladada naciientemente es autoprocasada en una especie activa, la cual inicia la activación proteolítica de Pro-IL-18. Tanto el precursor trasladado IL-18 como el IL-18 activado postraslacionalmente son ante todo solubles dentro de *E. coli*. El IL-18 maduro activo que contenga tirosina de terminal N es purificado directamente de los lisatos de células bacterianas siguiendo la inducción por medio de métodos de cromatografía convencionales. La separación a IL-18 maduro con caspasa 4 se hace en 4 horas a 37°C o por 18 horas a 29°C (Figura 11) y la separación a IL-18 maduro con caspasa 5 se hace en 18 horas a 29°C (Figura 15).

En la realización más preferida, la presente invención usa una caspasa 4 truncada, tal como se muestra en la Figura 4 (SED ID NO:4 y SEQ IDNO:5), o una caspasa 5 truncada tal como se muestra en la Figura 5 (SED ID NO:7). La truncación de caspasa 4 y caspasa 5 se divulga en Munday, N.A. y colab. 1995, *J. Biol. Chemistry*, 270, 15870-15876.

La presente invención provee además un método para crear un polipéptido activo mediante la co-expresión de una proteasa específica de ubiquitina con una fusión de IL-18 de ubiquitina de terminal N (precursor), la cual es convertida a IL-18 activa mediante la actividad de hidrolasa de ubiquitina de termina-c. Una proteína de ubiquitina de 76 aminoácidos que contenga una tirosina auténtica de terminal N es fusionada a la terminal-N madura del IL-18 humano y coexpresada con una proteasa específica de ubiquitina en *E. coli* por ejemplo según se

muestra en SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11. La ubiquitina es una proteína altamente conservada de 76 residuos que se encuentra en células eucarióticas que funcionan para marcar proteínas para degradación (Baker, R.T., *Current Opinion in Biotechnology*, 1996. 7(5):0 541-6) La ubiquitina es específicamente separada de las proteínas mediante la acción de proteasas específicas de ubiquitina las cuales son expresadas endógenamente en células eucarióticas pero que no están presentes en bacterias. La co-expresión de proteínas fusionadas de ubiquitina con proteasa específica de ubiquitina en *E. coli* también lleva a la eficiente remoción de ubiquitina (Baker, R.T. y colab. *Journal of Biological Chemistry* 1992. 267(32): p.23364-75) (Figura 20). Además, la mayoría de estas enzimas removedoras de ubiquitina pueden separarse frente a cualquier aminoácido, salvo prolina. De este modo, la separación de ubiquitina de IL-18 maduro es posible a pesar de la presencia del grande residuo de tirosina aromática en la posición P1'.

La co-expresión de Ubiquitina-IL-18 (Ub-IL-18) y proteasa-1 de Ubiquitina (Ubp-1) (Tobias, J.W. y colab. *Journal of Biological Chemistry*, 1991. 266(19): 9:12021.12028) se logra mediante la expresión biscaltrónica de los dos genes bajo el control del promotor T7 inducible. El IL-18 maduro es expresado como una fusión de la terminal N con el péptido de ubiquitina de 76 aminoácidos conservado evolucionariamente. El cADN de Ub-IL-18 es subclonado bajo el control del promotor de polimerasa ARN T7 dentro del vector pET28a. Posteriormente, el cADN que codifica la proteasa específica de ubiquitina de longitud completa es subclonado aguas abajo precediendo la secuencia del terminador T7 (Figura 19). Tanto Ub-IL-18 como los cADN de proteasa específica de Ubiquitina son transcritos en una simple transcripción mRNA de la cual las proteínas de proteasa específicas de Ub-IL-18 y Ubiquitina son trasladadas por separado.

Como ya describió, el polipéptido activo humano IL-18 que se obtiene por los presentes métodos tiene la actividad de inducir la producción de IFN- γ como una sustancia activa biológicamente útil, estimula la producción de IFN γ de células KG-1 (línea celular humana mielomonocítica) (Figura 21) y PBMCs humanos purificados (Figura 22).

Todas las publicaciones y patentes se incorporan en este contexto por referencia. Los siguientes ejemplos son explicativos pero no limitan la presente invención:

27
18

EJEMPLO 1 -Preparación del precursor IL-18 (pro-IL-18)

El precursor humano IL-18 se expresó como una fusión marcada hexa-histidina de terminal N en *E. coli*. El plásmido de expresión, ProEx-hIL18 se derivó de un vector, pPROEX-1 (Life Technologies) que contenía el promotor *Trc* e *lacIq* para expresión inducible con isopropilo-1-tio- β -D-galactopiranosida (IPTG). Con el fin de construir el vector de expresión recombinante, se amplificó con PCR de un clon cADN un fragmento ADN que contenía gen completo del precursor de la caspasa 5, coleo 5' con *Nde* I y 3' con sitios de endonucleasa de restricción *Bam* HI. El producto amplificado se subclonó en pPROEX entre estos dos sitios de restricción, generando de este modo una fusión de terminal N en trama con la secuencia de codificación hexa-histidina presente en el vector.

El plásmido resultante se expresó en células anfitrionas DH10B luego de la inducción con 1mM IPTG durante 5 horas a 37°C. La proteína recombinante se cultivó de granos de células obtenidos luego de la centrifugación de los cultivos inducidos.

EJEMPLO 2 – Purificación de pro-IL-18

Se suspendió 1,5 kg de células *E. coli* que expresaban pro-IL-18 según se describió en el EJEMPLO 1 en 3,6 L Buffer lisis (50 mM Tris HCl, 10 mM BME, 0,5 M NaCl, 5% glicerol, 1 μ g/ml pepstatin A, 1 μ g/ml leupepsin, 0,4 mM AEBSF) lisado mediante dos pasos por medio de Microfluidics a 12,000 psi, centrifugado a 28,000 xg y se recolectaron 3,7 L de sobrenadante. Al sobrenadante se agregaron 600 ml de agarosa NINTA pre-equilibrada con Buffer C que contenía 5 mM de imidazol (Buffer D) y se incubó la suspensión durante una hora para capturar el Pro-IL-18. La suspensión se centrifugo a baja velocidad (3,000 rpm), se decantó el sobrenadante, y la suspensión se empacó en una columna. La columna se lavó con Buffer D y se eluyó pro-IL-18 con 300 mM imidazol en Buffer C. El conjunto se dializó en Buffer E (25 mM HEPES, 10 mM BME, pH 8,0) y se aplicó a la columna DEAE ToyoPearl 650M con el mismo búfer. La columna se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 0,5 M NaCl en Búfer E. El conjunto contenía 650 mg de > 90% de pro-IL-18 puro.

18
19

EJEMPLO 3 - Preparación de la Caspasa 4

Caspasa-4 humana también se expresó como una fusión marcada Hexa-histidina de terminal N en *E. coli*. El plásmido de expresión, pET81b-caspasa 4, se derivó de un vector pET16b (Novagen) que contenía el promotor T7. El vector recombinante se construyó mediante amplificación PCR del dominio activo de caspasa-4 (aminoácidos Ile 146 a Asn 418) incorporando una secuencia codificadora hexa-histidina en el terminal N y coleando con sitios de endonucleasa de restricción *Nco* y *Xho*. En seguida, el producto PCR resultante se subclonó entre estos dos sitios de restricción para generar el vector de fusión de Caspasa-4 Hexa Histidina de terminal N.

El plásmido resultante se transformó en la cepa lisogénica BL21 DE3 de *E. coli* que contenía una copia cromosómica de polimerasa ARN T7 bajo control del promotor lacUV5, permitiendo la expresión inducible de caspasa 4 luego de inducción con 1mM de IPTG. La proteína activa se purificó de granos de células aisladas luego de la inducción a 37°C durante 3 horas.

EJEMPLO 4 – Purificación de Caspasa 4

Cuando las células *E. coli* que expresan la caspasa 4 humana marcada hexa-His de terminal N que describe el Ejemplo 2 son lisada, se puede detectar la actividad de la caspasa 4 en el sobrenadante del lisado. Cuando la proteína es capturada en perlas de agarosa NiNTA del sobrenadante, se recupera tanto p10 como p20. Esto indica que el dominio de proteasa de la caspasa 4 es activado durante el cultivo de las células por medio de autoseparación en la unión de p10 y p20 y permanece como un heterodímero soluble, no covalente. Con esta información se puede purificar el heterodímero p20/p10 marcado hexa-His. El proceso entero se realiza a 4°C con el fin de evitar cualquier ruptura posterior de la molécula.

Aproximadamente 400 g de granos de células de *E. coli* húmedos se suspendieron en 1,6 L de búfer de lisis que contenía 25 mM de HEPES, 0,1% CHAPS, 500 mM NaCl, 10 mM beta mercaptoetanol (BME) a pH 7,4 y 10% glicerol

(Búfer A) y se lisó por dos pasos a través de Microfluidics a 12,000 psi. El lisato se centrifugó a 30,000xg durante una hora y se recuperó 1,7 L del sobrenadante del lisato. Al sobrenadante del lisato se agregaron 150 ml de agarosa NINTA, pre-equilibrada con el búfer de lisis que contenía 5 mM de imidazol; la suspensión se ajustó a un pH de 8,0 con 2 N de NaOH y la caspasa 4 se absorbió en lote durante una hora. La agarosa NINTA se empacó en la columna, se lavó secuencialmente con 5 mM y 25 mM de imidazol en Búfer A para remover impurezas, y se eluyó la caspasa 5 con 300 mM de imidazol en el Búfer A. La proteína se dializó contra el Búfer B (25 mM HEPES, 0,1 CHAPS, 10% glicerol, 10 mM BME, pH 8,0) y se aplicó a la columna DEAE ToyoPearl 650M con el mismo búfer. La caspasa 4 se eluyó de la columna con 100 mM de NaCl en el mismo búfer. Se agruparon fracciones que mostraron la actividad específica más alta de caspasa 4 por medio del sustrato de péptido fluorescente, LEED-AMD.

EJEMPLO 5- Activación y preparación *in vitro* del polipéptido

El Pro-IL-18 purificado según se describe en el Ejemplo 2 se incubó con Caspasa 4 a una relación peso/peso de 1:500 durante 3 horas a temperatura ambiente. La reacción de separación del prodominio se hizo a >90% de acuerdo con el análisis SDS-PAGE. A la mezcla de reacción se agregaron 140 ml de agarosa NINTA en Búfer D, se incubó durante una hora y se vació a un embudo de vidrio sinterizado para recuperar el material no ligado que contenía principalmente IL-18 maduro. A la agarosa NINTA se ligaron pequeñas cantidades del resto de Pro-IL-18, prodominio, caspasa 4 y otras impurezas. La solución no ligada se ajustó a 25 mM DTT, se incubó durante una hora para completar la reacción de reducción, se ajustó el pH de la solución a 6,0 mediante la adición de 2 M de ácido fosfórico y se concentró a 86 ml usando la membrana YM10. La mezcla concentrada se aplicó a una columna de Superdex 75 pre-equilibrada con 10 mM de NaFosfato, pH 6,0 que contenía 0,1 M de NaCl. Las fracciones agrupadas contenían 560 mg de IL-18 maduro.

EJEMPLO 6 – Activación y preparación *in vivo* del polipéptido.

La activación de IL-18 también se puede lograr *in vivo* mediante la expresión simultánea del precursor humano IL-18 y caspasa 4. Pro-IL-18 es co-

expresado bicistricamente en *E. coli* de una transcripción simple con caspasa 4 humana dentro del plásmido de expresión, pET28-Pro-IL-18/Casp4 (Figuras 5 y 6). El gen del Pro-IL-18 humano es subclonado en pET28a (Novagen) bajo el control del promotor T7 incluida una secuencia eficiente Shine-Dalgarno para iniciación de la traslación óptima de la secuencia Pro-IL-18 (Figura 8). El gen de la caspasa 4 (Ile 146 a Asn 418) se subclonó inmediatamente después de la secuencia Pro-IL-18 incluida una secuencia defectuosa Shine-Dalgarno, permitiendo la iniciación de la traslación mínima de la secuencia de la caspasa 4. Luego de la unidad de transcripción bicistrica se incluyó una secuencia del terminador T7 para terminación traslacional. La construcción resultante fue luego transfectada en una célula anfitriona BL21 (DE3) que contenía una copia cromosómica inducible del gen de polimerasa T7. La inducción de esta construcción en este anfitrión con 1 mM IPTG resultó en la transcripción y traslación coordinadas de pro-IL-18 y pro-caspasa 4. La pro-caspasa 4 trasladada naciientemente es autoprocada en una especie activa, la cual inicia la activación proteolítica de Pro-IL-18. La Figura 8 muestra un transcurso de tiempo de coordinada durante 18 horas a 29°C luego de inducción de 1 mM IPTG (0-18 horas).

EJEMPLO 7 – Activación *in vivo* de caspasa 4

La activación *in vivo* de Caspasa 4 se describe en (Munday, N.A. y colab. 1995, *J. Biol. Chemistry*, 270, 15870-15876). La expresión de una forma truncada de caspasa-4 comenzando en Ala 59, a la que le falta la pro-región en *E. coli* lleva a la autoactivación por separación en las subunidades P10 y P20 que se reúnen en un heterodímero activo de enzima. La demora en la activación de la caspasa-4 es trasladada a una demora en la separación y activación de Pro-IL-18 en IL-18 maduro (Figura 9). Esto permite la acumulación del Pro-IL-18 más estable antes de su separación a IL-18 lo cual es menos estable en células.

EJEMPLO 8 – Purificación de IL-18 humano co-expresado con Caspasa 4

66 g de células de *E. coli* que expresaban IL-18 según se describe en el Ejemplo 6 se suspendieron en 130 ml de 0,1 HEPES pH 7,5 que contenía 1 mM EDTA y 10 mM DTT (el proceso entero se hizo a 4°C y en presencia de 10 mM DTT salvo el último paso para mantenerlo libre de SH) y se lisó a 15,000 psi

mediante dos pasos usando Microfluidica. El lisato (230 ml) se centrifugo a 34,000 xg durante 30 minutos. El sobrenadante (200 ml) se diluyó en 1L con 25 mM HEPES a pH 7,0 y se fluyó a través de dos columnas en tándem, ToyoPearl SP 650 M y ToyoPearl DEAE 650 M. Muchas de las impurezas derivadas de células *E. coli* se ligaron a las columnas. El material de flujo se ajustó a un pH de 9,5 con 25 mM de propano bistris, se diluyó a 2 L y se aplicó a la columna de la Fuente 15Q equilibrada con 25 mM de propano bistris HCl a un pH de 9,5. La columna se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 0,5 M NaCl en el mismo búfer. Se identificaron las fracciones que contenían IL-18 usando Vydac C4 RP-HPLC y se agruparon (250 ml). El grupo se concentró a 50 ml usando membrana YM10 y se aplicó a la columna Superdex 75 la cual se pre-equilibró con 10 mM de NaPO₄ a pH 6,0 que contenía 1 mM EDTA y 0,15 M de NaCl (sin DTT para uso *in vivo*).

EJEMPLO 9 – Preparación de caspasa 5 truncada

Caspasa-5 humana truncada también se expresó como una fusión marcada Hexa-histidina de terminal N en *E. coli*. El plásmido de expresión, pET61b-caspasa 5, se derivó de un vector pET16b (Novagen) que contenía el promotor T7. El vector recombinante se construyó mediante amplificación PCR del dominio activo de caspasa-5 (aminoácidos Ile 146 a Asn 418) incorporando una secuencia codificadora hexa-histidina en el terminal N y coleando con sitios de endonucleasa de restricción *Nco* y *Xho*. En seguida, el producto PCR resultante se subclonó entre estos dos sitios de restricción para generar el vector de fusión de Caspasa-5 Hexa Histidina de terminal N.

El plásmido resultante se transformó en la cepa lisogénica BL21 DE3 de *E. coli* que contenía una copia cromosómica de polimerasa ARN T7 bajo control del promotor *lacUV5*, permitiendo la expresión inducible de caspasa 5 luego de inducción con 1mM de IPTG. La proteína activa se purificó de granos de células aisladas luego de la inducción a 37°C durante 3 horas.

EJEMPLO 10 – Purificación de Caspasa 5 truncada

Cuando las células *E. coli* que expresan la caspasa 5 humana truncada marcada hexa-His de terminal N que describe el Ejemplo 9 son lisadas, se puede detectar la actividad de la caspasa 5 en el sobrenadante del lisado. Cuando la

proteína es capturada en perlas de agarosa NiNTA del sobrenadante, se recupera tanto p10 como p20. Esto indica que el dominio de proteasa de la caspasa 5 es activado durante el cultivo de las células por medio de autoseparación en la unión de p10 y p20 y permanece como un heterodímero soluble no covalente. Con esta información se puede purificar el heterodímero p20/p10 marcado hexa-His. El proceso entero se realiza a 4°C con el fin de evitar cualquier ruptura posterior de la molécula.

Aproximadamente 400 g de granos de células de *E. coli* húmedos se suspendieron en 1,6 L de búfer de lisis que contenía 25 mM de HEPES, 0,1% CHAPS, 500 mM NaCl, 10 mM beta mercaptoetanol (BME) a pH 7,4 y 10% glicerol (Búfer A) y se lisó por dos pasos a través de Microfluidics a 12,000 psi. El lisato se centrifugó a 30,000xg durante una hora y se recuperó 1,7 L del sobrenadante del lisato. Al sobrenadante del lisato se agregaron 150 ml de agarosa NiNTA, pre-equilibrada con el búfer de lisis que contenía 5 mM de imidazol; la suspensión se ajustó a un pH de 8,0 con 2 N de NaOH y la caspasa 5 se absorbió en lote durante una hora. La agarosa NiNTA se empacó en la columna, se lavó secuencialmente con 5 mM y 25 mM de imidazol en Búfer A para remover impurezas, y se eluyó la caspasa 5 con 300 mM de imidazol en el Búfer A. La proteína se dializó contra el Búfer B (25 mM HEPES, 0,1% CHAPS, 10% glicerol, 10 mM BME, pH 8,0) y se aplicó a la columna DEAE ToyoPearl 650M con el mismo búfer. La caspasa 5 se eluyó de la columna con 100 mM de NaCl en el mismo búfer. Se agruparon fracciones que mostraron la actividad específica más alta de caspasa 5 por medio del sustrato de péptido fluorescente, LEED-AMD.

EJEMPLO 11- Activación y preparación *in vitro* del polipéptido

El Pro-IL-18 purificado según se describe en los Ejemplos 1 y 2 se incubó con Caspasa 5 a una relación peso/peso de 1:500 durante 3 horas a temperatura ambiente. La reacción de separación del prodominio se hizo a >90% de acuerdo con el análisis SDS-PAGE. A la mezcla de reacción se agregaron 140 ml de agarosa NiNTA en Búfer D, se incubó durante una hora y se vació a un embudo de vidrio sinterizado para recuperar el material no ligado que contenía principalmente IL-18 maduro. A la agarosa NiNTA se ligaron pequeñas cantidades del resto de pro-IL-18, prodominio, caspasa 5 y otras impurezas. La solución no ligada se ajustó a 25 mM DTT, se incubó durante una hora para completar la

reacción de reducción, se ajustó el pH de la solución a 6,0 mediante la adición de 2 M de ácido fosfórico y se concentró a 86 ml usando la membrana YM10. La mezcla concentrada se aplicó a una columna de Superdex 75 pe-equilibrada con 10 mM de NaFosfato, pH 6,0 que contenía 0,1 M de NaCl. Las fracciones agrupadas contenían 560 mg de IL-18 maduro.

EJEMPLO 12 – Activación y preparación *in vivo* del polipéptido.

La activación de IL-18 también se puede lograr *in vivo* mediante la expresión simultánea del precursor humano IL-18 y caspasa 5. Pro-IL-18 es co-expresado bicistóricamente en *E. coli* de una transcripción simple con caspasa 5 humana dentro del plásmido de expresión, pET28-Pro-IL-18/Casp5 (Figura 9). El gen del Pro-IL-18 humano es subclonado en pET28a (Novagen) bajo el control del promotor T7 incluida una secuencia eficiente Shine-Dalgarno para iniciación de la traslación óptima de la secuencia Pro-IL-18 (Figura 10). El gen de la caspasa 5 truncada (Ile 146 a Asn 418) se subclonó inmediatamente después de la secuencia Pro-IL-18 incluida una secuencia defectuosa Shine-Dalgarno, permitiendo la iniciación de la traslación mínima de la secuencia de la caspasa 5. Luego de la unidad de transcripción bicistórica se incluyó una secuencia del terminador T7 para terminación traslacional. La construcción resultante fue luego transfectada en una célula anfitriona BL21 (DE3) que contenía una copia cromosómica inducible del gen de polimerasa T7. La inducción de esta construcción en este anfitrión con 1 mM IPTG resultó en la transcripción y traslación coordinadas de pro-IL-18 y pro-caspasa 5. La pro-caspasa 5 trasladada naciientemente es autoprocesada en una especie activa, la cual inicia la activación proteolítica de Pro-IL-18.

EJEMPLO 13 – Purificación de IL-18 humano co-expresado con Caspasa 5 truncada

66 g de células de *E. coli* que expresaban IL-18 según se describe en el Ejemplo 12 se suspendieron en 130 ml de 0,1 HEPES pH 7,5 que contenía 1 mM EDTA y 10 mM DTT (el proceso entero se hizo a 4°C y en presencia de 10 mM DTT salvo el último paso para mantenerlo libre de SH) y se lisó a 15,000 psi mediante dos pasos usando Microfluidics. El lisato (230 ml) se centrifugó a 34,000

25

EJEMPLO 14 – Preparación de Ubiquitina/Pro-IL-18/Ubp1

Se fusiona en la trama la secuencia codificadora de ubiquitina de 76 aminoácidos con la iniciación de IL-18 humano maduro por medio de ligación de extremo despuntado de modo que el primer codón de tirosina del IL-18maduro siga inmediatamente el codón 76 de glicina de ubiquitina. La fusión de genes es luego subclonada en un vector pET bajo el control del promotor T7 que incluía una secuencia eficiente Shine-Dalgarno para iniciación de la translación óptima de la secuencia del gen IL-18 de ubiquitina. El gen Ubp-1 de longitud completa es luego subclonado inmediatamente luego de IL-18, incluida una secuencia defectuosa Shine-Dalgarno para translación mínima de Ubp-1. La Figura 11 muestra la secuencia del casete de expresión UbIL-18/Ubp-1 dentro de pET28. La Figura 13 muestra la secuencia anotada de UbIL-18/Ubp-1 dentro de pET28. La numeración corresponde a la posición dentro de pET28.

EJEMPLO 15 – Activación y preparación de IL-18 *in vivo*

La construcción del Ejemplo 14 fue luego transfectada en un anfitrión BL21 (DE3). La inducción con 1 mM de IPTG resultó en la transcripción y traducción coordinadas de Ubiquitina-IL-18 y Ubp-1. La acción enzimática de Ubp-1 llevó al procesamiento eficiente de Ub-IL-18 en IL-18 activo maduro que luego puede ser purificado directamente de lisatos de *E. coli* por métodos convencionales. La Figura 16 ilustra el transcurso de tiempo de expresión y procesamiento de IL-18 a

30°C y 37°C luego de inducción con 1 mM de IPTG. La flecha superior indica la porción de UB-OL-18 sin procesar en la Fila 1. La flecha inferior indica la porción de IL-18 procesado en la Fila 3. (La detección por secado Western se hizo con antisuero IL-18)

EJEMPLO 16 –Purificación de IL-18 humano co-expresado con Ubiquitina.

66 g de células de *E. coli* que expresaban IL-18 según se describe en el Ejemplo 15 se suspendieron en 130 ml de 0,1 HEPES pH 7,5 que contenía 1 mM EDTA y 10 mM DTT (el proceso entero se hizo a 4°C y en presencia de 10 mM DTT salvo el último paso para mantenerlo libre de SH) y se lisó a 15,000 psi mediante dos pasos usando Microfluidics. El lisato (230 ml) se centrifugó a 34,000 xg durante 30 minutos. El sobrenadante (200 ml) se diluyó en 1L con 25 mM HEPES a pH 7,0 y se fluyó a través de dos columnas en tándem, ToyoPearl SP 650 M y ToyoPearl DEAE 650 M. Muchas de las impurezas derivadas de células *E. coli* se ligaron a las columnas. El material de flujo se ajustó a un pH de 9,5 con 25 mM de propano bistris, se diluyó a 2 L y se aplicó a la columna de la Fuente 15Q equilibrada con 25 mM de propano bistris HCl a un pH de 9,5. La columna se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 0,5 M NaCl en el mismo búfer. Se identificaron las fracciones que contenían IL-18 usando Vydac C4 RP-HPLC y se agruparon (250 ml). El grupo se concentró a 50 ml usando membrana YM10 y se aplicó a la columna Superdex 75 la cual se pre-equilibró con 10 mM de NaPO4 a pH 6,0 que contenía 1 mM EDTA y 0,15 M de NaCl (sin DTT para uso *in vivo*)

Si bien en este contexto se ha descrito lo que actualmente se consideran realizaciones preferidas de la invención, debe entenderse que se pueden hacer varias modificaciones a ello, y el propósito es que las reivindicaciones adjuntas cubran todas dichas modificaciones que caigan dentro del verdadero espíritu y alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un polipéptido activo de un polipéptido precursor, el polipéptido tiene un motivo de activación de proteasa que comprende la secuencia aminoácida XEYD, en donde X es seleccionado de un grupo de aminoácidos consistentes de W, L, F, Y, I, V, D o E; y Y es seleccionado de un grupo de aminoácidos consistentes de H, I, A, T, S, P o E, que consiste en:

- (i) contactar la caspasa 4 con el polipéptido precursor, y
- (ii) purificar el polipéptido activo

2. Un método para producir un polipéptido activo de un polipéptido precursor, el polipéptido tiene un motivo de activación de proteasa que comprende la secuencia aminoácida XEYD, en donde X es seleccionado de un grupo de aminoácidos consistentes de W, L, F, Y, I, V, D o E; y Y es seleccionado de un grupo de aminoácidos consistentes de H, I, A, T, S, P o E, que consiste en:

- (i) contactar la caspasa 5 con el polipéptido precursor, y
- (ii) purificar el polipéptido activo

3. Un método para producir un polipéptido IL-18 activo de un precursor polipéptido IL-18, que consiste en

- (i) contactar la caspasa 4 con el polipéptido IL-18 precursor, y
- (ii) purificar el polipéptido IL-18 activo.

4. Un método para producir un polipéptido IL-18 activo de un precursor polipéptido IL-18, que consiste en

- (i) contactar la caspasa 5 con el polipéptido IL-18 precursor, y
- (ii) purificar el polipéptido IL-18 activo.

5. El método de la reivindicación 3, en donde el polipéptido IL-18 precursor es un polipéptido IL-18 humano.

6. El método de la reivindicación 4, en donde el polipéptido IL-18 precursor es un polipéptido IL-18 humano.

27

amplio espectro.

7. Un método para producir un polipéptido IL-18 humano activo que consiste en:

- (i) Contactar la caspasa 4 con un polipéptido IL-18 humano para convertir dicho polipéptido precursor en el polipéptido IL-18 humano activo; dicho polipéptido OL-18 precursor comprende la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 1 o una porción de la misma, lo cual mantiene los residuos de ácido aspártico 36 y de tirosina 37 en la secuencia de amino de SEQ ID NO: 1 como una secuencia de terminal N; y
- (ii) Purificar el polipéptido IL-18 humano activo.

8. Un método para producir un polipéptido IL-18 humano activo que consiste en:

- (i) Contactar la caspasa 5 con un polipéptido IL-18 humano para convertir dicho polipéptido precursor en el polipéptido IL-18 humano activo; dicho polipéptido OL-18 precursor comprende la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 1 o una porción de la misma, lo cual mantiene los residuos de ácido aspártico 36 y de tirosina 37 en la secuencia de amino de SEQ ID NO: 1 como una secuencia de terminal N; y

9. El método para producir un polipéptido IL-18 humano activo de la reivindicación 7, en donde el polipéptido IL-18 humano activo es un polipéptido que tiene la secuencia aminoácida de SEQ ID NO:3.

10. El método para producir un polipéptido IL-18 humano activo de la reivindicación 8, en donde el polipéptido IL-18 humano activo es un polipéptido que tiene la secuencia aminoácida de SEQ ID NO:3.

11. Un método para producir un polipéptido activo de un polipéptido precursor, que comprende:

- (i) co-expresar bicistricamente la caspasa 4 con el polipéptido precursor; y
- (ii) purificar el polipéptido activo.

12. Un método para producir un polipéptido activo de un polipéptido precursor, que comprende:

- (i) co-expresar bicistricamente la caspasa 5 con el polipéptido precursor, y
- (ii) purificar el polipéptido activo.

13. Un método para producir un polipéptido IL-18 activo de un polipéptido IL-18 precursor, que comprende:

- (i) co-expresar bicistricamente ubiquitinasa con una fusión ubiquitina (IL-18; y
- (ii) purificar el polipéptido IL-18 activo.

14. Un método para producir un polipéptido IL-18 activo de un polipéptido precursor, que comprende:

- (i) co-expresar bicistricamente caspasa 4 con el polipéptido IL-18 precursor, y
- (ii) purificar el polipéptido IL-18 activo.

15. Un método para producir un polipéptido IL-18 activo de un polipéptido IL-18 precursor, que comprende:

- (i) co-expresar bicistricamente caspasa 5 con el polipéptido IL-18 precursor, y
- (ii) purificar el polipéptido IL-18 activo.

16. El método de la reivindicación 13, en donde el polipéptido IL-18 precursor es un polipéptido IL-18 precursor humano.

17. El método de la reivindicación 14, en donde el polipéptido IL-18 precursor es un polipéptido IL-18 precursor.

18. El método de la reivindicación 15, en donde el polipéptido IL-18 precursor es un polipéptido IL-18 precursor.

19. El método de la reivindicación 16, en donde el polipéptido IL. Humano activo es un polipéptido que tiene la secuencia aminoácida de SEQ ID NO:3

qual. 29

secuencia? no es un polipéptido repetido?

20. El método de la reivindicación 17, en donde el polipéptido IL-humano activo es un polipéptido que tiene la secuencia aminoácida de SEQ ID NO:3

21. El método de la reivindicación 18, en donde el polipéptido IL-18 humano activo es un polipéptido que tiene la secuencia aminoácida de SEQ ID NO:3

22. Un método para producir polipéptido IL-18 humano activo del polipéptido IL-18 precursor humano, que comprende:

(i) co-expresar bicistricamente ubiquitinasa con ubiquitina/IL-18, que tenga la secuencia aminoácida de SEQ ID NO:10; y

(ii) purificar el polipéptido IL-18 humano activo

23. Un método para producir polipéptido IL-18 humano activo de un polipéptido IL-18 precursor humano, que comprende:

(i) co-expresar bicistricamente caspasa-4 que tenga la secuencia aminoácida de SEQ ID NO:4; y

(ii) purificar el polipéptido IL-18 humano activo

24. Un método para producir un polipéptido IL-18 humano activo de un polipéptido IL-18 precursor humano, que comprende:

(i) Co-expresar bicistricamente caspasa 5, que tenga la secuencia aminoácida de SEQ ID NO:6, con el polipéptido IL-18 precursor humano; y

(ii) purificar el polipéptido IL-18 activo.

29
31

FIGURE 1

SEQ ID NO:1

1 MAAEPVEDNC INFVAMKFID NTLYFLAEDD ENLESDYFGK LESKLSVIRN
5 51 LNDQVLFDQ GNRPLFEDMT DSDCRDNAPR TIFIISMYKD SQPRGMAVTI
101 SVKCEKISTL SCENKIISFK EMNPPDNIKD TKSDIIFQOR SVPGHDKMQ
151 FESSSYEGYF LACEKERDLF KLILKKEDEL GDRSIMFTVQ NED

FIGURE 2

10 SEQ ID NO:2

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

35

FIGURE 3

SEQ ID NO:3

1 YFGKLESKLS VIRNLNDQVL FIDQGNRPLF EDMTDSDCRD NAPRTIFIIS
51 MYKDSQPRGM AVTISVKCEK ISTLSCENKI ISFKEMNPPD NIKDTSKDI
40 101 FFQRSVPGHD NKMQFESSY EGYFLACEKE RDLFKLILK EDELGDRSIM

151 FTVQNEED

FIGURE 4

SEQ ID NO: 4

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

FIGURE 5

SEQ ID NO: 5

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

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

5 FIGURE 6

SEQ ID NO:6

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

FIGURE 7

15 SEQ ID NO:7

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

701750

GCTTCCAGAA ATATTCTTGC TGCTGCCACC TAATGGAAAT ATTTGGAAG

751800

GTACAGAAAT CATTGAAGT TCCACAGGCT AAAGCCCAGA TGCCCACCAT

5801849

AGAACGAGCA ACCTTGACAA GAGATTTCTA CCTCTTTCCT GGCAATTGA

FIGURE 8.



FIGURE 9.

15

SEQ ID NO:8

150

AGATCTCGAT CCCGCGAAAT TAATACGACT CACTATAGGG GAATTGTGAG

51100

CGGATAACAA TTCCCCTCTA GACCACACCT taaggaggat ataacatATG

20101150

GCTGCTGAAC CAGTAGAAGA CAATTGCATC AACTTTGTGG CAATGAAATT

151200

TATTGACAAT ACGCTTTACT TTATAGCTGA AGATGATGAA AACCTGGAAT

201250

25CAGATTACTT TGGCAAGCTT GAGAGCAAAC TATCGGTCAT tCGTAATTTA

251300

AATGACCAGG TCCTATTTAT CGACCAAGGG AATCGTCCAC TATTCGAGGA

301350

CATGACAGAC AGTGACTGCC GAGACAATGC GCCGCGAACC ATtTTCATTA

30351400

TATCTATGTA CAAGGATTCT CAGCCGCGCG GAATGGCCGT AACTATTTCT

401450

GTCAAATGTG AAAAGATATC CACGCTGTCTG TGTGAGAACA AgATTtATtAG

451500

35TTTCAAAGAG ATGAATCCGC CGGATAATAT CAAGGACACG AAGTCTGATA

501550

TCATAFTTTT CCAGCGCAGC GTGCCGGGGC ACGATAACAA GATGCAATTT

551600

GAATCATCCA GCTATGAAGG GTACTTTCTT GCATGCGAGA AGGAACGCGA

40601650

TCTCTTTTAAA CTTATTTTAA AGAAAGAGGA CGAGCTAGGC GATCGCAGCA

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

35

37

GTTCTTAAGAGTCGGCGCGCCTTACCGGCATTGATAAAGACAGTTTACACTTTTCTATAG

b K D S Q P R G M A V T I S V K C E K I S -

5 CACGCTGTCGTGTGAGAACAAGATTATAGTTTCAAAGAGATGAATCCGCCGGATAATAT

5384 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5443

GTGCGACAGCACACTCTTGTTCATAATCAAGTTTCTCTACTTAGGCGGCCCTATTATA

b T L S C E N K I I S F K E M N P P D N I -

10

CAAGGACACGAAGTCTGATATCATATTTTCCAGCGCAGCGTCCCGGGCACGATAACAA

5444 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5503

GTTCTGTGCTTCAGACTATAGTATAAAAAGGTCCGCTCGCACGGCCCCGTGCTATTGTT

15 b K D T K S D I I F F Q R S V P G H D N K -

GATGCAATTTGAATCATCCAGCTATGAAGGGTACTTTCTTGCATGCGAGAAGGAACGCGA

5504 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5563

CTACGTTAAACTTAGTAGGTGCTACTTCCCATGAAAGAAGCTACGCTCTTCCTTGCGCT

20

b M Q F E S S S Y E G Y F L A C E K E R D -

TCTCTTTAACTTATTTTAAAGAAAGAGGACGAGCTAGGCGATCGCAGCATATGTTTAC

5564 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5623

25 AGAGAAATTTGAATAAAATTTCTTCTGCTGCTGCTACGCTAGCCTCCTAATACAAATG

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

Defective Shine-Dalgarno Start of Caspase-4

30 TGTCCAAATGAAGACTAGTgggaggatataATACCAg~~gataaag~~taaaatccatgGgccca

5624 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5683

ACAGGTTTFACTTCTGATCACctcctatatattATGGTcCttatttttaggtacCggt

b V Q N E D M G H -

35

tcctcatcatcatcatcatggcGCCCTCAAGCTTGTCTCATGAAGAATTCCTGAGACTATG

5684 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5743

agtagtagtagtagtagtaccgCGGAGTTGGAACAGGAGTACTTCTTAAGGACTCTGATAC

40 b E E E E E G A L K L C P E E E F L R L C -

TAAAGAAAGAGCTGAAGAGATCTATCCAATAAAGGAGAGAACAACCGCACACGCCCTGGC

5744 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5803

48
39

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

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

b D F I A F C S S T P H N V S W R D S T K -
GGGCTCTATCTTCATCACACAACCTCATCACATGCTTCCAGAAATATTCTTGGTGCTGCCA
15 6344 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6403
CCCGAGATAGAAAGTAGTGTGTGAGTAGTGTACGAAGGTCTTTATAAGAACCACGACCGT

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

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

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

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

10/31

b T T T E I R L L T K P E R K L S W L L P -

T7 Terminator

ACCGTGTGAGCAATACCTAGCATAAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGCTCTTGAGGGGCTTTT

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

5

TGGCGACTCGTTATTGATCGTATTGGGGAACCCGGAGATTGCCCAGAACTCCCCAAA

b P L S N N * H N P L G P L N G S * G V F -

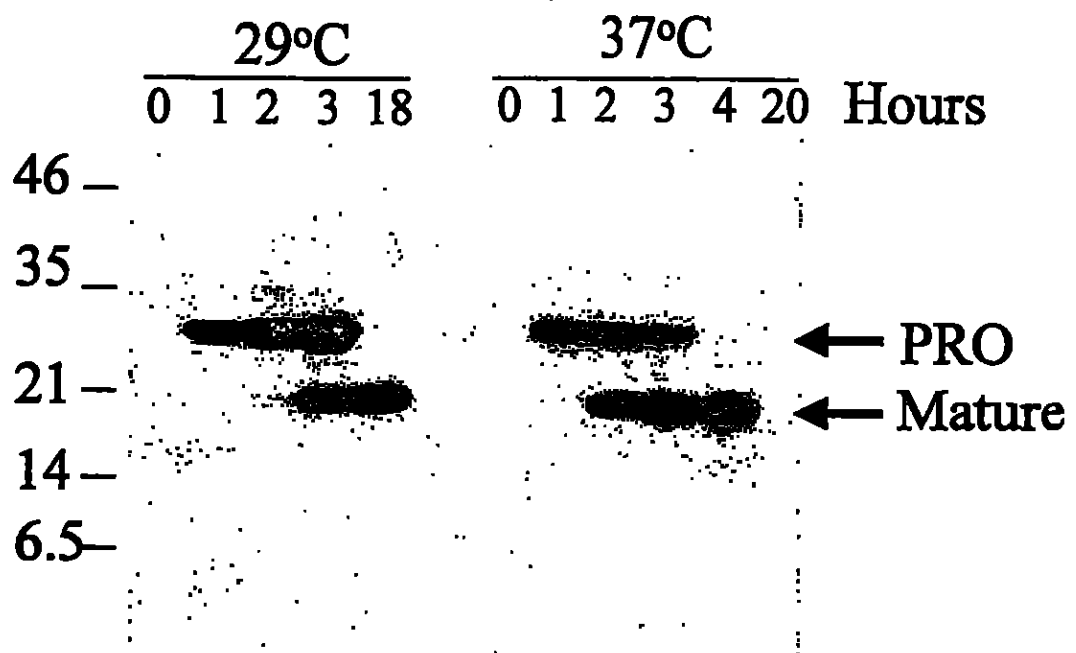
10

6704 --- 6706

AAC

FIGURE 11.

15



20 **FIGURE 12.**



FIGURE 13.
SEQ ID NO:9

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

42

```

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

```

FIGURE 14.

```

25 GCGCCGGTGTATGCCCGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGA
4921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4980
CGCGGCCACTACGGCCGGTGCTACGCAGGCCGCATCTCTAGCTCTAGAGCTAGGGCGCT

c      A G D A G E D A S G V E D R D L D P A K -
      #7 Promoter
30 AATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGACCACA
4981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5040
TTAATTATGCTGAGTGATATCCCCTTAACACTCGCCTATTGTTAAGGGGAGATCTGGTGT

c      L I R L T I G E L * A D N N S P L D H T -
      Shine-Dalgarno ProX118 start
35 CCTCAGGAGGatataacatATGGCTGCTGAACCACTAGAAGACAATTGCATCAACTTTG
5041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5100
GGAattcctcctatatattgtATACCGACGACTTGGTCATCTTCTGTTAACGTAGTTGAAC

40 c      L R R I * H M A A E P V E D N C I N F V -

      TGGCAATGAAATTTATTGACAATACGCTTTACTTTTATAGCTGAAGATGATGAAAACCTGG
5101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5160
ACCGTEACTTTAAATAACTGTTATGCGAANTGAAATATCGACTTCTACTACTTTTGGACC

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

```

Start of mature IL18

5161 AATCAGATTACTTTGGCAAGCTTGAGAGCAAACCTATCGGTCATCGTAATTTAAATGACC 5220
TTAGTCTAATGAAACCGTTTCGAACCTCTCGTTTGATAGCCAGTAAGCATTAAATTTACTGG
5 S D Y F G K L E S K L S V I R N L N D Q -
5221 AGGTCCTATTTATCGACCAAGGGAATCGTCCACTATTCGAGGACATGACAGACAGTGACT 5280
TCCAGGATAAATAGCTGGTTCCTTAGCAGGTGATAAGCTCCTGTACTGTCTGTCACTGA
10 V L F I D Q G N R P L F E D M T D S D C -
5281 GCCGAGACAATGCCCGCGGAACCATTTTCATTATATCTATGTACAAGGATTCTCAGCCGC 5340
CGGCTCTGTTCACGCGCGCTTGGTAAGAAGTAATATAGATACATGTTCCCTAAGAGTCGGCG
15 R D N A P R T I F I I S M Y K D S Q P R -
5341 GCGGAATGGCCGTAAC TATTTCTGTCAAATGTGAAAAGATATCCACGCTGTCTGTGAGA 5400
CGCCTTACCGGCATTGATAAAGACAGTTTACACTTTTCTATAGGTGGACAGCACACTCT
20 G M A V T I S V K C E K I S T L S C E N -
5401 ACAAGATATATAGTTTCAAGAGATGAATCCGCCGATAATATCAAGGACACGAAGTCTG 5460
TGTTCTAATAATCAAGTTTCTCTACTTAGGCGGCTATTATAGTTCTGTGCTTCAGAC
25 K I I S F K E M N P P D N I K D T K S D -
5461 ATATCATATTTTCCAGCGCAGCGTGCCGGGGCAGGATAACAAGATGCAATTTGAATCAT 5520
TATAGTATAAAAAGGTCCGCTCGCAGCGCCCCGCTATTGTTCTACGTTAAACTTAGTA
30 I I F F Q R S V P G H D N K M Q F E S S -
5521 CCAGCTATGAAGGCTACTTTCTTCATGCGAGAAGGAACGCGATCTCTTTAAACTTATTT 5580
GGTCGATACTTCCCATGAAAGAAGCTACGCTCTTCCTTGCGCTAGAGAAATTTGAATAAA
35 S Y E G Y F L A C E K E R D L F K L I L -
5581 TAAAGAAAGAGGACGAGCTAGGCGATCGCAGCATATGTTCACTGTCCAAAATGAAGACT 5640
ATTTCTTTCTCTCTGCTCGATCCGCTAGCGTCGTAATACAAGTGACAGGTTTACTTCTGA
40 K K E D E L G D R S I M P T V Q N E D * -
5641
45 Defective Shine-Dalgarno Start Caspase 5
50 AGTggaggatataaTACCAgGataaataaaatccatgGgccatcatcatcatcatcatg

5641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5700
TCacctcctatatattATGGTcCttattttattttaggtacCggtagtagtagtagtagtac

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

5 gCATACTCAAACCTTTGTCTCGTGAAGAATTCCTGAGACTGTGTAAAAAAATCATGATG

5701 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5760
cgTATGAGTTTGAAACAGGAGCACCTCTTAAGGACTCTGACACATTTTTTTTAGTACTAC

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

AGATCTATCCAATAAAAAAGAGAGAGGACCGCAGACGCCTGGCTCTCATCATATGCAATA

5761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5820
TCTAGATAGGTTATTTTTCTCTCTCTCGGCGTCTGCGGACCGAGAGTAGTATACGTTAT

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

CAAAGTTTGATCACCTGCCTGCAAGGAATGGGGCTCACTATGACATCGTGGGGATGAAAA

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

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

GGCTGCTTCAAGGCCTGGGCTACACTGTGGTTGACGAAAAGAATCTCACAGCCAGGGATA

5881 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5940
CCGACGAAGTTCCGGACCCGATGTGACACCAACTGCTTTTCTTAGAGTGTGGTCCCTAT

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

TGGAGTCAGTGTGAGGGCATTGCTGCCAGACCAGAGCACAAGTCTCTGACAGCACGT

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

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

TCTTGGTACTCATGTCTCATGGCATCTTAGAGGGAACTGTGCGAACTGCGCATAAAAAGA

6001 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6060
AGAACCATGAGTACAGAGTACCGTAGGATCTCCCTTAGACGCCCTTGACGCGTATTTTTCT

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

AAAAACCGGATGTGCTGCTTTATGACACCATCTTCCAGATATTCAACAACCGCAACTGCC

6061 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6120
TTTTTGGCCTACACGACGAATACTGTGGTAGAAGGTCTATAAGTTGTTGGCGTTGACGG

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

TCAGTCTAAAGGACAAACCCAAGGTCATCATTTCTCCAGGCCTGCAGAGGTGAAAAACATG

6121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6180
AGTCAGATTTCTGTTGGGTTCCAGTAGTAACAGGTCCGGACGCTCTCCACTTTTTGTAC

45

50

45

c S L K D K P K V I I V Q A C R G E K R G -
GGGAACCTCTGGGTCAGAGACTCTCCAGCATCCTTGGCAGTCATCTCTTCACAGTCATCTG
5 6181 -----+-----+-----+-----+-----+ 6240
CCCTTGAGACCCAGTCTCTGAGAGGTCGTAGGAACCGTCAGTAGAGAAGTGTTCAGTAGAC

c E L W V R D S F A S L A V I S S Q S S E -
AGAACCTGGAGGCAGATTCTGTTTGCAAGATCCACGAGGAGAAGGACTTCATTGCTTTCT
10 6241 -----+-----+-----+-----+-----+ 6300
TCTTGGACCTCCGTCTAAGACAACGTTCTAGGTGCTCTCTTCCTGAAGTAACGAAAGA

c N L E A D S V C K I H E E K D F I A F C -
GTTCCTCAACACCACATAACGTCTCTGGAGAGACCGCACAGGGGCTCCATCTTCATTA
15 6301 -----+-----+-----+-----+-----+ 6360
CAAGAAGTTGTGGTGTATTGCACAGGACCTCTCTGGCGTGTTCCTGAGGTAGAAGTAAT

c S S T P H N V S W R D R T R G S I F I T -
CGGAACCTCATCATGCTCTCCAGAAATATTCTTGCTGCTGCCACCTAATGGAAATATTTT
20 6361 -----+-----+-----+-----+-----+ 6420
GCCTTGAGTAGTGTACGAAGGTCTTTATAAGAACGACGACGGTGGATTACCTTTATAAAG

c E L I T C F Q K Y S C C C H L M E I F R -
GGAAGGTACAGAAATCATTGGAAGTCCACAGGCTAAAGCCCCAGATGCCCCACCATAGAAC
25 6421 -----+-----+-----+-----+-----+ 6480
CCTTCCATGTCTTTAGTAAACTTCAAGGTGTCCGATTTCGGGTCTACGGGTGGTATCTTG

c K V Q K S F E V P Q A K A Q M P T I E R -
GAGCAACCTTGACAAGAGATTCTACCTCTTTCTGGCAATGACTCGAGCACCACCACC
30 6481 -----+-----+-----+-----+-----+ 6540
CTCGTTGGAACTGTCTCTAAGATGGAGAAAGGACCGTTAACTGAGCTCGTGGTGGTGG

c A T L T R D F Y L F P G N * L E E H H H H -
ACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTTGCTGCCA
40 6541 -----+-----+-----+-----+-----+ 6600
TGGTGGTGACTCTAGGCCGACGATTGTTCGGGCTTTCCTTCGACTCAACCGACGACGGT

c H H * D P A A N K A R K E A E L A A A T -
F7 Terminator
CCGCTGAGCAATACTAGCATACCCCTTGGGGCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTT
45 6601 -----+-----+-----+-----+-----+ 6660
GGCGACTCGTATTGATCGTATTGGGGAACCCCGAGATTTCCTCAGAACTCCCCAAAA

c A E Q * L A * P L G A S K R V L R G F L -
50

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

FIGURE 18.

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

48

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

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

49

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

50

52

5324 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5383
aGCATTAAATTTACTGGTCCAGGATAAATAGCTGGTTCCCTTAGCAGGTGATAAGCTCCT
b R N L N D Q V L F I D Q G N R P L F E D -
5 CATGACAGACAGTGTGACTGCCGAGACAAATGCCCGCGGAACCATTTTCATTATATCTATGTA
5384 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5443
GTACTGTCTGTCACTGACGGCTCTGTACGCGCGCTTGGTAaAGTAATATAGATACAT
10 b M T D S D C R D N A P R T I F I I S M Y -
CAAGGATTCTCAGCCGCGCGGAATGGCCGTAACATTTCTGTCAAATGTGAAAAGATATC
5444 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5503
GTTCTTAAGAGTCGGCGCGCCTTACCGGCATTGATAAAGACAGTTTACACTTTTCTATAG
15 b K D S Q P R G M A V T I S V K C E K I S -
CACGCTGTCTGTGAGAACAAgATTATAGTTTCAAAGAGATGAATCCGCCGGATAATAT
5504 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5563
GTGCGACAGCACACTCTTGTCTAaTAaTCAAAGTTTCTCTACTTAGGCGGCCTATTATA
20 b T L S C E N K I I S F K E M N P P D N I -
CAAGGACACGAAGTCTGATATCATATTTTTCCAGCGCAGCGTGCCGGGGCAGATAACAA
5564 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5623
GTTCTGTGCTTCAGACTATAGTATAAAAAGGTGCGGTGCGACGGCCCCGTGCTATTGTT
b K D T K S D I I F F Q R S V F G H D N K -
30 GATGCAATTTGAATCATCCAGCTATGAAGGTACTTTCTTGCATGCGAGAAGGAACCGGA
5624 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5683
CTACGTTAAACTTAGTAGGTGATACTTCCCATGAAGAAGCTACGCTCTTCCTTGGCGT
b M Q F E S S S Y E G Y F L A C E K E R D -
35 TCTCTTTAAACTTATTTTAAAGAAAGAGGACGAGCTAGGCGATCGCAGCATATGTTTCAC
5684 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5743
AGAGAAATTTGAATMAAATTTCTTTCTCTGCTCGATCCGCTAGCGTCGTAaTACAAGTG
40 b L F K L I L K K E D E L G D R S I M F T -

47
53

Defective Shine-Dalgarno Start of Upb-1

TGTCCAAAATGAAGACTAGTggggatataaTACCAgGaatasaataaatccatgggcca
5744 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5803
ACAGGTTTTACTTCTGATCACctcctatatattATGGTcCttatttatttttaggtacccggt

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

tcacatcatcatcatcatggcATGGATGAAAGCAGATAAACAGTTTATTACAATTTTATT
5804 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5863
agtagtagtagtagtagtaccgTACCTACTTTCGTTCTATTGTCAAATAATGTTAAAAATAA

10
b K H H H H G M D E S K I N S L L Q F L F -

TGGTTCOCACAGGATTTTTTGAGAAATTTTAAACTTGGAGTAACAACAATAACAATCT
15 5864 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5923
ACCAAGGGCTGTCTTAAAAAACTCTTTAAATTTTGAACCTCATGTTGTTATTGTTAGA

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

20
ATCGATTTATTATTAAATTTTTGGCATAGTAGTATTTTTTTATAAAAAACCAGACCATCT
5924 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 5983
TAGCTAATAAATAATTAAAAACCGTATCATCAAAAAAATATTTTTTGGTCTGGTAGA

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

25
AAACTACATTGTTGAGAGCGTTAGTGAATGACAACAACCTTCAGAAATAATAATAGCCT
5984 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6043
TTTGAATGTAACAACCTCTCGCAATCACTTTACTGTGTTTGAAGTCTTTATTATTATCGGA

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

TAGCCGTTGGTTGCCAGAGTAAGTTTACCCACTTAGACGAAGAGATCTTGAAAAGAGG
6044 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6103
ATCGGCAACCAACGGGCTTCATTCAATGGGTGAATCTGCTTCTTAGAATCTTTCTCC

35
b S R W L P R S K F T H L D E E I L K R G -

TGTTTCATTGCTGGTTTAAATTAATGATGTAACACTTGTTTATGAACCTCTGTTTSCA
6104 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6163
ACCAAGTAACGACCAATCAATTACTACCATTTGTGAACAAATACTTGAGACAAAACGT

40
b G F I A G L V N D G N T C F M N S V L Q -

55

6584 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6643
CAACCTTTTCATTGCAATTTAGTAACCTTATGACTTTTGTATCTATGGTGAGGTCAACGCTT
b L E S N V K S L N T E K L D T T P V A K -
5 ATCAGAAATTACCCGATGATGCTTTAGTAGGTCAACTTAACCTTGGTGAAATTGGCACTGT
6644 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6703
TAGTCTTAATGGGCTACTACGAAATCATCCAGTTGAATTGGAACCACTTCAACCGTGACA
10 b S E L P D D A L V G Q L N L G E V G T V -
TTACATTCCAACCTGAACAGATTGATCCTAACTCTATACTACATGACAAGTCCATTCAAAA
6704 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6763
AAATGTAAAGTTGACTTGTCTAACTAGGATTGAGATATGATGTACTGTTTCAGGTAAGTTTT
15 b Y I P T E Q I D F N S I L H D K S I Q N -
TTTCACACCTTTCAAACTAATGACTCCTTTAGATGGTATCACGGCAGAAAGAATTGGTGTG
6764 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6823
AAAGTGTGGAAAGTTTGATTACTGAGGAAATCTACCATAGTGCCGTCTTTCTTAACCAAC
20 b F T F F K L M T P L D G I T A E R I G C -
TTTACAGTGTGGTGAGAACGGTGGCATAAGATATTCCGTATTTTCGGGATTAAAGCTTAAA
6824 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6883
AAATGTACACCACTCTTGGCCACCGTATTCTATAAGGCATAAAAGCCCTAATTGGAATTT
25 b L Q C G E N G G I R Y S V F S G L S L N -
TTTACCGAACGAGAAATATTGGTTCCACTTTAAAATTATCTCAGTTATTAGCGACTGGAG
6884 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 6943
AAATGGCTTGCTCTTTATAACCAAGGTGAAATTTTAATAGAGTCAATTAAGTGGCTGACCTC
30 b L P N E N I G S T L K L S Q L L S D W S -
TAAACCTGAAATCATCGAAGTCTGAGAATGTAACCGTTGTGCCCCCTCACAGCAGCGCACTC
6944 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 7003
ATTGTGACTTTAGTAGCTTCAGCATCTTACATTGGCAACACGGGAGTGTCTGCGCGTGG
40 b K F E I I E V V E C M R C A L T A A H S -
TCATTATTATTGGTCAGTTGAAGAATTTGAAAAAAAAAAGCTGAGGGTTCGATCCCAGAAAA
7004 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 7063

5b
45

AGTAAATAAACCAGTCAACTTTCTTAAACTTTTTTTGGACTCCCAAGCTAGGGTCTTTT

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

5

GCCAATTAAAGCTGTAAAGATAGGGTCCATCAAATCGAAGAAGTTCTTGCCAAACCAGT

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

CGGTAAATTGCGACATTTTCTATCCCAGGTAGTTTAGCTTCTTCAAGAACGGTTTGGTCA

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

10

TATTGACGATGAAGATTATAAGAAGTTGCATACAGCAAAATATGGTACGTAAATGCTCTAA

7124 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 7183

ATAACTGCTACTTCTAATATTCTTCAACGTATGTGTTTATACCATGCATTACGAGATT

15

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

ATCTAAGCAGATTTTAATATCAAGACCTCCACCATTATTATCCATTATATCAACAGATC

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

TAGATTCTGCTAAAATTATAGTTCTGGAGGTGGTAATAATAGGTAAGTATAGTTGTCTAG

20

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

CGTATTTGATCCAAAGACGTACATGATTAGAAAAAATAACTCGAAAGTATTGTTAAGTC

7244 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 7303

25

GCATAAAGTAGGTTCTTGCAATGACTAATCTTTTTTATGAGCTTTCATAACAAATTCAG

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

AACGTTGAATCTTGCCCTTGGTGTGTTGATATTAATGAATCAATTTGGATGCTCGTTT

30

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

TTGCAACTTAGAAGCGGGGACCACAACACTATATTACTTTAGTTAAACCTACGAGCAA

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

35

GCCAATGTCAAAAAGGAAAAAGCTGCGCAACAGATTCAAGTGAAGATGAAAACATTGG

7364 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 7423

CGGTACAGTTTCTTCTTTTTCGACGCGTTGTTCTAAGTTCACTTCTACTTTGTAAAC

40

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

CGGTGAATACTATACGAATTACATGAACGCTTCGAGCAGGAATTTGAAGACAGCGAGGA

7424 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 7483

GCCACTTATGATATGCTTTAATGTACTTGCBAAGCTCGTCTTAAACTTCTGTGCTCCT

5X
16
17

b G E Y Y T K L E E R F E Q E F E D S E E -

5 7484 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 7543

 AGAAAAAGATACGATGACGACAGAGGGAACATATCGCTCTCATTACAATCATACCAGGA

 TCTTTTCTTATGCTACTGCGTCTCCCTTGATACGCAAGTAATGTTAGTATGGTTCT

b E K E Y D D A E G N Y A S H Y N E T K D -

10 7544 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 7603

 TATCAGTAACATATGATCCCCTAACCGGTGAAGTCGATGGCGTGACATCCGATGATGAAGA

 ATAGTCATTGATACTAGGGGATTTGCCACTTCAGCTACCGCACTGTAGGCTACTACTTCT

b I S N Y D P L N G E V D G V T S D D E D -

15 7604 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 7663

 TGAGTACATTGAAGAAACCGATGCTTTAGGGAATACAATCAAAAAAGGATCATAGAACA

 ACTCATGTAACTTCTTTGGCTACGAAATCCCTTATGTTAGTTTTTTTCTCTAGTATCTTGT

20 b E Y I E E T D A L G N T I K K R I I E H -

 TTCTGATGTTGAAAACGAGAAATGTAAAAGATAATGAAGAACTGCAAGAAATCGACAATGT

 AAGACTACAACCTTTTGCTCTTACATTTTCTATTACTTCTTGACGTTCTTTAGCTTTACA

25 b S D V E N E N V K D W E E L Q E I D N V -

 GAGCCTTGACGAACCAAGATCAATGTTGAAGATCAACTAGAACAATCATCTGATGAGGA

 CTCGAACTGCTTGGTTTCTAGTTACAACCTTCTAGTTGATCTTTGTAGTAGACTACTCTCT

30 7724 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 7783

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

 AGATGTTATACCAGCTCCACCTATCAATTATGCTAGGTCATTTTCCACAGTTCCAGCCAC

35 7784 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 7843

 TCTACAATATGCTCGAGGTGGATAGTTAATACGATCCAGTAAAAGGTGTCAGGTGGTG

b D V I P A P P I N Y A R S P S T V P A T -

40 7844 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 7903

 TCCATTGACATATTCATTGCGCTCTGTCATTTGTTCACTACGGTACCCATAATTATGGTCA

 AGGTAACGTATATAGTAACGCGAGACAGTAACAGTGATGCCATGGGTATTAATACAGT

58
5

b P L T Y S L R S V I V E Y G T H N Y G H -
TTACATTGCATTTAGAAAATACAGGGTTGTTGGTGGAGAATATCTGATGAGACTGTGTA
7904 -----+-----+-----+-----+-----+----- 7963
5 AATGTAAAGTAAATCTTTTATGTCCCAACAACCACCTCTTATAGACTACTCTGACACAT
b Y I A F R K Y R G C W W R I S D E T V Y -
CGTTGTGGACGAAGCTGAAGTCCTTTCAACACCCGGTGTATTATGTTATTTTACGAATA
10 7964 -----+-----+-----+-----+-----+----- 8023
GCAACACCTGCTTCGACTTCAGGAAAGTTGTGGGCCACATAAATACAAATAAAATGCTTAT
b V V D E A E V L S T P G V F M L F Y E Y -
TGACTTTGATGAAGAACTGGGAAGATGAAGGATGATTTCGAAGCTATTTCAGAGTAATAA
15 8024 -----+-----+-----+-----+-----+----- 8083
ACTGAAGTACTTCTTTGACCCCTTCTACTTCCTACTAAACCTTCGATAAGTCTCATTATT
b D F D E E T G K M K D D L E A I Q S N N -
TGAAAGAGATGATGAAAAAGAGCAGGAGCAAAAAGGAGTCCAGGAGCCAAAAGAAAGCCA
20 8084 -----+-----+-----+-----+-----+----- 8143
ACTTCTTCTACTACTTTTCTCTGCTCTGTTTTCCTCAGGTCTCTGGTTTCTCTTCTGGT
25 b E E D D E K E Q E Q K G V Q E P K E S Q -
AGAGCAAGGAGAAGCTGAAGAGCAAGAGGAAGTCAAGAGCAGATGAAGTTGAGAGAAAC
8144 -----+-----+-----+-----+-----+----- 8203
TCTCGTTCTCTCTCCACTTCTGTTCTCTCTCCAGTTCTCGTCTACTTCAAGCTCTCTTG
30 b E Q G E G E E Q E E G Q E Q M K F E R T -
AGAGACCATAGAGATATTCTGTAAAGATGTAAACTAAGCTCGAGCACCAACCACCACC
8204 -----+-----+-----+-----+-----+----- 8263
35 TCTTCTGGTATCTCTATAAAGACCATTCTTACATTGATTTCGAGCTCGTGGTGGTGGTGG
b E D H R D I S G K D V N
ACCACAGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCG
40 8264 -----+-----+-----+-----+-----+----- 8323
TGGTGACTCTAGGCCGACGATTGTTTCGGGCTTTCCTTCGACTCAACCGACGAGCGTGGC

59
58

b

57 Terminator Sequence

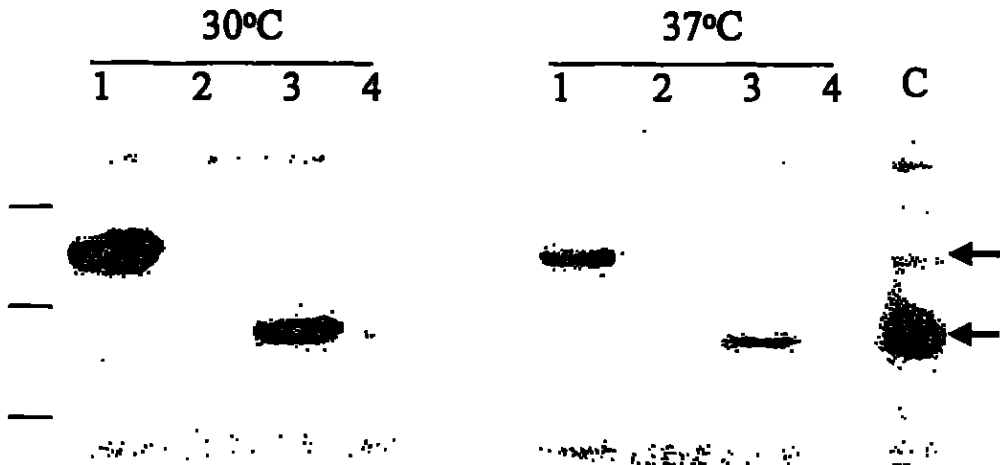
CTGAGCAATAAC TAGCATAACCCCTTGGGGCCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTG

8324 ----- 8382

GACTCGTTATTGATCGTATTGGGGAACCCCGAGATTGCCCAAGAACTCCCCAAAAAAC

5

FIGURE 20.



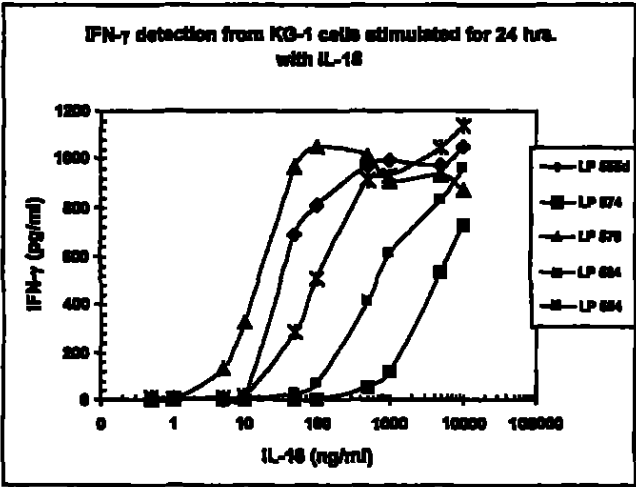
- 1. Ub-human IL18, 3 hours
- 2. Ub-human IL18/Ubp-1, 0 hours
- 3. Ub-human IL18/Ubp-1, 3 hours
- 4. Ub-human IL18/Ubp-1, 18 hours

C. Control- ProIL18/Casp 4

Western: Anti IL18

60
\$7

FIGURE 21:



5

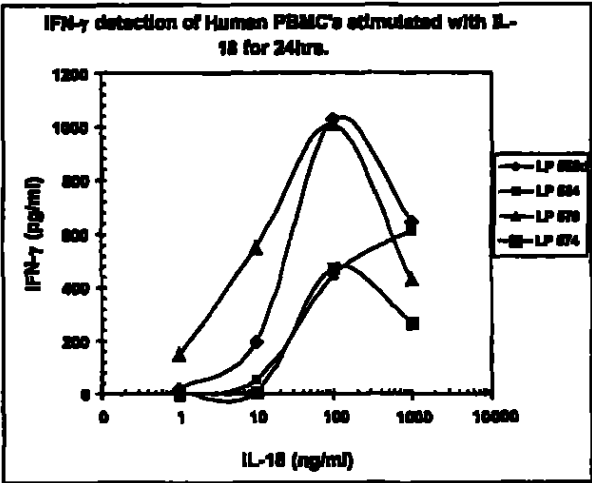
Description of different human/murine IL-18 samples (different lots/constructs)

LP555d (standard) E. COLI ICE-CLEAVED (<i>IN VITRO</i>)
LP 554 E. coli murine IL-18 Ice-cleaved (<i>IN VITRO</i>)
LP559 E. coli expressed mature IL-18 containing N-terminal methionine
LP574 E. coli expressed mature IL-18 containing N-terminal Methionine
LP579 Pichia expressed, secreted, mature IL18
LP584 E.coli IL-18/ICE bicistronic co-expression (<i>IN VIVO</i>)
LP594 E. coli ICE-cleaved (<i>IN VITRO</i>)
LP613 E. coli caspase 4 cleaved (<i>IN VITRO</i>)
LP614 E. coli ICE co-expressed (<i>IN VITRO</i>)
LP623 caspase 4 co-expressed (<i>IN VIVO</i>)

10

61
60

Figure 22



5

Description of different human/murine IL-18 samples (different lots/constructs)

LP554d (standard) E. COLI ICE-CLEAVED (<i>IN VITRO</i>)
LP 554 E. coli murine IL-18 Ice-cleaved (<i>IN VITRO</i>)
LP559 E. coli expressed mature IL-18 containing N-terminal methionine
LP574 E. coli expressed mature IL-18 containing N-terminal Methionine
LP579 Pichia expressed, secreted, mature IL18
LP584 E.coli IL-18/ICE bicistronic co-expression (<i>IN VIVO</i>)
LP594 E. coli ICE-cleaved (<i>IN VITRO</i>)
LP613 E. coli caspase 4 cleaved (<i>IN VITRO</i>)
LP614 E. coli ICE co-expressed (<i>IN VITRO</i>)
LP623 caspase 4 co-expressed (<i>IN VIVO</i>)

10

15

SEQUENCE LISTING

5

<110> SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION

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

10

<130> P51137

<140> TO BE ASSIGNED

<141> Herewith

15

<150> 60/211,832

<151> 2000-06-15

<150> 60/224,128

<151> 2000-08-10

20

<150> 60/264,923

<151> 2001-01-30

<160> 12

25

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 193

30

<212> PRT

<213> Homo sapien

<400> 1

Met Ala Ala Glu Pro Val Glu Asp Asn Cys Ile Asn Phe Val Ala Met
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

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

20

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

		<400> 2						
25		atggctgctg	aaccagtaga	agacaattgc	atcaactttg	tggcaatgaa	at ttatttgac	60
		aatacgcttt	actttatagc	tgaagatgat	gaaaacctgg	aatcagatta	ctttggc aag	120
		cttgagagca	aactatcgg	cattcgtaat	ttaa atgacc	aggctctatt	tatcgaccaa	180
		gggaatcgtc	cactatttga	ggacatgaca	gacagtgact	gccgagacaa	tgcgccgcga	240
		accattttca	ttatatctat	gtacaaggat	tctcagccgc	gcggaatggc	cgtaactatt	300
30		tctgtcaaat	gtgaaaagat	atccacgctg	tcgtgtgaga	acaagattat	tagtttcaaa	360
		gagatgaatc	cgccggataa	tatcaaggac	acgaagtctg	atatcatatt	tttccagcgc	420
		agcgtgccgg	ggcacgataa	caagatgcaa	tttgaatcat	ccagctatga	agggtacttt	480
		cttgcatgcg	agaaggaacg	cgatctcttt	aaacttattt	taaagaaaga	ggacgagcta	540
		ggcgatcgca	gcattatgtt	cactgtccaa	aatgaagact	ag		582

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

40 <400> 3

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn
1 5 10 15

Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp

				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	
5		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		
10	Ser	Asp	Ile	Ile	Phe	Phe	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	His	Asp	Asn	Lys	
				100					105					110			
	Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ala	Cys	Glu	
			115					120					125				
	Lys	Glu	Arg	Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Glu	Asp	Glu	Leu	
15		130					135					140					
	Gly	Asp	Arg	Ser	Ile	Met	Phe	Thr	Val	Gln	Asn	Glu	Asp				
	145					150					155						

20 <210> 4
 <211> 282
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

		<400> 4															
25	Met	Gly	His	His	His	His	His	His	Gly	Ala	Leu	Lys	Leu	Cys	Pro	His	
	1				5					10					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	
30			35					40					45				
	Thr	Glu	Phe	Asp	His	Leu	Pro	Pro	Arg	Asn	Gly	Ala	Asp	Phe	Asp	Ile	
	50						55				60						
	Thr	Gly	Met	Lys	Glu	Leu	Leu	Glu	Gly	Leu	Asp	Tyr	Ser	Val	Asp	Val	
	65					70				75					80		
35	Glu	Glu	Asn	Leu	Thr	Ala	Arg	Asp	Met	Glu	Ser	Ala	Leu	Arg	Ala	Phe	
					85					90					95		
	Ala	Thr	Arg	Pro	Glu	His	Lys	Ser	Ser	Asp	Ser	Thr	Phe	Leu	Val	Leu	
				100					105					110			
	Met	Ser	His	Gly	Ile	Leu	Glu	Gly	Ile	Cys	Gly	Thr	Val	His	Asp	Glu	
40			115					120					125				
	Lys	Lys	Pro	Asp	Val	Leu	Leu	Tyr	Asp	Thr	Ile	Phe	Gln	Ile	Phe	Asn	
	130						135				140						
	Asn	Arg	Asn	Cys	Leu	Ser	Leu	Lys	Asp	Lys	Pro	Lys	Val	Ile	Ile	Val	

65
64

	145		150		155		160									
	Gln	Ala	Cys	Arg	Gly	Ala	Asn	Arg	Gly	Glu	Leu	Trp	Val	Arg	Asp	Ser
					165				170					175		
	Pro	Thr	Ser	Leu	Glu	Val	Ala	Ser	Ser	Gln	Ser	Ser	Glu	Asn	Leu	Glu
5				180					185					190		
	Glu	Asp	Ala	Val	Tyr	Lys	Thr	His	Val	Glu	Lys	Asp	Phe	Ile	Ala	Phe
				195					200					205		
	Cys	Ser	Ser	Thr	Pro	His	Asn	Val	Ser	Trp	Arg	Asp	Ser	Thr	Met	Gly
		210						215					220			
10	Ser	Ile	Phe	Ile	Thr	Gln	Leu	Ile	Thr	Cys	Phe	Gln	Lys	Tyr	Ser	Trp
		225					230					235				240
	Cys	Cys	His	Leu	Glu	Glu	Val	Phe	Arg	Lys	Val	Gln	Gln	Ser	Phe	Glu
				245					250					255		
	Thr	Pro	Arg	Ala	Lys	Ala	Gln	Met	Pro	Thr	Ile	Glu	Arg	Leu	Ser	Met
15				260					265					270		
	Thr	Arg	Tyr	Phe	Tyr	Leu	Phe	Pro	Gly	Asn						
				275					280							

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

25 <400> 5

atggggccatc	atcatcatca	tcatggcgcc	ctcaagcttt	gtcctcatga	agaattcctg	60
agaactatgta	aagaaagagc	tgaagagatc	tatccaataa	aggagagaaa	caaccgcaca	120
cgcctggctc	tcatcatatg	caatacagag	tttgaccatc	tgcctccgag	gaatggagct	180
gactttgaca	tcacagggat	gaaggagcta	cttgagggtc	tggaactatag	tgtagatgta	240
gaagagaatc	tgacagccag	ggatgatggag	tcagcgctga	gggcatttgc	taccagacca	300
30 gagcacaagt	cctctgacag	cacattcttg	gtactcatgt	ctcatggcat	cctggaggga	360
atctgcgga	ctgtgcatga	tgagaaaaaa	ccagatgtgc	tgctttatga	caccatcttc	420
cagatattca	acaaccgcaa	ctgcctcagt	ctgaaggaca	aaccaaggt	catcattgtc	480
caggcctgca	gaggtgcaaa	ccgtggggaa	ctgtgggtca	gagactctcc	agcatccttg	540
gaagtggcct	cttcacagtc	atctgagaac	ctggaggaag	atgctgttta	caagaccac	600
35 gtggagaagg	acttcattgc	tttctgctct	tcaacgccac	acaacgtgtc	ctggagagac	660
agcacaatgg	gctctatctt	catcacacaa	ctcatcacat	gcttccagaa	atattcttgg	720
tgctgccacc	tagaggaagt	atttcggaag	gtacagcaat	catttgaaac	tccaagggcc	780
aaagctcaaa	tgcccaccat	agaacgactg	tccatgacaa	gatatttcta	cctctttcct	840
ggcaattga						849

40 <210> 6
 <211> 282
 <212> PRT

66
65

<213> Homo sapien

<400> 6

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

<210> 7

<211> 849

<212> DNA

67
46

<213> Homo sapien

<400> 7

5 atggggccatc atcatcatca tcatggcata ctcaaacttt gtccctcgtga agaattcctg 60
agactgtgta aaaaaaatca tgatgagatc tatccaataa aaaagagaga ggaccgcaga 120
cgcttggtc tcatcatatg caatacaaag tttgatcacc tgcttgcaag gaatggggct 180
cactatgaca tcgtggggat gaaaaggctg cttcaaggcc tgggctacac tgtggttgac 240
gaaaagaatc tcacagccag ggatatggag tcagtgtcga gggcatttgc tgccagacca 300
gagcacaagt cctctgacag cacgttcttg gtactcatgt ctcatggcat cctagagggg 360
10 atctgcggaa ctgcgcataa aaagaaaaaa ccggatgtgc tgctttatga caccatcttc 420
cagatattca acaaccgcaa ctgcctcagt ctaaaggaca aaccaagggt catcattgtc 480
caggcctgca gaggtgaaaa acatggggaa ctctgggtca gagactctcc agcatccttg 540
gcagtcatct cttcacagtc atctgagaac ctggaggcag attctgtttg caagatccac 600
gaggagaagg acttcattgc tttctgttct tcaacaccac ataacgtgtc ctggagagac 660
15 cgcacaaggg gctccatctt cattacggaa ctcatcacat gcttccagaa atattcttgc 720
tgctgccacc taatggaaat atttcggaag gtacagaaat catttgaagt tccacaggct 780
aaagcccaga tgcccacat agaacgagca accttgacaa gagatttcta cctcttctct 840
ggcaattga 849

20

<210> 8

<211> 1743

<212> DNA

<213> Homo sapien

25

<400> 8

agatctcgat cccgcgaat taatacgact cactataggg gaattgtgag cggataacaa 60
ttcccctcta gaccacacct taaggaggat ataacatag gctgctgaac cagtagaaga 120
caattgcac aactttgtgg caatgaaatt tattgacaat acgctttact ttatagctga 180
agatgatgaa aacctggaat cagattactt tggcaagctt gagagcaaac tatcggtcat 240
30 tcgtaattta aatgaccagg tcctatttat cgaccaaggg aatcgctccac tattcgagga 300
catgacagac agtgactgcc gagacaatgc gccgcgaacc attttcatta tatctatgta 360
caaggattct cagccgcgcg gaatggccgt aactatttct gtcaaatgtg aaagatatc 420
cacgctgtcg tgtgagaaca agattattag tttcaaagag atgaatccgc cggataatat 480
caaggacacg aagtctgata tcatatTTTT ccagcgcagc gtgccggggc acgataacaa 540
35 gatgcaattt gaatcatcca gctatgaagg gtactttctt gcatgcgaga aggaacgcga 600
tctctttaa cttattttta agaaagagga cgagctaggc gatcgcagca ttatgttcac 660
tgtccaaat gaagactagt ggaggatata ataccaggaa taaataaaat ccatgggcca 720
tcatcatcat catcatggcg cctcaagct ttgtcctcat gaagaattcc tgagactatg 780
taaagaaaga gctgaagaga tctatccaat aaaggagaga aacaaccgca cagcctggc 840
40 tctcatcata tgcaatacag agtttgacca tctgcctccg aggaatggag ctgactttga 900
catcacaggg atgaaggagc tacttgaggg tctggactat agtgtagatg tagaagagaa 960
tctgacagcc agggatatgg agtcagcgtc gagggcattt gctaccagac cagagcaca 1020
gtcctctgac agcacattct tgggtactcat gtctcatggc atcctggagg gaatctgcgg 1080

62
5

aactgtgcat gatgagaaaa aaccagatgt gctgctttat gacaccatct tccagatatt 1140
 caacaaccgc aactgcctca gtctgaagga caaaccgaag gtcattcattg tccaggcctg 1200
 cagaggtgca aaccgtgggg aactgtgggt cagagactct ccagcatcct tggaaagtggc 1260
 ctcttcacag tcatctgaga acctggagga agatgctgtt tacaagaccc acgtggagaa 1320
 5 ggacttcatt gctttctgct cttcaacgcc acacaacgtg tcttgagag acagcacaat 1380
 gggctctatc ttcacacac aactcatcac atgcttccag aaatattctt ggtgctgcca 1440
 cctagaggaa gtatttcgga aggtacagca atcatttgaa actccaaggg ccaaagctca 1500
 aatgccacc atagaacgac tgtccatgac aagatatttc tacctctttc ctggcaattg 1560
 aaaatggatc cgaattcgag ctccgtcgac aagcttgagg ccgactcga gcaccaccac 1620
 10 caccaccact gagatccggc tgctaacaaa gcccgaaagg aagctgagtt ggctgctgcc 1680
 accgctgagc aataactagc ataaccctt ggggcctcta aacgggtctt gaggggtttt 1740
 ttg 1743

<210> 9

15 <211> 1464

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 9

20 atggctgctg aaccagtaga agacaattgc atcaactttg tggcaatgaa atttattgac 60
 aatacgcttt actttatagc tgaagatgat gaaaacctgg aatcagatta ctttggcaag 120
 cttgagagca aactatcggc cattcgtaat ttaaatgacc aggtcctatt tatcgaccaa 180
 gggaaatcgtc cactattcga ggacatgaca gacagtgact gccgagacaa tgcgccgcga 240
 accattttca ttatatctat gtacaaggat tctcagccgc gcggaatggc cgtaactatt 300
 25 tctgtcaaat gtgaaaagat atccacgctg tctgtgaga acaagattat tagtttcaaa 360
 gagatgaatc cgccggataa tatcaaggac acgaagtctg atatcatatt tttccagcgc 420
 agcgtgccgg ggcacgataa caagatgcaa tttgaatcat ccagctatga agggtaacttt 480
 cttgcatgag agaaggaaacg cgatctcttt aaacttattt taaagaaaga ggacgagcta 540
 ggcgatcgca gcattatgtt cactgtccaa aatgaagact agtggaggat ataataccag 600
 30 gaataaataa aatccatggg ccatcatcat catcatcatg gcatactcaa actttgtcct 660
 cgtgaagaat tcttgagact gtgtaaaaaa aatcatgatg agatctatcc aataaaaaag 720
 agagaggacc gcagacgcct ggctctcatc atatgcaata caaagtttga tcacctgcct 780
 gcaaggaatg gggctcacta tgacatcgtg gggatgaaaa ggctgcttca aggcctgggc 840
 tacactgtgg ttgacgaaaa gaatctcaca gccagggata tggagtcagt gctgagggca 900
 35 tttgctgcca gaccagagca caagtctctt gacagcacgt tcttgggtact catgtctcat 960
 ggcattcctag agggaaatctg cggaaactgcg cataaaaaga aaaaaccgga tgtgctgctt 1020
 tatgacacca tcttccagat attcaacaac cgcaactgcc tcagtctaaa ggacaaaccc 1080
 aaggatcatca ttgtccaggc ctgcagaggc gaaaaacatg gggaaactctg ggtcagagac 1140
 tctccagcat ccttggcagt catctcttca cagtcatctg agaacctgga ggcagattct 1200
 40 gtttgcaaga tccacgagga gaaggacttc attgctttct gttcttcaac accacataac 1260
 gtgtcctgga gagaccgcac aaggggctcc atcttcatta cggaaactcat cacatgcttc 1320
 cagaaatatt cttgctgctg ccacctaattg gaaatatttc ggaaggtaca gaaatcattt 1380
 gaagttccac aggctaaagc ccagatgccc accatagaac gagcaacctt gacaagagat 1440

ttctacctct ttctggcaa ttga

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

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

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

70
79

<400> 11

atgcagatct tcgtcaagac gttaaccggg aaaaccataa ctctagaagt tgaatcttcc 60
gataccatcg acaacgttaa gtcgaaaatt caagacaagg aaggcattcc acctgatcaa 120
5 caaagattga tctttgccgg taagcagctc gaagacggta gaacgctgtc tgattacaac 180
attcagaagg agtcgacctt acatcttgtc ttaagactaa gaggagggtta ctttggcaag 240
cttgagagca aactatcggg cattcgtaat ttaaatgacc aggtcctatt tatcgaccaa 300
gggaatcgtc cactattcga ggacatgaca gacagtgact gccgagacaa tgcgccgcga 360
accattttca ttatatctat gtacaaggat tctcagccgc gcggaatggc cgtaactatt 420
10 tctgtcaaat gtgaaaagat atccacgctg tcgtgtgaga acaagattat tagtttcaaa 480
gagatgaatc cgccggataa tatcaaggac acgaagtctg atatcatatt tttccagcgc 540
agcgtgccgg ggcacgataa caagatgcaa tttgaatcat ccagctatga agggtaacttt 600
cttgcattgcg agaaggaacg cgatctcttt aaacttattt taaagaaaga ggacgagcta 660
ggcgatcgca gcattatgtt cactgtccaa aatgaagact ag 702

15

<210> 12

<211> 3419

<212> DNA

<213> Homo sapien

20

<400> 12

agatctcgat cccgcgaaat taatacgact cactataggg gaattgtgag cggataacaa 60
ttcccctcta gaccacacct taaggaggat ataacatatg cagatcttcg tcaagacgtt 120
aaccggtaaa accataactc tagaagttga atcttccgat accatcgaca acgttaagtc 180
25 gaaaattcaa gacaaggaag gcattccacc tgatcaacaa agattgatct ttgccggtaa 240
gcagctcgag gacggtagaa cgctgtctga ttacaacatt cagaaggagt cgaccttaca 300
tcttgtctta agactaagag gagggtactt tggcaagctt gagagcaaac tatcggtcat 360
tcgtaattta aatgaccagg tcctatttat cgaccaaggg aatcgtccac tattcgagga 420
catgacagac agtgactgcc gagacaatgc gccgcgaacc attttcatta tatctatgta 480
30 caaggattct cagccgcgcg gaatggcogt aactatttct gtcaaattgtg 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 cgagctaggc gatcgagca ttatgttcac 780
35 tgtccaaat gaagactagt ggaggatata ataccaggaa taaataaat ccatgggccca 840
tcatcatcat catcatggca tggatgaaag caagataaac agttttattac aatttttatt 900
tggttcccga caggattttt tgagaaattt taaaacttgg agtaacaaca ataacaatct 960
atcgatttat ttattaattt ttggcatagt agtatttttt tataaaaaac cagaccatct 1020
aaactacatt gttgagagcg ttagtgaaat gacaacaaac ttcagaaata ataatagcct 1080
40 tagccgttgg ttgcccgaa gtaagtttac ccacttagac gaagagatct tgaaaagagg 1140
tggtttcatt gctggttttag ttaatgatgg taacacttgt tttatgaact ctgttttgca 1200
atcattggca tcatccagag aattaatgga gttcttggac aataatgtca taaggaccta 1260
tgaggagata gaacaaatg aacacaatga agaaggaaac gggcaagaat ctgctcaaga 1320

7/20

	tgaagccact	cataagaaaa	acactcgtaa	gggtggcaaa	gtttatggta	agcataagaa	1380
	gaaattgaat	aggaagtcaa	gttcgaaaga	agacgaagaa	aagagccagg	agccagatat	1440
	cacttttcagt	gtcgccttaa	gggatctact	ttctgcctta	aatgegaagt	attatcggga	1500
	taaaccctat	ttcaaaacca	atagtttatt	gaaagcaatg	tccaaatctc	caagaaaaaa	1560
5	tattcttctt	ggctacgacc	aagaggacgc	gcaagaattc	ttccagaaca	tactagccga	1620
	gttggaagt	aacgttaaat	cattgaatac	tgaaaaacta	gataccactc	cagttgcgaa	1680
	atcagaatta	cccgatgatg	ctttagtagg	tcaacttaac	cttgggtgaag	ttggcactgt	1740
	ttacattcca	actgaacaga	ttgatcctaa	ctctatacta	catgacaagt	ccattcaaaa	1800
	tttcacacct	ttcaaaacta	tgactccttt	agatgggtatc	acggcagaaa	gaattgggtg	1860
10	tttacagtgt	ggtgagaacg	gtggcataag	atattccgta	ttttcgggat	taagcttaaa	1920
	tttaccgaac	gagaatattg	gttccacttt	aaaattatct	cagttattga	gcgactggag	1980
	taaaccctgaa	atcatcgaag	tcgtagaatg	taaccgttgt	gccctcacag	cagcgcactc	2040
	tcattttattt	ggtcagttga	aagaatttga	aaaaaaacct	gaggggttcga	tcccagaaaa	2100
	gccaattaac	gctgtaaaag	atagggtcca	tcaaatacga	gaagttcttg	ccaaaccagt	2160
15	tattgacgat	gaagattata	agaagttgca	tacagcaaat	atggtacgta	aatgctctaa	2220
	atctaagcag	attttaatat	caagacctcc	accattatta	tccattcata	tcaacagatc	2280
	cgtattttgat	ccaagaacgt	acatgattag	aaaaaataac	tcgaaagtat	tgtttaagtc	2340
	aacgttgaat	cttgcccctt	ggtgttgtga	tattaatgaa	atcaatttgg	atgctcgttt	2400
	gccaatgtca	aaaaaggaaa	aagctgcgca	acaagattca	agtgaagatg	aaaacatttg	2460
20	cggtgaatac	tatacgaat	tacatgaacg	cttcgagcag	gaatttgaag	acagcgagga	2520
	agaaaaagaa	tacgatgacg	cagaggggaa	ctatgcgtct	cattacaatc	ataccaagga	2580
	tatcagtaac	tatgatcccc	taaacggtga	agtcgatggc	gtgacatccg	atgatgaaga	2640
	tgagtacatt	gaagaaaccg	atgcttttagg	gaataacaatc	aaaaaaagga	tcatagaaca	2700
	ttctgatgtt	gaaaacgaga	atgtaaaaga	taatgaagaa	ctgcaagaaa	tcgacaatgt	2760
25	gagccttgac	gaaccaaaga	tcaatgttga	agatcaacta	gaacatcat	ctgatgagga	2820
	agatgttata	ccagctccac	ctatcaatta	tgctaggtca	ttttccacag	ttccagccac	2880
	tccattgaca	tattcattgc	gctctgtcat	tgttcaactac	ggtacccata	attatggtca	2940
	ttacattgca	tttagaaaat	acaggggttg	ttgggtggaga	atatctgatg	agactgtgta	3000
	cgttgtggac	gaagctgaag	tcctttcaac	acccggtgta	tttatgttat	tttacgaata	3060
30	tgactttgat	gaagaaactg	ggaagatgaa	ggatgatttg	gaagctattc	agagtaataa	3120
	tgaagaagat	gatgaaaaag	agcaggagca	aaaaggagtc	caggagccaa	aggaagcca	3180
	agagcaagga	gaagggtgaag	agcaagagga	aggtcaagag	cagatgaagt	tcgagagaac	3240
	agaagaccat	agagatattt	ctggtaaaga	tgtaactaa	gctcgagcac	caccaccacc	3300
	accactgaga	tccggctgct	aacaaagccc	gaaaggaagc	tgagttggct	gctgccaccg	3360
35	ctgagcaata	actagcataa	ccccttgggg	cctctaaacg	ggtcttgagg	ggttttttg	3419

71 72

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
27 December 2001 (27.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/98455 A2

- (51) International Patent Classification: C12N
- (21) International Application Number: PCT/US01/18804
- (22) International Filing Date: 11 June 2001 (11.06.2001)
- (23) Filing Language: English
- (24) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60211,832 15 June 2000 (15.06.2000) US
60224,128 10 August 2000 (10.08.2000) US
60264,923 20 January 2001 (20.01.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US):
SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION
[US/US]; One Franklin Plaza, Philadelphia, PA 19103
(US).
- (72) Inventors; and
- (73) Inventors/Applicants (for US only): JOHANSON, Kyung, O. [US/US]; 709 Swedeland Road, King of Prussia, PA 19406-0939 (US). KIRKPATRICK, Robert, R. [US/US]; 709 Swedeland Road, King of Prussia, PA 19406-0939 (US). SHATZMAN, Allan, R. [US/US]; 709 Swedeland Road, King of Prussia, PA 19406-0939 (US). HO, Yen, Sen [US/US]; 362 Old State Road, Berwyn, PA 19312 (US). MCDEVITT, Patrick [US/US]; 709 Swedeland Road, King of Prussia, PA 19406-0939 (US).
- (74) Agents: VENETIANER, Stephen et al.; SmithKline Beecham Corporation, Corporate Intellectual Property, UW2220, 709 Swedeland Road, P.O. Box 1539, King of Prussia, PA 19406-0939 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GR, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TO).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
— with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/98455 A2

(54) Title: METHOD FOR PREPARING A PHYSIOLOGICALLY ACTIVE IL-18 POLYPEPTIDE

(57) Abstract: A method for producing a physiologically active polypeptide, comprising contacting a precursor polypeptide with an activating enzyme, or co-expressing the polypeptide with an activating protease.

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y ~~ADJUNTO~~ DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION	()	()
MODELO DE UTILIDAD	()	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
- Descripción de la invención.	()	()
- Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

ESQUEMA DE TRAZADO ()

- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

Firma Responsable: *LUZENA POX*

Fecha:



73
24

2020
Bogotá, D.C.,

Doctor:
GERMAN CASTILLO GRAU
Apoderado
SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION

Oficio N° 06393

ASUNTO:	Radicación N°	02-113247
	Solicitud internacional	PCT/US2001/018804
	Fecha inicio fase nacional	15/01/2003
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- ☐ La solicitud no contiene la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT).
- ☐ La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 28-k) Decisión 486).
- ☐ El solicitante debe aclarar si la solicitud corresponde al capítulo I o II del PCT por que la indicación en el petitorio no es concordante con los documentos del expediente, en caso necesario adjuntar los documentos respectivos.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

08 AGO. 2003

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha, _____.