



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. **EXPEDIENTE No.**

05-87348

54. **TÍTULO**

Metodos para prevenir la Glucosilación de Proteinas

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE**

Smithkline Beecham Corporation

DOMICILIO

one franklin Plaza P.O Box 7929

74. **APODERADO**

Carlos R. Olarte

22. **BOGOTÁ, D. C.,**

1 DE Septiembre de 2005

OLARTE RAISBECK


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radicación: 85087340 00000000 Folios: 159
Fecha (AÑO): 2005-09-01 10:09:24
Trámite: 811 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAR
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

04-10-05

1 SOLICITUD DE:		
☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.		
☐ Capítulo I. ☒ Capítulo II.		
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: <u>SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION</u> Dirección: <u>One Franklin Plaza P.O. Box 7929 Philadelphia, Pennsylvania 19101, Estados Unidos de América.</u> Nacionalidad o Domicilio: <u>ESTADOUNIDENSE</u> Lugar de Constitución: <u>ESTADOS UNIDOS DE AMERICA</u> Teléfono: _____ Fax: _____ E-mail: _____	IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
3 REPRESENTANTE APODERADO	Nombre: <u>CARLOS R. OLARTE</u> Dirección: <u>World Trade Center Torre A, Calle 100 No. 8A-37 Piso 10</u> Teléfono: <u>601-7700</u> Fax: <u>601-7799</u> E-mail: <u>office@olarteraisbeck.com</u>	IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número <u>79.782.747 Btá TP 74.295</u>
4 INVENTOR (ES) (72)	Nombre: <u>VER PAGINA ADJUNTA</u> Dirección: <u>VER PAGINA ADJUNTA</u> Nacionalidad o Domicilio: <u>VER PAGINA ADJUNTA</u>	
5 PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/US2004/006507</u> Fecha <u>Marzo 4, 2004</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2004/078936</u> Fecha <u>Septiembre 16, 2004</u>		
6 Título (54) <u>METODOS PARA PREVENIR LA GLUCONOILACION DE PROTEINAS</u>		
7 Clasificación Internacional (51) <u>C12N</u> <u>A01N 63/00</u>		
8 Prioridad SI ☒ N ☐	(33) País de Origen <u>US</u>	(32) Fecha <u>Marzo 4, 2003</u>
	(31) Número de Solicitud <u>60/451,686</u>	
9 Comprobante de pago No. <u>64,438</u> Fecha <u>Agosto 25, 2005</u>		

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso.

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☒

Copla de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud Internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copla del examen preliminar Internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar Internacional 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 del 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.

☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud Internacional.

☐

Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: [Signature]

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

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

3

LISTA DE INVENTORES PCT/US2004/006507

ALAN R. GARDNER
709 Swedeland Road
King of Prusia, PA, Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

THOMAS D. SWEITZER
709 Swedeland Road
King of Prusia, PA, Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

ALEXANDER H. TAYLOR
709 Swedeland Road
King of Prusia, PA, Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

PRAMATHESH S. PATEL
709 Swedeland Road
King of Prusia, PA, Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

Handwritten mark resembling a stylized 'H' or 'K'.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 64,438
FECHA : AGOSTO 25 DE 2005

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radiacion : 05067346 00000000
Fecha (AND): 2005-09-01 10:09:24
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE INCI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Folios: 159

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISBERG	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	32743730	24/08/2005	1,616,000.00
OLARTE RAISBERG	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	36577375	24/08/2005	5,650,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
		TOTAL :	\$ 443,000.00

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

Handwritten signature.

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

**APOSTILLA EN PODER DE REPRESENTACIÓN DE
SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION**

PODER DE REPRESENTACION

Bilingüe inglés- español otorgado en Brentford, Middlesex, Inglaterra el 13 de agosto de 2003 y firmado por Peter John Giddings, Apoderado y Funcionario autorizado.

Certificado de Notario De Pinna en español certificando que Peter John Giddings es apoderado de Smithkline Beecham Corporation, firmado por James Kerr Milligan.

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

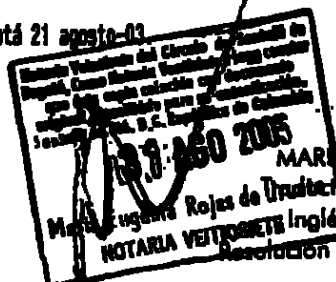
1. País: Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte
- Este documento Público
2. ha sido firmado por James Kerr Milligan
3. Quien ejerce funciones de Notario público
4. Lleva el sello del Notario público

CERTIFICADO

5. En Londres
6. El 14 agosto 2003
7. Por el Secretario de Estado Principal de su Majestad para Asuntos exteriores y de la Mancomunidad
8. No. G229470
9. Gran Sello de la Oficina de Asuntos exteriores y de la Mancomunidad
10. Firma legible de J. Garbrah- Por el Secretario de Estado

Si el documento se usa en un país que no pertenece a la Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961 debe pasar por la sección consular de la Misión que representa el país.

Es traducción fiel del inglés, con copia archivo para confrontación. Bogotá 21 agosto-03



Marlén Neira C
Marlén Neira C

Yo, el infrascrito, **JAMES KERR MILLIGAN**, Notario Público de la Ciudad de Londres, Inglaterra, por la Autoridad Real debidamente admitido y juramentado,

CERTIFICO:

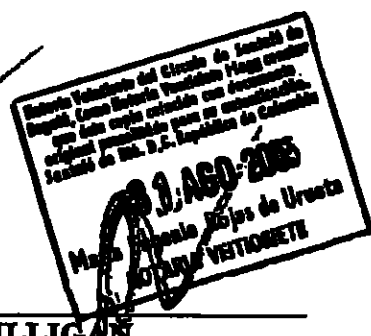
QUE es auténtica la firma "P. Giddings" suscrita al pie del adjunto Poder, por ser del puño y letra del Señor Don **PETER JOHN GIDDINGS**, cuya identidad me consta, Apoderado de la corporación denominada "**SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION**", corporación legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes del Estado de Pensilvania, Estados Unidos de América, con domicilio social en 1, Franklin Plaza, Philadelphia, Pensilvania 19101, Estados Unidos de América;

QUE el citado Señor Don **PETER JOHN GIDDINGS** está debida y suficientemente autorizado para firmar documentos de esta clase, en virtud del Poder otorgado en su favor por la referida Sociedad fechado el 11 de julio de 2002, copia del cual he tenido a la vista.

Y QUE los objetos para los cuales se otorgó dicho Poder se encuentran dentro de los objetos o actividades de la citada Sociedad, de acuerdo con la Escritura Constitutiva y los Estatutos Sociales, los cuales he tenido a la vista.

Y PARA QUE CONSTE donde y como convenga y fuere necesario expido el presente Certificado que firmo y sello en dicha Ciudad de Londres, el día de hoy trece de agosto del año dos mil tres.

JAMES KERR MILLIGAN
Notario Público de Londres, Inglaterra



APOSTILLE
(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by James Kerr Milligan
a été signé par
3. Acting in the capacity of Notary Public
agissant en qualité de
4. Bears the seal/stamp of The Said Notary Public
est revêtu du sceau/timbre de

5. at London/à Londres

Certified/Attesté
6. the/le 14 August 2003

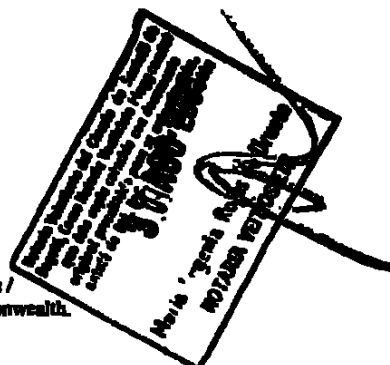
7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No

G229470

9. Stamp:
timbre:

10. Signature: J. Garbrah



For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961,
it should be presented to the consular section of the mission representing that country.

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 No. 8A-55 Piso 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 838-8200
Fax: +57-1 838-8201

www.olarteraisbeck.com

Power of Attorney

The undersigned,

domiciled in

One Franklin Plaza, P O Box 7929, Philadelphia, PA 19101, United States of America
by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck and Ana María Frieri** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents, Utility Models and Industrial Designs in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, appeals, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

Poder

El suscrito,

domiciliado en

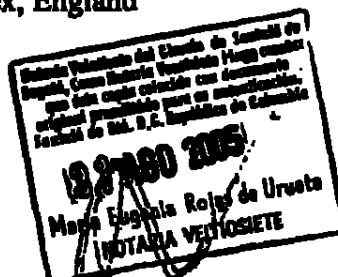
por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck y Ana María Frieri** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de Patentes, Modelos de Utilidad y Diseños Industriales de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, apelaciones, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma:


Peter John GIDDINGS as Attorney and Authorised Official

Date/Fecha: 13 August 2003

City/Country/Ciudad,País: Brentford, Middlesex, England



PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty

For receiving Office use only

International Application No:

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
PU60116

Box No. I TITLE OF INVENTION

METHODS FOR PREVENTING GLYCONOYLATION OF PROTEINS

Box No. II APPLICANT

Name and Address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (the is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

SmithKline Beecham Corporation
One Franklin Plaza, P.O. Box 7929
Philadelphia, Pennsylvania 19101
United States of America

Telephone No. 610-270-7568

Facsimile No. 610-270-5090

State (i.e. country) of nationality:
United States of America

State (i.e. country) of residence:
United States of America

This person is applicant for the purposes of

☐

all designated States

☒

all designated States except the United States of America

☐

the United States of America only

☐

the States indicated in the Supplemental box

Box No. III FURTHER APPLICANTS AND/OR (FURTHER) INVENTORS

Name and Address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (the is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

GARDNER, Alan R.
709 Swedeland Road
King of Prussia, Pennsylvania 19406
United States of America

This person is:

☐ applicant only

☒ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below)

State (i.e. country) of nationality:
United States of America

State (i.e. country) of residence:
United States of America

This person is applicant for the purposes of

☐

all designated States

☐

all designated States except the United States of America

☒

the United States of America only

☐

the States indicated in the Supplemental box

☒

Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☒

agent

☐

common representative

Name and Address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country)

LOCKENOUR, Andrea V.
GLAXOSMITHKLINE
Corporate Intellectual Property, UW2220
709 Swedeland Road, P.O. Box 1539
King of Prussia, Pennsylvania 19406-0939
United States of America

Telephone No.

610-270-7568

Facsimile No.

610-270-5090

Agent's Registration No. with the Office

☐

Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANTS AND/OR (FURTHER) INVENTORS

If none of the following sub-boxes is used, this sheet is not to be included in the request

Name and Address (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (the U.S. country) of residence if no State of residence is indicated below.) SWEITZER, Thomas D. 709 Swedeland Road King of Prussia, Pennsylvania 19406 United States of America		This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below)
State (i.e. country) of nationality: United States of America		State (i.e. country) of residence: United States of America
This person is applicant for the purposes of ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental box		
Name and Address (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (the U.S. country) of residence if no State of residence is indicated below.) TAYLOR, Alexander H. 709 Swedeland Road King of Prussia, Pennsylvania 19406 United States of America		This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below)
State (i.e. country) of nationality: United States of America		State (i.e. country) of residence: United States of America
This person is applicant for the purposes of ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental box		
Name and Address (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (the U.S. country) of residence if no State of residence is indicated below.) PATEL, Pramathesh S. 709 Swedeland Road King of Prussia, Pennsylvania 19406 United States of America		This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below)
State (i.e. country) of nationality: United States of America		State (i.e. country) of residence: United States of America
This person is applicant for the purposes of ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental box		
Name and Address (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (the U.S. country) of residence if no State of residence is indicated below.) 		This person is: ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below)
State (i.e. country) of nationality: 		State (i.e. country) of residence:
This person is applicant for the purposes of ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental box		
Name and Address (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (the U.S. country) of residence if no State of residence is indicated below.) 		This person is: ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below)
State (i.e. country) of nationality: 		State (i.e. country) of residence:
This person is applicant for the purposes of ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental box		

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet

Supplemental Box *If the Supplemental Box is not used, this sheet need not be included in the request*

1. If, in any of the Boxes, the space is insufficient to furnish all the information: in such case, write "Continuation of Box No...." [indicate the number of the Box] and furnish the information in the same manner as required according to the captions of the Box in which the space was insufficient; in particular

- (i) If more than two persons are involved as applicants and/or inventors and no "continuation sheet" is available: in such case, write "Continuation of Box III" and indicate for each additional person the same type of information as required in Box No. III. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below;
 - (ii) If, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the indication "the States indicated in the Supplemental Box" is checked: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes Nos. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the applicant(s) involved and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is inventor;
 - (iii) If, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the inventor or the inventor/applicant is not inventor for the purposes of all designated States or for the purposes of the United States of America: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes Nos. II and III" (as the case may be), indicate the name of the inventor(s) and, next to (each) such name the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is inventor;
 - (iv) if, in addition to the agent(s) indicated in Box No. IV, there are further agents: in such case, write "Continuation of Box No. IV" and indicate for each further agent the same type of information as required in Box No. IV;
 - (v) if, in Box VI, there are more than three earlier applications whose priority is claimed: in such case, write "Continuation of Box No. VI" and indicate for each additional earlier application the same type of information as required in Box No. VI.
2. If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in certain designated states, as an application for a patent of addition, certificate of addition, inventors certificate of addition or utility certificate of addition: in such case, write the name or two-letter code of each designated State concerned and the indication "patent of addition" "certificate of addition" "inventors certificate of addition" or "utility certificate of addition" the number of the parent application or parent patent or other parent grant and the date of grant of the parent patent or other patent grant or the date of filing of the parent application (Rules 4.11(a)(iii) and 49bis.1 (a) of (b)).
2. If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in the United States of America as a continuation or continuation-in-part of an earlier application: in such case, write "United States of America" or "US" and the indication "continuation" or "continuation-in-part" and the number and the filed date of the parent application (Rules 4.11(a)(iv) and 49bis.1 (d)).

Continuation of Box No. IV:

Dinner, Dara L.
Feldon, Jason C.
Gimmi, Edward R.
Hecht, Elizabeth J.
Hsu, Grace C.
Kinzig, Charles M.
Marjarian, William R.
Sieburth, Kathryn
Stein-Fernandez, Nora
Venetianer, Stephen

Dustman, Wayne J.
Furman, Theodore R., Jr.
Hall, Linda E.
Henderson, Loretta J.
Kanagy, James M.
Kellerman, James
McCarthy, Mary E.
Simon, Soma G.
Sutton, Jeffrey A.
Winslow, Andrea

All of SmithKline Beecham Corporation, address as indicated in Box No. IV.

Box No. V DESIGNATION OF STATES

The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.

However,

- ☐ DE Germany is not designated for any kind of national protection
☐ KR Republic of Korea is not designated for any kind of national protection
☐ RU Russian Federation is not designated for any kind of national protection

(The check boxes above may be used to exclude (irrevocably) the designations concerned in order to avoid the ceasing of the effect, under the national law, of an earlier application from which priority is claimed. See the notes to Box no. V as to the consequences of such national law provisions in these and certain other states.)

Box No. VI PRIORITY CLAIM

Where earlier application is

Filing Date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	national application: country or member of WTO	regional application: * regional Office	international application: receiving Office
item (1) 04 March 2003 (04.03.03)	60/451,686	item (1) United States of America		
item (2)				
item (3)				

☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

- ☒ The receiving Office is hereby requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as:
☐ all items ☒ item (1) ☐ item (2) ☐ item (3) ☐ item 4 ☐ item (5) ☐ other, see Supplemental Box

*Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)).

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) (if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):

ISA/US

Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):

Date (day/month/year) Number Country (or regional Office)

Box No. VIII DECLARATIONS

The following declarations are contained in Boxes Nos. VIII(i) to (v) (mark applicable check-boxes Number of declarations below and indicate in the right column the number of each type of declaration):

- | | | |
|---|--|-----|
| ☐ Box No. VIII(i) | Declaration as to the identity of the inventor | : |
| ☒ Box No. VIII(ii) | Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent | : 4 |
| ☒ Box No. VIII(iii) | Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application | : 4 |
| ☒ Box No. VIII(iv) | Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation the United States of America) | : 4 |
| ☐ Box No. VIII(v) | Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack novelty | : |

Box No. VIII(ii) DECLARATION: ENTITLEMENT TO APPLY FOR AND BE GRANTED A PATENT

The declaration must conform to the standardized wording provided for in Section 212; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII(i) to (v) (in general and the specific Notes to Box No. VIII(ii)). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate:

SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:

an assignment from

GARDNER, Alan R. of 709 Swedeland Road, King of Prussia, Pennsylvania 19406, United States of America dated 02 March 2004;

SWEITZER, Thomas D. of 709 Swedeland Road, King of Prussia, Pennsylvania 19406, United States of America dated 01 March 2004;

TAYLOR, Alexander H. of 709 Swedeland Road, King of Prussia, Pennsylvania 19406, United States of America dated 02 March 2004; and

PATEL, Pramathesh S. of 709 Swedeland Road, King of Prussia, Pennsylvania 19406, United States of America dated 01 March 2004.

This declaration is made for the purposes of all designations except the designation of the United States of America.

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII(ii)".

Form PCT/RO/101 (declaration sheet (ii)) (March 2001; reprint January 2003)

See Notes to the request form

Box No. VIII(iii) DECLARATION: ENTITLEMENT TO CLAIM PRIORITY

The declaration must conform to the standardized wording provided for in Section 213; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII(i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII(iii) and 51bis.1(a)(iii)

Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51bis.1(a)(iii)):

in relation to this international application,

SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION is entitled to claim priority of earlier application No. **USSN 60/429,105** filed in the United States of America by virtue of the following:

an assignment from Inventor **GARDNER, Alan R.** to **SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION**, dated 02 March 2004;

an assignment from Inventor **SWETZER, Thomas D.** to **SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION**, dated 01 March 2004;

an assignment from Inventor **TAYLOR, Alexander H.** to **SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION**, dated 02 March 2004; and

an assignment from Inventor **PATEL, Pramathesh S.** to **SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION**, dated 01 March 2004.

This declaration is made for the purposes of all designations, except the designation of the United States of America.

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII(iii)".

Form PCT/RO/101 (declaration sheet (iii)) (March 2001; reprint January 2003)

See Notes to the request form

Box No. VIII(iv) DECLARATION: INVENTORSHIP (only for the purposes of the designation of the United States of America). The declaration must conform to the following standardized wording provided for in Section 214; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII(D) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (iv). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration of Inventorship (Rules 4.17(iv) and 51bis.1(a)(iv))

for the purposes of the designation of the United States of America:

I hereby declare that I believe I am the original, first and sole (if only one inventor is listed below) or joint (if more than one inventor is listed below) inventor of the subject matter which is claimed and for which a patent is sought.

This declaration is directed to the international application of which it forms a part (if filing declaration with application).

This application is directed to international application No. PCT/ (if furnishing declaration pursuant to Rule 26ter).

I hereby declare that my residence, mailing address, and citizenship are as stated next to my name.

I hereby state that I have reviewed and understand the contents of the above-identified international application, including the claims of said application. I have identified in the request of said application, in compliance with PCT Rule 4.10, any claim to foreign priority, and I have identified below, under the heading "Prior Application," by application number, country or Member of the World Trade Organization, day, month and year of filing, any application for a patent or inventor's certificate filed in a country other than the United States of America, including any PCT international application designating at least one country other than the United States of America, having a filing date before that of the application on which foreign priority is claimed.

Prior Applications: (prior to priority).....

I hereby acknowledge the duty to disclose information that is known by me to be material to patentability as defined by 37 C.F.R. §1.56, including for continuation-in-part applications, material information which became available between the filing date of the prior application and the PCT international filing date of the continuation-in-part.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

Name: GARDNER, Alan R.

Residence: 709 Swedeland Road, King of Prussia, Pennsylvania 19406, United States of America

Mailing Address: GlaxoSmithKline, Corporate Intellectual Property - UW2220, P.O. Box 1539
King of Prussia, Pennsylvania 19406-0939

Citizenship: United States of America

Inventor's Signature: Alan R. Gardner
(if not contained in the request, or if declaration is corrected or added under Rule 26ter after the filing of the international application. The signature must be that of the inventor, not that of the agent.)

Date: 02 March 2004
(of signature which is not contained in the request, or of the declaration that is corrected or added under Rule 26ter after the filing of the international application)

Name: SWITZER, Thomas D.

Residence: 709 Swedeland Road, King of Prussia, Pennsylvania 19406, United States of America

Mailing Address: GlaxoSmithKline, Corporate Intellectual Property - UW2220, P.O. Box 1539
King of Prussia, Pennsylvania 19406-0939

Citizenship: United States of America

Inventor's Signature: Thomas D. Switzer
(if not contained in the request, or if declaration is corrected or added under Rule 26ter after the filing of the international application. The signature must be that of the inventor, not that of the agent.)

Date: 04 March 04
(of signature which is not contained in the request, or of the declaration that is corrected or added under Rule 26ter after the filing of the international application)

☒ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII(iv)".

Continuation of Box No. VIII(i) to (v) Declaration

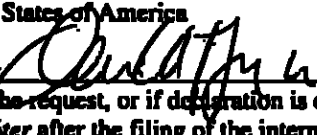
If the space is insufficient in any of Boxes Nos. VIII(i) to (v) to furnish all the information, including in the case where more than two inventors are to be named in Box No. VIII (iv), in such case, write "Continuation of Box No. VIII " (indicate the item number of the Box) and furnish the information in the same manner as required for the purposes of the Box in which the space was insufficient. If additional space is needed in respect of two or more declarations, a separate continuation box must be used for each such declaration. If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Name: TAYLOR, Alexander H.

Residence: 709 Swedeland Road, King of Prussia, Pennsylvania 19406, United States of America

Mailing Address: GlaxoSmithKline, Corporate Intellectual Property - UW2220, P.O. Box 1539
King of Prussia, Pennsylvania 19406-0939

Citizenship: United States of America

Inventor's Signature: 
(if not contained in the request, or if declaration is corrected or added under Rule 26ter after the filing of the international application. The signature must be that of the inventor, not that of the agent.)

Date: 2 March 2004
(of signature which is not contained in the request, or of the declaration that is corrected or added under Rule 26ter after the filing of the international application)

Name: PATEL, Pramathesh S.

Residence: 709 Swedeland Road, King of Prussia, Pennsylvania 19406, United States of America

Mailing Address: GlaxoSmithKline, Corporate Intellectual Property - UW2220, P.O. Box 1539
King of Prussia, Pennsylvania 19406-0939

Citizenship: United States of America

Inventor's Signature: 
(if not contained in the request, or if declaration is corrected or added under Rule 26ter after the filing of the international application. The signature must be that of the inventor, not that of the agent.)

Date: 01 March 2004
(of signature which is not contained in the request, or of the declaration that is corrected or added under Rule 26ter after the filing of the international application)

Box No. IX. CHECK LIST: LANGUAGE OF FILING*This international application contains:*(a) *in paper form, the following number of sheets:*
request (including
declaration sheets) : 9description (excluding
sequence listings and/or
tables related thereto) : 38

claims : 5

abstract : 1

drawings : 14

Sub-total number of sheets : 67

sequence listings : 14

tables related thereto : :

(for both, actual number of sheets if filed
in paper form, whether or not also filed in
computer readable form; see (c) below)

Total number of sheets : 81

(b) ☐ only in computer readable form
(Section 801(a)(i))(i) ☐ sequence listings(ii) ☐ tables related thereto(c) ☒ also in computer readable form
(Section 801(a)(ii))(i) ☒ sequence listings(ii) ☐ tables related theretoType and number of carriers
(diskette, CD-ROM, CD-R or other)

on which are contained the

☒ sequence listings:☐ tables related thereto:(additional copies to be indicated under
items 9(ii) and/or 10(ii), in right
column)*This international application is accompanied by the following item(s) (mark the
applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item):*

- | | | |
|---|---|---|
| 1. ☒ fee calculation sheet | : | 1 |
| 2. ☒ separate signed power of attorney | : | 1 |
| 3. ☐ original general power of attorney | : | 4 |
| 4. ☒ copy of general power of attorney | : | |
| 5. ☐ statement explaining lack of signature | : | |
| 6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): | : | |
| 7. ☐ translation of international application into (language): | : | |
| 8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological materials | : | |
| 9. ☒ sequence listings in computer readable form (indicate type and number of carriers) | : | |
| (i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application) | : | |
| (ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter | : | |
| (iii) ☒ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listings mentioned in left column | : | |
| 10. ☐ tables in computer readable form related to sequence listings (indicate type and number of carriers) | : | |
| (i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quarter) only (and not as part of the international application) | : | |
| (ii) ☐ (only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802 (b-quarter) | : | |
| (iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column | : | |
| 11. ☐ other (specify): | : | |

Figure of the drawings which should accompany the abstract:

Language of filing of the international application:

Box No. IX. SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT, OR COMMON REPRESENTATIVE*(Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such is not obvious from reading the request).)*

SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION

By: 

Andrea V. Lockenour

Attorney for the Applicant

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application	2. Drawings: ☐ received: ☐ not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
5. International Searching Authority specified by the applicant: ISA/	
6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy
by the International Bureau

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
16 September 2004 (16.09.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/078936 A2

(51) International Patent Classification⁷: C12N

(21) International Application Number:
PCT/US2004/006507

(22) International Filing Date: 4 March 2004 (04.03.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/451,686 4 March 2003 (04.03.2003) US

(71) Applicant (for all designated States except US):
SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION
[US/US]; One Franklin Plaza, P.O. Box 7929, Philadel-
phia, PA 19101 (US).

(72) Inventors and

(75) Inventors/Applicants (for US only): GARDNER, Alan,
R. [US/US]; 709 Swedeland Road, King of Prussia,
PA 19406 (US). SWEITZER, Thomas, D. [US/US];
709 Swedeland Road, King of Prussia, PA 19406 (US).
TAYLOR, Alexander, H. [US/US]; 709 Swedeland Road,
King of Prussia, PA 19406 (US). PATEL, Pramadben,
S. [US/US]; 709 Swedeland Road, King of Prussia, PA
19406 (US).

(74) Agent: LOCKENOUR, Andrea, V. et al.; Glaxo-
SmithKline, Corporate Intellectual Property, UW2220,
709 Swedeland Road, P.O. Box 1539, King of Prussia, PA
19406-0939 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GI,

GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Euro-
pean (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,
GB, GR, HU, IL, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SI, SK,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted
a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE,
EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, IL, IN, IS,
JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA,
MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM,
PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW, ARIPO patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IL, IT,
LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF,
BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG)

— as to the applicant's entitlement to claim the priority of the
earlier application (Rule 4.17(iii)) for the following desig-
nations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ,
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW, ARIPO patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IL,
IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG)

— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(84) Title: METHODS FOR PREVENTING GLUCONYLATION OF PROTEINS

(57) Abstract: The present invention relates to method of preventing glyconylation of polypeptides produced in microorganisms.

WO 2004/078936 A2

Methods for Preventing Gluconoylation of Proteins

FIELD OF THE INVENTION

This invention is in the field of biochemical engineering. More particularly, this invention relates to fermentation processes for producing polypeptides.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Escherichia coli ("E. coli") is a commonly used host for expression of proteins for research, diagnostic, therapeutic, and industrial purposes. Modern expression systems are capable of achieving high levels of a wide variety of proteins (Baneyx, *Current Opinion in Biotechnology* 10:411-421(1999)). However, the quality of the expressed protein is often as important or more important than quantity. Proteins expressed in *E. coli* may be formed as insoluble aggregates, or they may have misincorporated amino acids (Bogosian, *et al.*, *Journal of Biological Chemistry* 264:531-539 (1989)) or retain the N-terminal methionine (Chaudhuri, *et al.*, *Journal of Molecular Biology* 285:1179-1194 (1999); Vassileva-Atanassova, *et al.*, *Journal of Biotechnology* 69:63-67 (1999); Yamashita, *et al.*, *Protein Expression & Purification* 16:47-52 (1999)). In addition, undesired post-translational modifications may occur such as oxidation (Berti, *et al.*, *Protein Expression & Purification* 11:111-118 (1997); Konz, *et al.*, *Biotechnology Progress* 14:393-409 (1998)) or α -N-6-phosphogluconoylation (Geoghegan, *et al.*, *Anal. Biochem.* 267:169-184 (1999); Kim *et al.*, *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 57:759-762 (2001); Yan, *et al.* *Biochemical & Biophysical Research Communications* 262:793-800 (1999) "Yan *et al.* I;" Yan, *et al.*, *Biochemical & Biophysical Research Communications* 259:271-282 (1999) "Yan *et al.* II"). These modifications may adversely effect activity, stability, structure, or immunogenicity of the expressed protein, greatly reducing the utility of *E. coli* as a host for polypeptide expression.

Alpha(α)-N-6-phosphogluconoylation of several recombinant proteins fused to hexahistidine affinity tags ("hexa His-tag") has been described

19

- (Geoghegan, *et al.*; Kim, *et al.*; Yan *et al.* I; Yan *et al.* II). In these studies, a gluconic acid derivative was found to attach to the end terminus of the recombinant protein. All of these proteins were expressed in B strains of *E. coli* using pET-based vectors (Novagen). Where reported, LB medium was used.
- 5 The adduct was detected as an extra mass associated with the polypeptide of either 258 Daltons ("Da"), representing the addition of 6-phosphogluconolactone (6-PGL), or 178 Da, representing the presence of gluconolactone without the phosphate. Phosphogluconoylation was presumed to occur at the N-terminal α -amino group through reaction with endogenous 6-PGL, an intermediate of the pentose phosphate shunt. The +178 Da adduct was proposed to be the result of enzymatic activity acting on the +258 Da adduct to remove the phosphate. Formation of the adduct was shown to be specific to the amino acid sequence at the N-terminus adjacent to the His-tag. Polypeptide sequences of GXXHHHH, where XX is SS, SA, AS, or AA, were
- 10 the most prone to α -N-6-phosphogluconoylation, whereas SHHHHHH was less prone, and PHHHHHH and PFHHHHH were not modified at all (Geoghegan, *et al.*). Modifications at other amino groups elsewhere on the protein were not detected *in vivo* or in *in vitro* experiments that used high levels of added gluconolactone. (Geoghegan, *et al.*)
- 20 N-terminal phosphogluconoylation has been shown to inhibit crystallization of proteins (Kim, *et al.*), but relatively little else is known about its effect on protein function, stability, or immunogenicity. It is expected that 6-PGL, being a potent electrophile, may be involved in glycation reactions *in vivo* (Rakitzis and Papandreou, *Chemico-Biological Interactions* 113:205-216 (1998)). Glycation of proteins has been widely studied and is known to play a major role in aging and disease states related to diabetic complications (Baynes and Monnier, *The Maillard Reaction in Aging, Diabetes, and Nutrition*. Alan R. Liss, New York (1989)). Exogenously added delta-gluconolactone has been shown to cause glycation of hemoglobin, which may be a factor in the
- 25 vascular complications of diabetes (Lindsay, *et al.*, *Clinica Chimica Acta* 263:239-247 (1997)). Furthermore, glycation of alanine aminotransferase at
- 30

90

the epsilon-amino group of Lys313 markedly reduces its catalytic activity (Beranek, *et al.*, *Molecular & Cellular Biochemistry* 218:35-39 (2001)).

6-Phosphogluconolactonase ("pgl") has been shown to be an essential enzyme of the pentose-phosphate pathway, specifically in the hydrolysis of 6-PGL to 6-phosphogluconic acid. (Miclet, *et al.*, *J.Biol.Chem.* 276:34840-34846 (2001)) The gene encoding this enzyme has been identified in human (Collard, *et al.*, *FEBS Letters* 459:223-226 (1999)), *Pseudomonas aeruginosa* (Hager, *et al.*, *Journal of Bacteriology* 182:3934-3941(2000)), and *Trypanosoma brucei* and *Plasmodium falciparum* (Miclet, *et al.*). Although pgl activity has long been observed in *E. coli* (Kupor and Fraenkel, *Journal of Bacteriology* 100:1296-1301 (1969) "Kupor I" and Kupor and Fraenkel, *Journal of Biological Chemistry* 247:1904-1910 (1972) "Kupor II"), no gene sequence responsible for encoding an enzyme with this activity has been identified (Cordwell, S. J. *Arch. Microbiol.* 172:269-279 (1999)). It has been suggested that in addition to enabling metabolic flux through the pentose phosphate shunt, pgl activity inside the cell prevents accumulation of 6-PGL and consequential damaging reactions with intracellular nucleophiles (Miclet, *et al.*). Reported observations of phosphogluconoylation of proteins at the N-terminus supports the hypothesis that the 6-PGL produced in the pathway can modify proteins, but there has been no reported evidence that modulating pgl activity can affect the levels of modified protein.

Furthermore, *Escherichia coli* strain BL21(DE3) is a commonly used host for expression of proteins for research, diagnostic, therapeutic, and industrial purposes Studier, F.W., and Moffatt, B.A., *J. Mol. Biol.* 1988 May 5; 189(1):113-130. This strain is commercially attractive because it achieves very high expression levels of recombinant protein by means of coupling expression of a chromosomal copy of the T7 RNA polymerase and the use of a plasmid based T7 RNA polymerase promoter on the recombinant protein of interest. Accordingly, since the T7 RNA polymerase is an extremely selective and active RNA polymerase, transcription of the recombinant protein accumulate to very high levels, often even to the extent that host cell transcripts are diminished.

21

Unfortunately, the strain BL21(DE3) releases very low, yet detectable, infectious lambda phage particles on the order of 10-20 plaque forming units /ml (PFU), Stewart Shuman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 89:3489-3493. Apparently, the T7 RNA polymerase gene was introduced into the BL21 host cell chromosome by transduction with the defective lambda phage DE3 carrying the T7 RNA polymerase gene inserted into the lambda *int* gene Studler, F.W., and Moffatt, B.A., *J. Mol. Biol.* 1986; 189(1):113-130. The resulting defective prophage cannot replicate normally due to the *int* gene interruption. Chromosomal excision of the DE3 prophage is a requirement for the replication of the prophage prior to packaging and release of infectious phage particles and is dependant on homologous excisional recombination that is directed by the product of the *int* gene. As described herein very low levels of phage particles released are due to abnormal, *int* independent random prophage excision events. While the release of low levels of infectious phage particles may be acceptable in some research laboratories, any release of infectious phage is totally unacceptable in the biopharmaceuticals manufacturing plant setting both because of considerations for patient safety and because release of infectious agents can put at risk other *E. coli* based manufacturing processes.

A method for expressing or overexpressing polypeptides in a microorganism, such as *E. coli*, with a reduced incidence of phosphogluconoylation during fermentation is greatly needed. In addition, creation of a totally phage free BL21(DE3) host cell would be highly desirable for the manufacture of therapeutic recombinant proteins in the *E. coli* format.

25

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides methods for preventing gluconoylation of polypeptides expressed by microorganisms by growing the microorganism in rich culture medium.

30

The present invention also provides methods for preventing gluconoylation of polypeptides expressed by microorganisms that include introducing (*e.g.*, transforming, infecting or transfecting) DNA encoding a

a2

- polypeptide that demonstrates pgl activity into the microorganism. This polypeptide may be a phosphogluconolactonase enzyme. In another aspect of the invention, the phosphogluconolactonase enzyme may have an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to the
- 5 phosphogluconolactonase enzyme produced by *Pseudomonas*, including but not limited to, *P. aeruginosa*.

The present invention also provides microorganisms capable of preventing gluconoylation of proteins. In one embodiment, a microorganism may contain DNA encoding a polypeptide that demonstrates pgl activity.

- 10 The present invention also provides an isolated polynucleotide that has at least 90% identity to the polynucleotide set forth in SEQ ID NO:7.

The present invention also provides a microorganism free of detectable infectious lambda phage expression.

15 **BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES**

Figure 1 shows a restriction enzyme map of vector pECO-1-pgl-2-13..

Figure 2 shows a polynucleotide sequence for vector pECO-1-pgl-2-13. (SEQ ID NO:9)

Figure 3 shows a restriction enzyme map of vector pET28ProL18Casp5.

- 20 Figure 4 shows a polynucleotide sequence for vector pET28ProL18Casp5. (SEQ ID NO:13)

Figure 5 shows a restriction enzyme map of vector pET28proL18casp5+pgl..

Figure 6 shows a polynucleotide sequence for vector pET28proL18casp5+pgl (SEQ ID NO:14).

- 25 Figure 7 shows a polynucleotide sequence, SEQ ID NO:7.

Figure 8 shows a polypeptide sequence, SEQ ID NO:8.

Glossary

- 30 "Host cell(s)" is a cell, including but not limited to a bacterial cell or cell of a microorganism, that has been introduced (e.g., transformed, infected or transfected) or is capable of introduction (e.g., transformation, infection or transfection) by an isolated polynucleotide sequence.

"Transformed" as known in the art, is the directed modification of an organism's genome or episome via the introduction of external DNA or RNA, or to any other stable introduction of external DNA or RNA.

5 "Transfected" as known in the art, is the introduction of external DNA or RNA into a microorganism, including but not limited to recombinant DNA or RNA.

"Identity," as known in the art, is a relationship between two or more polypeptide sequences or two or more polynucleotide sequences, as the case may be, as determined by comparing the sequences. In the art, "identity" also
10 means the degree of sequence relatedness between polypeptide or polynucleotide sequences, as the case may be, as determined by the match between strings of such sequences. "Identity" can be readily calculated by known methods, including but not limited to those described in (*Computational Molecular Biology*, Leek, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988;
15 *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data*, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton
20 Press, New York, 1991; and Carillo, H., and Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988). Methods to determine identity are designed to give the largest match between the sequences tested. Moreover, methods to determine identity are codified in publicly available computer programs. Computer program methods to determine identity between two sequences
25 include, but are not limited to, the GCG program package (Devereux, J., *et al.*, *Nucleic Acids Research* 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, and FASTA (Altschul, S.F. *et al.*, *J. Molec. Biol.* 215: 403-410 (1990). The BLAST X program is publicly available from NCBI and other sources (*BLAST Manual*, Altschul, S., *et al.*, NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990). The well known Smith Waterman algorithm
30 may also be used to determine identity.

Parameters for polypeptide sequence comparison include the following:

- Algorithm: Needleman and Wunsch, J. Mol Biol. 48: 443-453 (1970)
- Comparison matrix: BLOSSUM62 from Hentikoff and Hentikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:10915-10919 (1992)
- 5 Gap Penalty: 12
- Gap Length Penalty: 4
- A program useful with these parameters is publicly available as the "gap" program from Genetics Computer Group, Madison WI. The aforementioned parameters are the default parameters for peptide comparisons (along with no
- 10 penalty for end gaps).

Parameters for polynucleotide comparison include the following:

- Algorithm: Needleman and Wunsch, J. Mol Biol. 48: 443-453 (1970)
- Comparison matrix: matches = +10, mismatch = 0
- Gap Penalty: 50
- 15 Gap Length Penalty: 3
- Available as: The "gap" program from Genetics Computer Group, Madison WI. These are the default parameters for nucleic acid comparisons.

A preferred meaning for "identity" for polynucleotides and polypeptides, as the case may be, are provided in (1) and (2) below.

- 20 (1) Polynucleotide embodiments further include an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence having at least a 70, 80, 85, 90, 95, 97 or 100% identity to the reference sequence of SEQ ID NO:7, wherein said polynucleotide sequence may be identical to the reference sequence of SEQ ID NO:7 or may include up to a certain integer number of
- 25 nucleotide alterations as compared to the reference sequence, wherein said alterations are selected from the group consisting of at least one nucleotide deletion, substitution, including transition and transversion, or insertion, and wherein said alterations may occur at the 5' or 3' terminal positions of the reference nucleotide sequence or anywhere between those terminal positions,
- 30 interspersed either individually among the nucleotides in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence, and wherein said number of nucleotide alterations is determined by multiplying

25

the total number of nucleotides in SEQ ID NO:7 by the integer defining the percent identity divided by 100 and then subtracting that product from said total number of nucleotides in SEQ ID NO:7, or:

5
$$n_n \leq x_n - (x_n \cdot y),$$

wherein n_n is the number of nucleotide alterations, x_n is the total number of nucleotides in SEQ ID NO:7, y is 0.95 for 95%, 0.97 for 97% or 1.00 for 100%, and $\cdot$ is the symbol for the multiplication operator, and wherein any non-integer product of x_n and y is rounded down to the nearest integer prior to subtracting it from x_n . Alterations of a polynucleotide sequence encoding a polypeptide may create nonsense, missense or frameshift mutations in this coding sequence and thereby alter the polypeptide encoded by the polynucleotide following such alterations.

15 (2) Polypeptide embodiments further include an isolated polypeptide comprising a polypeptide having at least a 70, 80, 85, 90, 95, 97 or 100% identity to a polypeptide reference sequence, wherein said polypeptide sequence may be identical to the reference sequence or may include up to a certain integer number of amino acid alterations as compared to the reference sequence, wherein said alterations are selected from the group consisting of at least one amino acid deletion, substitution, including conservative and non-conservative substitution, or insertion, and wherein said alterations may occur at the amino- or carboxy-terminal positions of the reference polypeptide sequence or anywhere between those terminal positions, interspersed either
20 individually among the amino acids in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence, and wherein said number of amino acid alterations is determined by multiplying the total number of amino acids by the integer defining the percent identity divided by 100 and then subtracting that product from said total number of amino acids, or:

30

$$n_a \leq x_a - (x_a \cdot y),$$

wherein n_a is the number of amino acid alterations, x_a is the total number of amino acids in the sequence, y is 0.95 for 95%, 0.97 for 97% or 1.00 for 100%, and $\cdot$ is the symbol for the multiplication operator, and wherein any non-integer product of x_a and y is rounded down to the nearest integer prior to subtracting it from x_a .

"Isolated" means altered "by the hand of man" from its natural state, i.e., if it occurs in nature, it has been changed or removed from its original environment, or both. For example, a polynucleotide or a polypeptide naturally present in a living organism is not "isolated," but the same polynucleotide or polypeptide separated from the coexisting materials of its natural state is "isolated", including but not limited to when such polynucleotide or polypeptide is introduced back into a cell.

"Polynucleotide(s)" generally refers to any polyribonucleotide or polydeoxyribonucleotide, that may be unmodified RNA or DNA or modified RNA or DNA. "Polynucleotide(s)" include, without limitation, single- and double-stranded DNA, DNA that is a mixture of single- and double-stranded regions or single-, double- and triple-stranded regions, single- and double-stranded RNA, and RNA that is mixture of single- and double-stranded regions, hybrid molecules comprising DNA and RNA that may be single-stranded or, more typically, double-stranded, or triple-stranded regions, or a mixture of single- and double-stranded regions. In addition, "polynucleotide" as used herein refers to triple-stranded regions comprising RNA or DNA or both RNA and DNA. The strands in such regions may be from the same molecule or from different molecules. The regions may include all of one or more of the molecules, but more typically involve only a region of some of the molecules. One of the molecules of a triple-helical region often is an oligonucleotide. As used herein, the term "polynucleotide(s)" also includes DNAs or RNAs as described above that comprise one or more modified bases. Thus, DNAs or RNAs with backbones modified for stability or for other reasons are "polynucleotide(s)" as that term is intended herein. Moreover, DNAs or RNAs comprising unusual bases, such as inosine, or modified bases, such as tritylated bases, to name just two examples, are polynucleotides as the term is

mediated addition of amino acids to proteins, such as arginylation, and ubiquitination. See, for instance, *PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES*, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1983) and Wold, F., *Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects*, pgs. 1-12 In *POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York (1983); Seifter *et al.*, *Math. Enzymol.* 182:626-646 (1990) and Rattan *et al.*, *Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging*, Ann. N.Y. Acad. Sci. 663: 48-62 (1992). Polypeptides may be branched or cyclic, with or without branching. Cyclic, branched and branched circular polypeptides may result from post-translational natural processes and may be made by entirely synthetic methods, as well.

"Recombinant expression system(s)" refers to expression systems or portions thereof or polynucleotides of the invention introduced or transformed into a host cell or host cell lysate for the production of the polynucleotides and polypeptides of the invention.

"Variant(s)" as the term is used herein, is a polynucleotide or polypeptide that differs from a reference polynucleotide or polypeptide respectively, but retains essential properties. A typical variant of a polynucleotide differs in nucleotide sequence from another, reference polynucleotide. Changes in the nucleotide sequence of the variant may or may not alter the amino acid sequence of a polypeptide encoded by the reference polynucleotide. Nucleotide changes may result in amino acid substitutions, additions, deletions, fusion proteins and truncations in the polypeptide encoded by the reference sequence, as discussed below. A typical variant of a polypeptide differs in amino acid sequence from another, reference polypeptide. Generally, differences are limited so that the sequences of the reference polypeptide and the variant are closely similar overall and, in many regions, identical. A variant and reference polypeptide may differ in amino acid sequence by one or more substitutions, additions, deletions in any combination. A substituted or inserted amino acid residue may or may not be one encoded by the genetic code. The present invention also includes include

variants of each of the polypeptides of the invention, that is polypeptides that vary from the referents by conservative amino acid substitutions, whereby a residue is substituted by another with like characteristics. Typical such substitutions are among Ala, Val, Leu and Ile; among Ser and Thr; among the acidic residues Asp and Glu; among Asn and Gln; and among the basic residues Lys and Arg; or aromatic residues Phe and Tyr. Particularly preferred are variants in which several, 5-10, 1-5, 1-3, 1-2 or 1 amino acids are substituted, deleted, or added in any combination. A variant of a polynucleotide or polypeptide may be a naturally occurring such as an allelic variant, or it may be a variant that is not known to occur naturally. Non-naturally occurring variants of polynucleotides and polypeptides may be made by mutagenesis techniques, by direct synthesis, and by other recombinant methods known to skilled artisans.

"Microorganism(s)" means a (1) prokaryote, including but not limited to, a member of the genus *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bordetella*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Actinomycetes*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Enterobacter*, *Yersinia*, *Fancisella*, *Pasturella*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Erysipelothrix*, *Branhamella*, *Actinobacillus*, *Streptobacillus*, *Listeria*, *Calymmatobacterium*, *Brucella*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Treponema*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Vibrio*, *Proteus*, *Erwinia*, *Borrelia*, *Leptospira*, *Spirillum*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Legionella*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Rickettsia*, *Chlamydia*, *Borrelia* and *Mycoplasma*, and further including, but not limited to, a member of the species or group, Group A *Streptococcus*, Group B *Streptococcus*, Group C *Streptococcus*, Group D *Streptococcus*, Group G *Streptococcus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium*, *Streptococcus durans*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium leprae*, *Actinomyces israelii*, *Listeria monocytogenes*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus aegyptius*, *Haemophilus parainfluenzae*,

mirabilis, *Proteus vulgaris*, *Yersinia pestis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, *Vibrio cholera*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Fransciella tularensis*, *Brucella abortus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*,
5 *Clostridium botulinum*, *Treponema pallidum*, *Rickettsia rickettsii* and *Chlamydia trachomatis*, and (II) an archaeon, including but not limited to *Archaeobacter*.

As used herein, "heterologous polypeptide(s)" refers to a polypeptide not naturally synthesized by a transformed host cell or microorganism of interest and introduced into the host cell or microorganism by recombinant DNA. For
10 example, *E. coli* may act as a host microorganism for the expression of interleukin, which does not occur in non-transformed *E. coli*. Heterologous polypeptides may include polypeptides that have been modified to facilitate isolation.

As used herein "affinity tag" refers to any moiety associated with a
15 molecule that may give said molecule a selective affinity for another substance or molecule. For instance, an affinity tag may be used to facilitate purification of a molecule by providing the molecule with a selective affinity for a column's packing material. A non-limiting example of an affinity tag is a His-tag.

As used herein, "His-tag" refers to a repeat of histidine amino acids and
20 may include other amino acids encoded into a polypeptide through engineering techniques. Typically, a His-tag contains at least six ("hexa") histidine repeats and is located near the N-terminus of the polypeptide. His-tags can be used to facilitate purification of heterologous polypeptides over Ni-columns.

As used herein, "minimal medium" refers to cell growth medium
25 comprising chemically defined ingredients including, but not limited to, buffers such as phosphate buffer, salts such as magnesium sulfate, calcium chloride, sodium chloride, or manganese sulfate, minerals such as iron, zinc, copper, cobalt, or molybdenum, a carbon source such as glucose or glycerol, and a nitrogen source such as ammonium sulfate or nitrate. An example is M9 media
30 (Kim, YS, JH Seo and HY Cha, *Enzyme and Microbial Technology* 33 (2003):460-465.)

32

As used herein, "rich medium" refers to cell growth medium comprising undefined ingredients and including, but not limited to, additional components such as buffers (for example phosphate buffer), salts (for example magnesium sulfate, calcium chloride, sodium chloride, or manganese sulfate), and a carbon source which may be glucose or glycerol, for example. The nitrogen source may be comprised of a protein hydrolysate such as yeast extract, meat hydrolysate, or soy hydrolysate. The nitrogen source may be provided at a concentration capable of supporting cell growth at a ratio of complex nitrogen source (in grams per liter) to maximum cell density (in OD units) of 1:1 or greater. Examples of rich medium include, but are not limited to, Superbroth (Atlas RM, Handbook of Microbiological Media; Parks LC Ed.; CRC Press: Boca Raton FL, pp. 281, 523, 529, 859), Terrific Broth (Alpha Biosciences, Baltimore, MD USA), Turbo Broth (Athena Enzyme Systems, Baltimore, MD USA), or Hyper Broth (Athena Enzyme Systems, Baltimore, MD USA).

As used herein, "gluconoylation" refers to the attachment of a gluconic acid derivative to a protein. Gluconoylation may include, but is not limited to, 6-phosphogluconolactone (6-PGL) adduct formation, acetylation, formylation, deformylation, gluconolactonation, or gluconic acid derivatization.

As used herein, "titer yield" refers to the concentration of a product (e.g., heterologously expressed polypeptide) in solution (e.g., culture broth or cell-lysate mixture or buffer) and it usually expressed as mg/L or g/L. An increase in titer yield may refer to an absolute or relative increase in the concentration of a product produced under two defined set of conditions.

As used herein, "pgl activity" refers to any activity of a 6-Phosphogluconolactonase ("pgl"). Such activity may include hydrolysis of 6-PGL to 6-phosphogluconic acid. Significant pgl activity may be defined as hydrolysis activity of at least 0.2 IU/mln/g.

As herein used, the terms "stringent conditions" and a "stringent hybridization conditions" mean hybridization will occur only if there is at least 70% and preferably at least 80%, but especially preferably at least 95% identity between the sequences. An example of stringent hybridization conditions is overnight incubation at 42°C in a solution comprising: 50% formamide, 5xSSC

23

(150mM NaCl, 15mM trisodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH7.6), 5x Denhardt's solution, 10% dextran sulfate, and 20 micrograms/ml denatured, sheared salmon sperm DNA, followed by washing the filters in 0.1x SSC at about 65°C. Hybridization and wash conditions are well known and exemplified in

5 Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), particularly Chapter 11 therein, the disclosure of which is hereby incorporated in its entirety by reference.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

10 Cellular stresses arising from growth on minimal medium, high cell densities, and high-level heterologous polypeptide expression, among other stresses, may contribute to the gluconoylation of heterologous polypeptide. Alleviating one or more of these stressors may therefore affect the level of gluconoylation of protein expressed in the microorganism, which in turn may

15 effect the purity and titer yield of a desired polypeptide. Some strains of *E. coli* may have higher levels of pgl activity than others (although the gene responsible for this activity has not been identified in *E. coli*. Cordwell, S. J. 1999. *Arch. Microbiol.* 172:269-279. Furthermore, gluconoylation of polypeptides may affect crystallization and structural determination of these

20 polypeptides.

The present invention provides methods for preventing gluconoylation of a polypeptide expressed in a microorganism, comprising growing said microorganism in rich culture medium. In another aspect of the invention, the microorganism does not demonstrate significant 6-phosphogluconolactonase

25 activity when grown in minimal medium. The microorganism may be a strain of *E. coli*. In another aspect of the invention, an *E. coli* is a B strain. In another aspect of the invention, a rich culture medium comprises a complex nitrogen source. A rich culture medium is capable of maintaining cell growth at ratio of 1:1 for concentration of complex nitrogen source to cell density. A complex

30 nitrogen source may comprise tryptone, peptone, or yeast extract. In another aspect of the invention, a culture medium is Superbroth. Superbroth medium may be doubly concentrated. In another aspect of the invention, a

microorganism is transfected with a recombinant DNA molecule encoding a heterologous polypeptide.

In another embodiment of the present invention, methods are provided for preventing gluconoylation of a polypeptide expressed in *E. coli* comprising fermenting a K strain variety of *E. coli* for the expression of the polypeptide. In another aspect of the invention, a K strain demonstrates at least about 100-fold higher phosphogluconolactonase activity compared with B strain grown under substantially the same conditions. In another aspect of the invention, a K strain is K-12.

10 In another embodiment of the present invention, methods are provided for preventing gluconoylation of polypeptides expressed in a microorganism, comprising introducing DNA into the microorganism, wherein the DNA encodes a polypeptide that demonstrates 6-phosphogluconolactonase activity. In another aspect of the invention, a microorganism is *E. coli*. A DNA comprises DNA encoding a 6-phosphogluconolactonase enzyme. In another aspect of the invention, a DNA encoding a 6-phosphogluconolactonase enzyme has at least 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, or 100% sequence identity to a DNA encoding 6-phosphogluconolactonase from a *Pseudomonas*, which may be *P. aeruginosa*. In another aspect of the invention, a DNA encoding a 6-phosphogluconolactonase enzyme has at least 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, or 100% sequence identity to SEQ ID NO:7. In another aspect of the invention, a 6-phosphogluconolactonase enzyme has an amino acid sequence having at least 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, or 100% sequence identity to SEQ ID NO:8. A DNA encoding a 6-phosphogluconolactonase enzyme comprises the sequence set forth in SEQ ID NO:7. DNA may be recombinant DNA, and/or it may be transformed into a genomic DNA of a microorganism.

In another embodiment of the present invention, a microorganism is provided that is capable of preventing gluconoylation of polypeptides. A microorganism comprises DNA that encodes a polypeptide that demonstrates 6-phosphogluconolactonase activity. A microorganism comprises DNA that encodes 6-phosphogluconolactonase. In another aspect of the invention, a DNA that encodes 6-phosphogluconolactonase has at least 70%, 80%, 85%,

90%, 95%, 97%, or 100% sequence identity to DNA encoding a 6-phosphogluconolactonase enzyme from a *Pseudomonas* and wherein the microorganism is not *Pseudomonas*. In another aspect of the invention, a DNA that encodes 6-phosphogluconolactonase is from *P. aeruginosa*. In another aspect of the invention, a microorganism is a strain of *E. coli*. In another aspect of the invention, a microorganism is a strain of *E. coli* and wherein a DNA that encodes 6-phosphogluconolactonase is incorporated into the genome of the microorganism.

In another embodiment of the present invention, an isolated polynucleotide is provided comprising a polynucleotide having at least a 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, or 100% identity to the polynucleotide set forth in SEQ ID NO:7. In another aspect of the invention, an isolated polynucleotide comprises a polynucleotide having at least a 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, or 100% sequence identity to a polynucleotide encoding a polypeptide comprising amino acids having at least 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, or 100% sequence identity to SEQ ID NO:8. In another aspect of the invention, a DNA encodes a protein demonstrating 6-phosphogluconolactonase activity. In another aspect of the invention, a DNA sequence is set forth in SEQ ID NO:7. In another aspect of the invention, a DNA sequence is homologous to a DNA encoding 6-phosphogluconolactonase from *P. aeruginosa*. In another aspect of the invention, an isolated polynucleotide further comprises a polynucleotide that encodes a human interleukin-18, or variant thereof.

In another embodiment of the present invention, methods are provided for improving polypeptide crystal formation comprising expressing said polypeptide by a method of the invention in order to reduce glycosylation of the polypeptide.

In another embodiment of the present invention, methods are provided for improving growth efficiency and expression of a polypeptide in a microorganism. In one aspect, a polypeptide demonstrates an increased titer yield at fermentation stage compared with glycosylated polypeptide.

In another embodiment of the present invention, methods are provided for producing a human interleukin comprising co-expressing said human

3b

Interleukin in a microorganism with an enzyme having 6-
Phosphogluconolactonase ("pgl") activity. In one aspect, a human interleukin is
an IL-18 protein, or variant thereof. In one aspect, a microorganism is *E. coli*.
In one aspect, the pgl is encoded by a polynucleotide that is transformed or
5 transfected into the *E. coli*, including but not limited to being transformed into
the genome or episome.

In another embodiment of the present invention, methods are provided
producing a human interleukin comprising expressing the human interleukin in
a microorganism that is grown in a rich culture medium. In one aspect, a
10 human interleukin is IL-18 protein, or a variant thereof. In one aspect, the
microorganism is *E. coli*. In one aspect, a rich culture medium comprises
phytone peptone. In one aspect, a rich culture medium comprises bacto yeast
extract.

In another embodiment of the present invention, a microorganism free of
15 detectable infectious lambda phage expression is provided. In one aspect,
lambda phage capsid structural protein, gpE, is deleted or disrupted within a
microorganism. Deletion or disruption of a protein can be achieved in several
non-limiting ways. A gene encoding a protein may be either partially or
completely removed from a microorganism. A gene encoding a protein can be
20 genetically modified by such non-limiting techniques as point mutation or
random mutation. A protein may be cleaved or modified chemically or
enzymatically to disrupt its structure or function. A promoter regulating gene
expression can be disrupted or deleted to eliminate or reduce gene
expression. Solution conditions or temperature can be regulated to effect
25 protein structure or function. In one aspect, a microorganism is an *E. coli*. In
another aspect a microorganism comprises a T7 RNA polymerase gene.

The following examples illustrate various aspects of this invention.
These examples do not limit the scope of this invention which is defined by the
30 appended claims.

EXAMPLES

Example 1

An improved strain of *E. coli* BL21(DE3) strain was created that is free of detectable infectious lambda phage expression by knocking out a major
5 lambda phage capsid structural protein gpE. This strain was used in the Examples presented herein.

A 413 base pair internal fragment of the gpE coding region was PCR amplified using the primer pair:

10 5' AGCTGGCCATTGCTCAGGTCGAAG 3' (SEQ ID NO: 1)

 5' GTACTGTCCGGAATACACGACGATG 3' (SEQ ID NO:2)

and BL21(DE3) chromosomal DNA as template. The resulting fragment:

15 AGCTGGCCAT TGCTCAGGTC GAAGAGATGC AGGCAGTTTC TGCCGTGCTT AAGGGCAANT
ACACCATGAC CGGTGAAGCC TTCGATCCGG TTGAGGTGGA TATGGGCCGC AGTGAGGAGA
ATAACATCAC GCAGTCCGGC GGCACGGAGT GGAGCAAGCG TGACAAGTCC ACGTATGACC
CGACCGACGA TATCGAAGCC TACGCGCTGA ACGCCAGCGG TGTGGTGAAT ATCATCGTGT
20 TCGATCCGAA AGGCTGGGCG CTGTTCCGTT CCTTCAAAGC CGTCAAGGAG AAGCTGGATA
CCCGTCGTGG CTCTAATTC GAGCTGGAGA CAGCGGTGAA AGACCTGGGC AAAGCGGTGT
CCTATAAGGG GATGTATGGC GATGTGGCCA TCGTCGTGTA TTCCGGACAG TAC
(SEQ ID NO:3)

PCR amplification product was TA cloned and sequence verified using
25 standard techniques. Next, a functional copy of a chloramphenicol resistance gene was introduced into the EcoRV site centrally located and shown bolded in the cloned gpE sequence. The chloramphenicol interrupted gpE fragment construct was then used as a linear homologous recombination knock-out vector for the genetic knock-out of the lambda (DE3) gpE gene residing in *E.*
30 *coli* host strain BL21(DE3). This knock-out vector was introduced into the host cell exactly as described by Kirill A. Datsenko and Barry Wanner, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 2000; 97:6640-6645, except the vector described herein was used. Putative gpE knock-outs were preliminarily identified by the ability to grow in the presence of 8 µg/ml chloramphenicol, and were subsequently

confirmed by PCR analysis. One such gpE knock-out of BL21(DE3) was banked and given the GSK designation ECC-023.

ECC-023 was tested for the presence of infectious phage particles in the very sensitive plaque assay. As shown in Table 1, the parental BL21(DE3) expressed barely detectable amounts of phage when not induced to do so, approximately 20 pfu, but nearly three orders of magnitude more when induced by the SOS response to genetic damage (UV irradiation). The gpE knock-out derivative ECC-023 however did not produce any evidence of infectious phage, even when treated to induce the SOS response. The data shows that the BL21(DE3) derivative ECC-023 does not produce any detectable infectious phage particles and accordingly is a suitable host cell strain for biopharmaceutical manufacturing.

Table 1: Production of infectious phage particles from E. coli.

	PFU/ml	
	Not Induced	SOS Induced
BL21(DE3)	21	10,000
ECC-023	0	0

Example 2

This example shows that culturing cells in a rich medium can prevent formation of a 6-PGL adduct of His-tagged proteins as compared to minimal medium.

E. coli BL21(DE3) transformed with plasmid pET28FabZSa, which encodes the gene for Hexa-his-FabZ, was grown in MCJK (minimal medium) or MCJKLB (rich medium) at 37°C until an OD₆₀₀ of 1.0 was reached. Medium compositions for MCJK and MCJKLB are described in Table 2.

Table 2: Medium compositions for production of Hexahis-FabZ

Component	MCJK	MCJKLB
K ₂ HPO ₄	56 mM	56 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	38 mM	38 mM
MgSO ₄	5 mM	5 mM
CaCl ₂	1 mM	1 mM
Trace metals*	1 mL/L	1 mL/L

39

Glucose	10 g/L	10 g/L
Yeast extract	none	5 g/L
Bacto-tryptone	none	10 g/L
*Trace metals: 161 mM FeCl ₂ , 2.7 mM Na ₂ MoO ₄ , 1.4 mM ZnSO ₄ , 2.5 mM MnCl ₂ , 3.2 mM CuSO ₄ , 3.4 mM CoCl ₂ , and 3.2 mM H ₃ BO ₃		

Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside ("IPTG") was added to a final concentration of 1 mM and the cells were maintained at 37°C for four hours until harvest. Cells were collected by centrifugation at 16,000 x g for 10 min and lysed by gentle agitation in 10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM Na₂EDTA, 10 µg/mL lysozyme and 25 U/mL Benzonase (Sigma). Cell debris was removed by centrifugation at 16,000 x g for 10 minutes and the recombinant protein was purified from the soluble extract with Ni-NTA resin in batch mode according to the manufacturer's recommendations (Qiagen Inc., Valencia, CA).

Heterologous proteins were analyzed for the presence of the gluconolactone modification by LC/MS analysis.

MGSSH₄ His-tag heterologous polypeptide is gluconoylated at a level of 34% of total recombinant protein when the culture is performed in minimal medium (MCJK) as shown in Table 3. When the medium is supplemented or made rich with yeast extract and tryptone, gluconoylated protein is not detectable, also shown in Table 3. Thus, the use of a richer medium can prevent formation of the 6-PGL adduct.

Table 3: Effect of minimal vs. rich medium on gluconoylation of a His-tagged protein expressed in *E. coli*

Vector	N-Terminus	Insert	Modified %	Host	Medium	Comments
pET28FabZ8a	MGSSH ₄	FabZ	34%	BL21(DE3)	MCJK	minimal medium
pET28FabZ8a	MGSSH ₄	FabZ	Not detectable	BL21(DE3)	MCJKLB	rich medium

Example 3

This example demonstrates that an internal lysine residue of a recombinant CXC chemokine (otherwise known as Gro-beta-T) can become gluconoylated when expressed in *E. coli*. The cDNA and amino acid sequences of human Gro-beta-T are provided in International Patent

40

Application, Publication No. WO 92/00327 (Jan. 9, 1992) as well as U.S. Patent No. 6,042,821 and U.S. Patent No. 6,413,510, incorporated herein by reference in their entirety.

5 Heterologous protein accumulation during production of a CXC chemokine (Gro-beta-T) was routinely monitored using a quantitative, high throughput reversed phase assay. This separation was interfaced with a high-performance electrospray time-of-flight ("ESI-TOF") mass spectrometer to provide a means of routinely monitoring formation of product related variants.

10 When expressed in the *E. coli* BL21(DE3) host, two unique product modifications were observed. Deconvolution of the mass spectra characterized the variants as exhibiting mass shifts of +178Da and +258 Da compared to native product at 7,542 Da.

15 Product derived from these fermentations was passed through a purification procedure. In-process samples were characterized using a high resolution reversed phase assay that is capable of resolving minor product variants. Liquid chromatography mass spectroscopy ("LCMS") analysis confirmed that the new product variants exhibited mass shifts of +258Da (ret. time ~14.8 min) and +178 Da (ret. time ~15.2 Da).

20 Published literature indicated that these +258 Da and +178 Da mass shifts had previously been observed in proteins expressed with hexa His-tags resulting from the addition of 6-PGL or gluconolactone to the N-terminal residue. The CXC chemokine (Gro-beta-T) was not expressed using a hexa His-tags. Furthermore, the molecule does not exhibit any histidine rich regions. To confirm that the species were product related, each variant was isolated and
25 subjected to N-terminal sequencing. Sequencing confirmed proper product sequence and ensured that no hexa His-tag was present.

30 Variants were subjected to trypsin digestion and peptide mapping. Comparison with peptide maps generated using product standard revealed two new peaks in the tryptic map with the first peak eluting at 45.8 min (m/z 1094) and the second peak eluting at 46.5 min (m/z 1174). The new peptides were isolated and subjected to N-terminal sequencing which indicated that both had the same sequence (NIQSVKVK (SEQ ID NO:4)). The sequence homology

41

and presence of a 80 Da mass difference suggested that the species differed only by the presence of phosphorylation.

LCMS mass spectrometry analysis was performed on the peak with m/z 1174. The MS/MS experiment confirmed the peak has a sequence of
5 NIQSVKVK (SEQ ID NO:4). In addition, the y series fragment ions starting from y3 including y3, y4, y5, and y6 shown mass increase of 258 Da. However, the y2 ion did not show mass increase of 258 Da. This data indicated that the modification was on Lysine (no. 23 in the sequence) with mass increase of 258 Da.

10 To confirm that the modification observed was due to product gluconoylation, *in vitro* reactions were developed that employed reactive L-glucono-1,5-lactone or galactonic acid. Previous work had shown that these species were capable of inducing addition of gluconoyl species to the hexa His-tag [Geohegan, *et al.*].

15 Purified CXG chemokine (Gro-beta-T) was buffer exchanged into a TRIS buffer at pH 8.0. L-glucono-1,5-lactone or galactonic acid were added to a concentration of 450 mM and samples were incubated at room temperature for twenty minutes. Both lactones induced the same +178 Da modification of the CXG chemokine observed during expression in *E. coli*.

20

Example 4

This example illustrates the gluconoylation of internal lysine residues of a recombinant human Interleukin (human IL-18) expressed in *E. coli*.

High resolution reversed phase HPLC coupled with ESI-TOF mass
25 spectrometry was employed to screen an Interleukin product for 6-PGL adducts. Analysis of B-strain expressed interleukin yielded a product related species exhibiting a mass difference of +178 Da. Since the protein was expressed without a hexa His-tag, the modification was likely occurring at an internal lysine residue as had been observed with the CXG chemokine (see
30 Example 3).

High resolution reverse phase HPLC analysis of the Interleukin molecule enabled identification of multiple product species exhibiting +178 Da mass

42

shifts at RT 21.0, 22.0, 23.0 minutes and an additional minor species exhibiting a +258 Da shift (RT ~27.5 minutes).

In vitro modification of the Interleukin was also evaluated with L-glucono-1,5-lactone at pH 8.0, as described in the previous example. This reaction again yielded the same +178 Da modifications observed when the Interleukin was expressed in B strain of *E. coli*.

Example 5

This example shows that culturing cells in rich medium prevents gluconoylation or PGL adduct formation of internal lysine residues of a recombinant protein. Three fed-batch fermentation processes were compared in this study. The difference between the fermentation runs was the batch medium and feed compositions used during the production phase. A rich medium was used in the Process I fermentation, while the second and third batches (Processes II and III) were performed with a minimal medium. Glycerol was used as feed medium in Process I and II, while glucose was used in Process III.

The fermentation process to produce a recombinant Interleukin in *E. coli* was carried out in a fed-batch mode in a 15-liter fermenter. The fermentation was started as a batch process. The inoculum was prepared by aseptically transferring 0.5 mL of a glycerol stock culture into 1000 ml of PYE medium in a 2.8-L flask, as shown in Table 4.

Table 4. Seed medium composition for expansion of inoculum into fermenters.

Item	Batch Medium concentration
Yeast Extract	5 g/L
Phytone peptone	10 g/L
Sodium chloride	10 g/L
Dextrose	10 g/L
Kanamycin sulfate	50 mg/L

43

The culture was grown overnight at 27.5°C on a rotary shaker. The shake flask culture was then transferred into a fermenter containing 5 L of batch medium. The production medium consists of salts, amino acids, and kanamycin sulfate. Additionally, the rich medium is supplemented with high concentrations of yeast extract and phytone peptone, as shown in Table 5.

Table 5. Production stage medium composition for comparison of rich vs. minimal medium.

Item	Batch Medium Concentration		
	Process I	Process II	Process III
Yeast Extract	48 g/L	5.8 g/L	5.8 g/L
Phytone peptone	24 g/L	1.8 g/L	1.8 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	none	5 g/L	5 g/L
NaCl	none	1.3 g/L	1.3 g/L
Dextrose	none	none	33.5 g/L
Glycerol	28 g/L	28 g/L	none
K ₂ HPO ₄	15.3 g/L	8 g/L	6 g/L
KH ₂ PO ₄	1.7 g/L	3 g/L	3 g/L
Trace metals*	1 mL/L	1 mL/L	1 mL/L
MgSO ₄	5 mM	5 mM	5 mM
CaCl ₂	1 mM	1 mM	1 mM
Kanamycin sulfate	30 mg/L	30 mg/L	30 mg/L
* Trace Metals solution: FeCl ₂ ·6H ₂ O, 37.8 g/L; Na ₂ MoO ₄ ·H ₂ O, 0.7 g/L; ZnSO ₄ ·7H ₂ O, 0.4 g/L; MnCl ₂ ·4H ₂ O, 0.5 g/L; CuSO ₄ ·5H ₂ O, 0.8 g/L; CoCl ₂ ·6H ₂ O, 0.8 g/L; H ₃ BO ₃ , 0.2 g/L.			

The pH of each medium was maintained at approximately 7.3 using ammonium hydroxide. Temperature was controlled at about 27.5°C. Feed medium, glycerol or dextrose was sterilized separately and aseptically connected to a fermenter using silicone rubber tubing.

Supply of feed medium was initiated when the initial batch amount in culture was depleted. A polarographic oxygen electrode monitored dissolved oxygen tension in the fermenter. Carbon feed rate was controlled in a cascade mode to keep constant dissolved oxygen tension above 20%. Aeration was maintained at 10 slpm and pressure at 7.0 psig over pressure. Agitation speed of 800 rpm was used from beginning to the end of the fermentation run. At an OD₅₅₀ of approximately 40 units, 100 mL of 1 mM IPTG was injected into culture to induce recombinant gene expression.

Handwritten marks: "H" and "44"

Reverse-phase HPLC analysis of the samples collected 24 hours post IPTG addition indicated reduction in the level of gluconolactone in the product. The absence of 6-PGL adduct in Process I, and its presence in Process II and III, indicates that the use of rich medium, and not glycerol carbon source, was responsible for elimination of the 6-PGL adduct. Table 6 summarizes the results of the analysis.

Table 6. Analysis of phosphogluconolactone adduct in three fermentation processes to produce a recombinant interleukin.

Process No.	phosphogluconolactone adduct on human interleukin (IL-18)
Process I	Absent
Process II	Present
Process III	Present

Example 6

This example shows that the K-12 strain of *E. coli* has 100-fold higher pgl activity than B strain.

6-Phosphogluconolactonase activity was measured in extracts of two different strains with BL12(DE3) as the parental one, ECC005 and ECO680, and two other strains originated from a K-12 genotype, ECO706 and ATG3995.

To culture the strains, 2-L shake flasks containing 1 L of PYE medium + 1% glucose and 50 µg/ml kanamycin were inoculated with 0.4 mL of cell suspension from frozen vials. Incubation was at 30°C, with an agitation of 220 rpm for 6 or 7.5 hours. Samples were taken at the indicated time points to measure the optical density at 550 nm and collect pellets to measure the pgl activity. Details of *in vitro* assay to measure the pgl activity is presented below.

The pgl activity was assayed fluorimetrically, at 340 nm and 25°C, in cell-free extracts. The cell-free extracts were prepared as previously described (Maltra and Lobo, *Journal of Biological Chemistry* 246: 475-488(1971)); with essentially the same resuspension buffers, 50 mM-HEPES pH 7.3 containing 5 mM-EDTA and 5 mM-β-mercaptoethanol, but cells were broken by sonication (5 cycles of 20 sec.).

X
45

The pgi was assayed using a previously published method (Sinha and Maltra *Journal of General Microbiology*, 1992; 138: 1865-1873) with some modifications. The assay consisted of a pre-incubation of 1 mL-mixture containing 50 μ M-glucose-6-phosphate, 0.5 mM-NADP⁺, and 1 unit of glucose-6-phosphate dehydrogenase in 100 mM-MES buffer, pH 6.5, containing 25 mM-KCl and 10 mM-MgCl₂. Once the reaction reached the plateau, it was followed by the addition of 2 units of 6-phosphogluconate dehydrogenase resulting in a slow increase in the absorbance due to the spontaneous hydrolysis of the 6-PGL formed during the pre-incubation step. At the addition of cell-free extracts, any significant increment in the fluorescence is because of the phosphoglunolactonase activity. All pgi activities were estimated in the linear range of the absorbance increase following addition of the cell-free extract.

The enzyme activity was estimated by subtracting the rate of spontaneous hydrolysis of 6-PGL. The enzyme activities were expressed in mmol NADPH per minute and per mg of total protein. Total protein was determined by the Bicinchoninic acid (BCA) Protein Assay (Pierce, Illinois, USA).

In the strains based parentally in a K-12 genotype, we have detected upwards of 100-fold more activity than in B strains.

Table 7 summarizes the results of the enzyme assays on the two strain backgrounds.

46

Table 7: Phosphogluconolactonase activity measured in K-12 and B strains of E. coli

"K" STRAINS			
Strain	Cultivation	Activity	Sp. Hydrolysis
	Time (h)	(mmol NADH/min/mg protein)	(mmol/min/mg protein)
ATCC 10798	5.5	1.081	0.0011
	6.5	2.899	0.0012
	7.5	2.584	0.0012
K-12 expressing a human interleukin (IL-18)	7.5	3.539	0.0011
"B" STRAINS			
Strain	Cultivation	Activity	Sp. Hydrolysis
	Time (h)	(mmol NADH/min/mg protein)	(mmol/min/mg protein)
ATCC 47092	5.5	0.028	0.0012
BL21(DE3) expressing a human interleukin (IL-18)	5.5	0.032	0.0012
	6.5	0.019	0.0011
	7.5	0.032	0.0012

5 **Example 7**

 This example shows that expressing a heterologous polypeptide, a CXC chemokine (otherwise known as Gro-beta-T), in *E. coli* BL21 strain results in 6-PGL adduct, whereas expressing the same polypeptide in a K-12 strain prevents gluconoylation of internal lysines.

10 Ten fermentation runs were carried out using four different strains of *E. coli* constructed to recombinantly express a CXC chemokine. This example demonstrates the effect of host background versus promoter system on the presence of 6-PGL adduct formation of the recombinant protein by using two expression systems with each host cell background. Table 8 describes the

15 strains that were used.

Table 8: Host background and promoter systems used to express a CXC chemokine in *E. coli*.

Strain No.	Host Background	Promoter system
1	BL21 (DE3)	T7 polymerase
2	K-12 (DE3)	T7 polymerase
3	BL21 (DE3)	Lambda pL
4	K-12	Lambda pL

47

Fermentation to produce the CXC chemokine (Gro-beta-T) in *E. coli* was carried out in a fed-batch mode in a 15-liter fermenter. Fermentation was started as a batch process. Inoculum was prepared by aseptically transferring 0.75 mL of a glycerol stock culture into 100 mL of PYE medium in a 500 mL baffled flask. Culture was grown for 7 hours at 32.0°C on a rotary shaker. Shaken flask culture was then mixed with 1.0 L of PYE medium and transferred into a fermenter containing 8.0 L of batch medium. Production medium consisted of salts and either carbenicillin or kanamycin sulfate depending on the promoter. Media formulations for seed expansion are provided in Table 9, and medium formulation for production of CXC chemokine in *E. coli* are provided in Table 10.

Table 9: Medium formulation for seed expansion.

Component	Concentration
Yeast Extract	5 g/L
Phytone peptone	10 g/L
Sodium chloride	10 g/L
Dextrose	10 g/L
Kanamycin sulfate	50 mg/L

Table 10: Medium formulation for production of CXC chemokine in *E. coli*.

Component	Concentration
Ammonium Sulfate	5 g/L
Potassium phosphate, Dibasic	6 g/L
Potassium phosphate, Monobasic	3 g/L
Sodium chloride	1.3 g/L
Dextrose	18 g/L
Magnesium sulfate	4.8 g/L
Biotin	1 mg/L
Trace Metals *	10 mL/L
Kanamycin sulfate	50 mg/L
	-or-
Carbenicillin	25 mg/L
* Trace Metals solution: FeCl ₂ ·6H ₂ O, 3.78 g/L; Na ₂ MoO ₄ ·H ₂ O, 0.7 g/L; ZnSO ₄ ·7H ₂ O, 0.4 g/L; MnCl ₂ ·4H ₂ O, 0.5 g/L; CuSO ₄ ·5H ₂ O, 0.8 g/L; CoCl ₂ ·6H ₂ O, 0.8 g/L; H ₃ BO ₃ , 0.2 g/L	

Handwritten:
48

pH of each medium was maintained at about 7.0 using ammonium hydroxide. Temperature was controlled at about 32.0°C and increased to about 37.5°C at induction. Feed medium and dextrose were sterilized separately and aseptically connected to a fermenter using silicone rubber tubing.

Supply of feed medium was initiated when the initial batch amount in the culture was depleted. A polarographic oxygen electrode monitored dissolved oxygen tension in the fermenter. Carbon feed rate was controlled in a cascade mode to keep constant dissolved oxygen tension above about 25%. Aeration was maintained at about 10 slpm and the pressure at about 7.0 psig over pressure. Agitation speed of about 400 rpm was used at the beginning and increased as required to maintain about 25% dissolved oxygen tension. At an OD₅₅₀ of approximately 14 units, 100 mL of 1.0 mM IPTG was injected into the culture, or the temperature was increased to 37.5°C to induce recombinant gene expression.

None of the fermentation runs using a K-12 host background had detectable 6-PGL adduct formation on recombinantly expressed polypeptide, whereas runs using B strain in concert with T7 promoter all exhibited the presence of detectable 6-PGL adduct formation on recombinantly expressed polypeptide. The three runs using B strain and the pL promoter did not have detectable adduct formation. These data demonstrate that expressing a recombinant protein in a host strain having pgl activity, *e.g.* K-12, may prevent 6-PGL adduct formation in recombinant proteins that are susceptible to this modification, see Example 3. The presence of 6-PGL adduct formation in CXC chemokine expressed in *E. coli* B and K-12 strains is presented for each fermentation in Table 11.

49

Table 11: Presence of 6-PGL adduct on CXC chemokine expressed by T7 or pL promoter in *E. coli* B and K-12 strains.

Strain genotype	Promoter	Run No.	Gluconolactone adduct 5 hr post induction [% of product peak]
B	T7	1	21.7
		2	5.8
		3	4.2
		Average	10.6
K-12	T7	1	0
		2	0
		Average	0
B	pL	1	0
		2	0
		3	0
		Average	0
K12	pL	1	0
		2	0
		Average	0

Example 8.

5 This example shows that expressing a heterologous polypeptide, human Interleukin (human IL-18), in *E. coli* BL21 strain results in 6-PGL adduct formation, whereas expressing the same polypeptide in a K-12 strain will prevent 6-phosphogluconoylation of internal lysines.

10 *E. coli* BL21 (DE3) and K-12 strains were constructed to express a human Interleukin (IL-18). Cultures were grown in minimal medium as described in Example . Monitoring for product modification with 6-PGL was conducted at various time points throughout the culture, using methods described in Example .

15 Results are expressed as peak area ratios of unmodified product to modified product. Higher numbers indicate a lesser proportion of gluconoylated product. It is evident that the extent of gluconoylation in BL21(DE3) strain is significantly greater than in K-12 strain. Phosphogluconoylation of a human

80
50

Interleukin (IL-18) expressed in B and K-12 strains of *E. coli* is summarized in Table 12.

5 **Table 12: Phosphogluconoylation of a human Interleukin expressed in B and K-12 strains of *E. coli***

<i>E. coli</i> strain	Time post induction (h)	Area ratio of unmodified product to modified product
K-12	18	58.4
	18	44.5
	20	N/d
	22	29.3
	24	30.0
BL21(DE3)	22	8.3
	24	7.7
N/d = modified product not detectable		

Example 9

10 This example illustrates that overexpression of heterologous *pgl* in *E. coli* host cells leads to increased metabolic conversion of 6-PGL to its product 6-phosphogluconate thereby reducing the pool of 6-PGL available for adduct formation. A *P. aeruginosa* *pgl* gene was cloned and engineered into a plasmid based inducible expression vector system that is compatible with *colE1* origin of replication based plasmids, such that two different plasmids may be maintained in the same host cell. The inducible expression level of

15 *P. aeruginosa* *pgl* can be regulated at will, in a fashion independent of endogenous *E. coli* metabolic pathways and independent of the inducible expression of the recombinant protein of interest. Accordingly, recombinant *pgl* expression can be regulated such that the pool of 6-PGL was diminished below the level required for adduct formation, but not to the extent that host

20 cell resources were substantially affected. Therefore, the level of the desired recombinant protein can be separately regulated to give very high expression levels.

Cloning of *P. aeruginosa* pgl.

P. aeruginosa pgl was cloned as follows. *P. aeruginosa* was obtained from the American Type Culture Collection (American Type Culture Collection, 12301 Parkdawn Drive, Rockville MD 20852-1776): *Pseudomonas aeruginosa*, strain ATCC 27853. 5' and 3' PCR amplification primers were designed and synthesized to direct the PCR amplification of the entire pgl gene, including the region just upstream of the initiation codon ATG. The sequence of the sense and anti-sense amplification primers are:

10 5' GGCCTCGAGCTCGGTGGCCCTGGTGGCCC 3' (SEQ ID NO:4)

and

 5' GCCCTCGAGTCCGCCACTCAGGGGTACCAAT 3' (SEQ ID NO:5)

15 respectively. Bolded sequences indicate XhoI sites introduced into the gene to enable subsequent cloning steps.

 It was additionally found that the *P. aeruginosa* gene is very GC-rich and will not PCR amplify under normal amplification conditions. It was found that PCR amplification requires the use of PCR amplification conditions that are optimized for GC-rich templates, specifically Advantage-GC cDNA Polymerase
20 Mbx (cat. 8419-1; BD Biosciences Clontech: Palo Alto, CA; USA). The corresponding pgl DNA sequence (SEQ ID NO:7) encoding the polypeptide SEQ ID NO:8 was PCR amplified from whole *P. aeruginosa* cells after 25 cycles of 94°C for 30 seconds followed by 68°C for 1.5 minutes. The amplification was then completed by a single incubation at 68°C for 3 minutes. The PCR
25 product was isolated by agarose gel electrophoresis and column chromatography over a QIAquick Gel Extraction Kit (cat. 28704, Qiagen: Valencia, CA; USA). The amplified, gel purified pgl DNA was eluted in water and immediately cloned into the cloning vector pCR2.1 using a TOPO TA Cloning® kit (cat. K4550-40, Invitrogen: Carlsbad, CA; USA) and transformed
30 into One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (cat. C4040-06, Invitrogen: Carlsbad, CA; USA). Resulting amp^r colonies were screened for inserts by EcoRI digestion and electrophoresis of the products. Sequence

SV

verified inserts were released from the cloning vector by XhoI digestion and purified using the QIAquick Gel Extraction Kit. pECO-1 expression vector DNA (BloCat 73552, GlaxoSmithKline: King of Prussia, PA; USA) was cut with Sall and treated with Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP) (cat M0290S, New England Biolabs: Beverly, MA; USA), and then purified using the QIAquick Gel Extraction Kit. The XhoI digested inserts and the Sall treated pECO-1 were ligated using T4 DNA ligase essentially as described by the manufacturer (cat. M0202S; New England Biolabs: Beverly, MA; USA). Two microliters (2 µl) of the ligation reaction was transformed into One Shot® TOP10 chemically Competent *E. coli* cells as described by the manufacturer (cat. C4040-06; Invitrogen: Carlsbad, CA; USA). Colonies were screened for the presence pgl inserts in the correct orientation by PCR. Clone pECO-1pglcl2-13 was selected for further study as set forth below.

The resulting construct is based on the pACYC184 plasmid backbone, and comprises the following genetic functional elements: (1) p15A ori, which allows plasmid episomal maintenance in the same host cell as heterologous plasmids with the colE1-type ori element; (2) chloramphenicol selectable marker; (3) a tetracycline inducible promoter upstream of a multiple cloning site; (4) the full length *P. aeruginosa* pgl gene.

The final construct, pECO-1pglcl2-13, was transformed as described above into BL21 (DE3) cells expressing a human Interleukin for further study. The DNA sequence of pECO-1pglcl2-13 sequence is presented as SEQ ID NO:9 and the restriction map of pECO-1pglcl2-13 is presented in Figure 1.

Cultures were performed as described in Example 3. Analysis for 6-PGL adduct was performed as described in Example 4. Phosphogluconolactonase activity was measured as described in Example 6. Additional strains expressing the human Interleukin (IL-18) that were examined in the study include BL21 (DE3) without pECO-1pglcl2-13 and K-12. The strains with the pgl plasmid were examined with and without the addition of anhydrotetracycline at 20 ng/mL. A summary of the presence or absence of 6-PGL adduct formation in cells expressing pgl is summarized in Table 13 as shown below.

53

Table 13: Impact of pgl expression on phosphogluconoylation of a human Interleukin

Strain	Maximum pgl activity IU/min/g DCW	6-PGL adduct formation on human Interleukin (IL-18)
BL21 (DE3)	0.002	Present
BL21 (DE3) pECO-1pgl2-13, no tat	0.58 ± 0.13	Absent
BL21 (DE3) pECO-1pgl2-13, tat induced	0.64 ± 0.11	Absent
K-12	0.98 ± 0.14	Absent
DCW=dry cell weight		

This example has demonstrated that co-expression of *Pseudomonas* phosphogluconolactonase with the human Interleukin (IL-18) successfully prevents formation of the 6-PGL adduct in the B strain of *E. coli*.

Example 10

Human Interleukin-18 (IL-18) is an immunomodulatory cytokine that is being developed as an anti-cancer agent for the treatment of renal cell carcinoma and malignant melanoma. Descriptions of human and murine IL-18 are presented in the following U.S. patents: U.S. Pat. No. 6,582,689, U.S. Pat. No. 5,914,253, U.S. Pat. No. 5,879,942, U.S. Pat. No. 5,912,324, U.S. Pat. No. 5,914,253, U.S. Pat. No. 6,060,283, U.S. Pat. No. 6,087,116, and U.S. Pat. No. 6,214,584, which are incorporated herein by reference in their entirety. IL-18 is believed to stimulate the immune system, promote Fas-induced tumor cell death and cell mediated immunity. The polypeptide sequence of IL-18 (SEQ ID NO:10) may be produced in *E. coli* BL21(DE3). It may be expressed from the polynucleotide sequence for pro-IL18 (SEQ ID NO:11), which is further processed to mature IL-18 by a processing enzyme, Caspase 5, co-expressed in the same cell.

6-Phosphogluconolactonase from Gram-negative bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*, was cloned into a BL21(DE3) strain. Production of IL-18 in this strain produces IL-18 with no detectable adduct formation resulting in a direct increase in the yield of the desired product. Furthermore, the

SH
54

correction of the pgl deficiency has also resulted in >10% increase in specific productivity. Thus, the combined effect of product quality and specific productivity improvements by the use of this modified production strain has translated into a >25% increase in titer yield at the fermentation stage. It is anticipated that the elimination of adduct formation will have a direct, positive impact on the purification process and further increase the overall process yield.

Example 11

Gluconoylation of IL-18 was monitored by HPLC analyses on IL-18 produced in BL21(DE3) cells with and without co-expression of pgl. Adduct formation was detected as a shoulder peak eluting approximately two minutes after purified IL-18. When IL-18 was expressed in and purified from *E. coli* strain BL21DE3 (pgl minus), the main peak area (i.e., area of the peak for IL-18 having no detectable gluconoyl adduct formation) for IL-18 was approximately 56%. While expression and purification of IL-18 in BL21(DE3) (pgl plus) cells produced a main peak area of about 88% and showed no adduct formation based on the High Resolution HPLC assay."

Example 12

Two vectors were created comprising polynucleotides that encode pro-IL-18 (SEQ ID NO: 11), Caspase 5 (SEQ ID NO:12). Both were pET vectors wherein polypeptide production was induced using aT7 promoter. One vector also comprised a polynucleotide encoding pgl from *P. aeruginosa* (SEQ ID NO:7) that was induced by the same promoter as pro-IL-18. The entire sequence of the pET vector comprising pro-IL-18 and Caspase 5 is presented in SEQ ID NO:13. A restriction map of this vector is presented in Figure 2. The entire sequence of the pET vector comprising pro-IL-18, Caspase 5 and pgl is presented in SEQ ID NO:14. A restriction map of this vector is presented in 3. When IL-18 was expressed in *E. coli* BL21(DE3) cells using these vectors, the amount of recoverable IL-18 was greatly improved when the polypeptide was co-expressed with pgl compared with the expression of IL-18 without pgl. The

amount of recovered IL-18 obtained from each expression vector in *E. coli* BL21(DE3) cells is presented in Table 14.

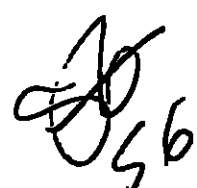
Table 14: IL-18 Maximum Titer Produced in "B" Strain *E. coli* with and without Co-expression of pgl

Strain*	pgl gene	Maximum Titer (g/L)
RBB057	No	4.32 (+/- 0.4)
RBB059	Yes	6.78 (+/- 0.1)
*Both strains are <i>E. coli</i> B strain		

5

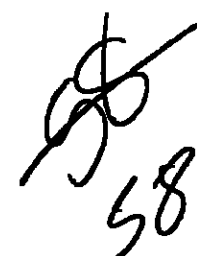
All publications and references, including but not limited to patents and patent applications, cited in this specification are herein incorporated by reference in their entirety as if each individual publication or reference were specifically and individually indicated to be incorporated by reference herein as being fully set forth. Any patent application to which this application claims priority is also incorporated by reference herein in its entirety in the manner described above for publications and references.

10

Claims

1. A method for preventing gluconoylation of a polypeptide expressed in a microorganism, comprising growing said microorganism in rich culture medium.
- 5 2. The method of claim 1, wherein the microorganism does not demonstrate significant 6-phosphogluconolactonase activity when grown in minimal medium.
3. The method of claim 1, wherein the microorganism is *E. coli*.
4. The method of claim 3, wherein the *E. coli* is B strain.
- 10 5. The method of claim 1, wherein the rich culture medium comprises a complex nitrogen source.
6. The method of claim 5, wherein the rich culture medium is capable of maintaining cell growth at ratio of 1:1 for concentration of complex nitrogen source to cell density.
- 15 7. The method of claim 5, wherein the complex nitrogen source comprises tryptone.
8. The method of claim 5, wherein the complex nitrogen source comprises peptone.
9. The method of claim 5, wherein the complex nitrogen source comprises
- 20 yeast extract.
10. The method of claim 1, wherein the culture medium is Superbroth.
11. The method of claim 10, wherein the Superbroth medium is doubly concentrated.
12. The method of claim 1, wherein the microorganism is transfected with a
- 25 recombinant DNA molecule encoding a heterologous polypeptide.
13. A method for preventing gluconoylation of a polypeptide expressed in *E. coli* comprising fermenting a K strain variety of *E. coli* for the expression of the polypeptide.
14. The method of claim 13, wherein the K strain demonstrates 100-fold
- 30 higher phosphogluconolactonase activity compared with B strain grown under the same conditions.
15. The method of claim 14, wherein the K strain is K-12.

16. A method for preventing gluconoylation of polypeptides expressed in a microorganism, comprising introducing DNA into the microorganism, wherein the DNA encodes a polypeptide that demonstrates 6-phosphogluconolactonase activity.
- 5 17. The method of claim 16, wherein the microorganism is *E. coli*.
18. The method of claim 16, wherein the DNA comprises DNA encoding a 6-phosphogluconolactonase enzyme.
19. The method of claim 18, wherein the DNA encoding the 6-phosphogluconolactonase enzyme has at least 70% sequence identity to DNA
- 10 encoding 6-phosphogluconolactonase from *Pseudomonas*.
20. The method of claim 19, wherein the *Pseudomonas* is *P. aeruginosa*.
21. The method of claim 18, wherein the DNA encoding the 6-phosphogluconolactonase enzyme has at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:7.
- 15 22. The method of claim 18, wherein the DNA encoding the 6-phosphogluconolactonase enzyme has at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:7.
23. The method of claim 18, wherein the 6-phosphogluconolactonase enzyme has an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to
- 20 SEQ ID NO:8.
24. The method of claim 18, wherein the 6-phosphogluconolactonase enzyme has an amino acid sequence having at least 95% sequence identity to SEQ ID NO:8.
25. The method of claim 18, wherein the DNA encoding the 6-phosphogluconolactonase enzyme comprises the sequence set forth in SEQ ID
- 25 NO:7.
26. The method of claim 16, wherein the DNA is recombinant DNA.
27. The method of claim 16, wherein the DNA is transformed into the genomic DNA of the microorganism.
- 30 28. A microorganism capable of preventing gluconoylation of polypeptides.



28. The microorganism of claim 28, wherein the microorganism comprises DNA that encodes a polypeptide that demonstrates 6-phosphogluconolactonase activity.
30. The microorganism of claim 28, wherein the microorganism comprises
5 DNA that encodes 6-phosphogluconolactonase.
31. The microorganism of claim 28, wherein the DNA that encodes 6-phosphogluconolactonase has at least 90% sequence identity to DNA encoding a 6-phosphogluconolactonase enzyme from *Pseudomonas* and wherein the microorganism is not *Pseudomonas*.
- 10 32. The microorganism of claim 28, wherein the DNA that encodes 6-phosphogluconolactonase has at least 95% sequence identity to DNA encoding a 6-phosphogluconolactonase enzyme from *Pseudomonas* and wherein the microorganism is not *Pseudomonas*.
33. The microorganism of claim 31, wherein the DNA that encodes 6-
15 phosphogluconolactonase is from *P. aeruginosa*.
34. The microorganism of claim 28, wherein the microorganism is a strain of *E. coli*.
35. , The microorganism of claim 31, wherein the microorganism is a strain of *E. coli* and the wherein the DNA that encodes 6-phosphogluconolactonase is
20 incorporated into the genome of the microorganism.
36. An isolated polynucleotide comprising a polynucleotide having at least a 90% identity to the polynucleotide set forth in SEQ ID NO:7.
37. The isolated polynucleotide of claim 36, comprising a polynucleotide having at least a 90% identity to a polynucleotide encoding a polypeptide
25 comprising amino acids having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:8.
38. The isolated polynucleotide of claim 36, wherein the DNA encodes a protein demonstrating 6-phosphogluconolactonase activity.
39. The isolated polynucleotide of claim 36, wherein the DNA sequence is set forth in SEQ ID NO:7.
- 30 40. The isolated polynucleotide of claim 36, wherein the DNA sequence has at least 90% sequence identity to DNA encoding 6-phosphogluconolactonase from *P. aeruginosa*.

SA

41. The isolated polynucleotide of claim 35, further comprising a polynucleotide that encodes human interleukin-18.
42. An isolated polynucleotide, comprising a polynucleotide having at least a 95% identity to the polynucleotide set forth in SEQ ID NO:7.
- 5 43. A method of improving polypeptide crystal formation comprising expressing said polypeptide according to the method of claim 1.
44. A method of improving polypeptide crystal formation comprising expressing said polypeptide according to the method of claim 16.
45. The method of claim 1, further comprising improving growth efficiency
10 wherein said polypeptide demonstrates an increased titer yield at fermentation stage compared with gluconoylated polypeptide.
46. The method of claim 16, further comprising improving growth efficiency wherein said polypeptide demonstrates an increased titer yield at the fermentation stage compared with gluconoylated polypeptide.
- 15 47. A method of producing a human interleukin comprising co-expressing said human interleukin in a microorganism with an enzyme having 6-Phosphogluconolactonase ("pgl") activity.
48. The method of claim 47, wherein the human interleukin is IL-18.
49. The method of claim 47, wherein the microorganism is *E. coli*.
- 20 50. The method of claim 49, wherein the pgl is encoded by a polynucleotide that is transformed into genome of said *E. coli*.
51. A method of producing a human interleukin comprising expressing said human interleukin in a microorganism that is grown in a rich culture medium.
52. The method of claim 51, wherein the human interleukin is IL-18.
- 25 53. The method of claim 51, wherein the microorganism is *E. coli*.
54. The method of claim 51, wherein the rich culture medium comprises phytone peptone.
55. The method of claim 51, wherein the rich culture medium comprises bacto yeast extract.
- 30 56. A microorganism completely free of infectious lambda phage expression.
57. The microorganism of claim 56, wherein lambda phage capsid structural protein, gpE, is deleted or disrupted.

60

- 58. The microorganism of claim 56, wherein the microorganism is *E. coli*.
- 59. The microorganism of claim 56, comprising a T7 RNA polymerase gene.

6

pECO-1-pgl-2-13

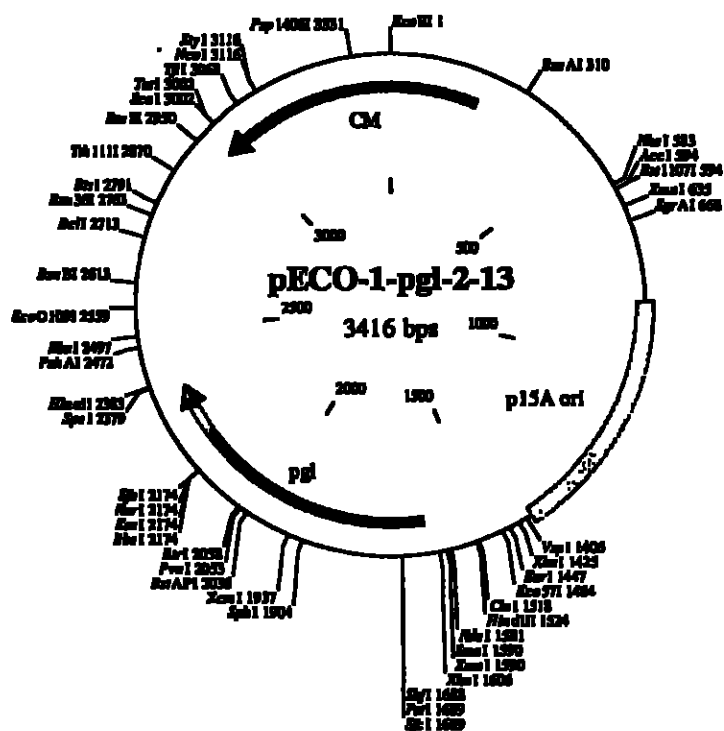


Figure 1

2

SEQ ID NO:9

DNA

pECO-1pg1cl2-13

1 GAATTCGGGA TGAGCATTCA TCAGGCGGGC AAGAAATGTGA ATAAAGGCCG GATAAAACTT
61 GTGCTTATTT TTCCTTACGG TCCTTAAAAA GGCCGTAAATA TCCAGCTGAA CGGTCTGGTT
121 ATAGGTACAT TGAGCAACTG ACTGAAATGC CTCAAAATGT TCTTTACGAT GCCATTGGGA
181 TATATCAACG GTGGTATATC CAGTGATTTT TTTCTCCATT TTAGCTTCCT TAGCTCCTGA
241 AAATCTCGAT AACTCAAAAA ATACGCCCGG TAGTGATCTT ATTTCAATTAT GGTGAAAGTT
301 GGAACCTCTT ACGTGCCGAT CAACGTCTCA TTTTCGCCAA AAGTTGGCCC AGGGCTTCCC
361 GGTATCAACA GGGACACCAG GATTTATTTA TTCTGCGAAG TGATCTTCCG TCACAGGTAT
421 TTATTCGGCG CAAGTGCGT CGGGTGATGC TGCCAACTTA CTGATTTAGT GTATGATGGT
481 GTTTTGTAGG TGCTCCAGTG GCTTCGTGTT CTATCAGCTG TCCCTCCTGT TCAGCTACTG
541 ACGGGGTGGT GCGTAACGGC AAAAGCACCG CCGGACATCA GCGCTAGCGG AGTGTATACT
601 GGCTTACTAT GTTGGCACTG ATGAGGGTGT CAGTGAAGTG CTTCATGTGG CAGGAGAAAA
661 AAGGCTGCAC CGGTGCGTCA GCAGAAATATG TGATACAGGA TATATTCCGC TTCTTCGCTC
721 ACTGACTCGC TACGCTCGGT CGTTGCACTG CCGCGAGCGG AAATGGCTTA CGAACGGGGC
781 GGAGATTTCC TGGAAAGATG CAGGAAGATA CTTAACAGGG AAGTGAGAGG GCCGCGGCAA
841 AGCCGTTTTT CCATAGGCTC CGCCCCCTG ACAAGCATCA CGAAATCTGA CGCTCAAATC
901 AGTGGTGGCG AAACCCGACA GGACTATAAA GATACCAGGC GTTTCCCCCT GCGGCTCCC
961 TCGTGCGCTC TCCTGTTCCT GCCTTTCGGT TTACCGGTGT CATTCCGCTG TTATGGCCGC
1021 GTTGTCTCA TTCCACGCCT GACACTCAGT TCCGGGTAGG CAGTTCGCTC CAAGCTGGAC
1081 TGTATGCACG AACCCCCGT TCAGTCCGAC CGCTGCGCCT TATCCGGTAA CTATCGTCTT
1141 GATCCCAACC CGGAAAGACA TGCAAAAGCA CCACTGGCAG CAGCCACTGG TAATTGATTT
1201 AGAAGAGTTA GTCTTGAAGT CATGCGCCGG TTAAGGCTAA ACTGAAAGGA CAAGTTTTGG
1261 TGACTGCGCT CCTCCAAGCC AGTTACCTCG GTTCAAAGAG TTGGTAGCTC AGAGAACCTT
1321 CGAAAAACCG CCTGCAAGG CGGTTTTTTC GTTTTCAGAG CAAGAGATTA CGCGCAGACC
1381 AAAACGATCT CAAGAAGATC ATCTTATTAA TCAGATAAAA TATTTCTAGA TTTCAGTGCA
1441 ATTTATCTCT TCAATGTAG CACCTGAAGT CAGCCCCATA CGATATAAGT TGTAATTCTC
1501 ATGTTTGACA GCTTATCATC GATAAGCTTT AATGCGGTAG TTTATCACAG TTAAATTGCT
1561 AACGCAGTCA GGCACCGTGT CATATGATC CCGGTTACG TCGAGCTCGA GCTCGGTGGC
1621 CCTGGTGGCC CGCGATGGGA GGAGTTGGTA TGGCGATTTT TGAGTTGAAG CTGCCGGCCG
1681 GCGTCGGCCT GCAGGTCTGG GGCAGCGCCG CCGAGCAGGC CCGCGGCTG GCCGCCGAGG
1741 TCGCCGGCCG GTTGCCTCTG GCGCTGGCCG AGCAGGGCCA GCGCTGCTG GTGGTGTCCG
1801 GTGGGCGCAG TCCGTGGCC TTCTTCGAAG CCTTGAGCGA GGAGCCGCTG GACTGGTCCG
1861 GGATCACCGT CAGCCTGGCC GACGAGCGCT GGGTGCCGGA GTCGCATGCC GATAGCAACG
1921 CCGGCTTGGT TCGCCGCCAC CTGCTCCGTG GCGAGGCGGC GAAGGCGCGC TTCATCGGCC
1981 TCTACCAGCC GCGCGCGAGC CTGGAGGAAG CGGCCGAGCT GGCCGACCAT CACCTGCACG
2041 AGCTGCCATT GCCGATCGAC GTGCTGTGTC TCGGCATGGG CGACGACGGC CATACCGCCT
2101 CGCTGTTCCT GAACAGCCCT GGCCTGAGCC TGGCGATGGA TCCCCAGGGG ACGCGCCGTT
2161 GCCTGCCGAT GTGGGCGCCG AGCGTGCCGC ACCAGCGCCT GACCTGCCC GCGCGCGTGC
2221 TGGCGGCGGC GAAGGTGCAG CTGCTGGCGA TCCAGGGCCA GTCCAAGCTG GCCACCTGA
2281 ACGCCGCGCT GCGGTCGAG GACGAACGGC GGATGCCGCT TCGCGCCTTC CTCGCGCGCG

2341 CGCTGACGAT CCATTGGTAC CCCTGAGTGG CGGACTCGAC TAGTCAACGC CATGAGCGGC
2401 CTCATTTCTT ATTCTGAGTT ACAACAGTCC GCACCGCTGT CCGGTAGCTC CTTCCGGTGG
2461 GCGCGGGGCA TGACTATCGT CGCCGCACTT ATGACTGTCT TCTTTATCAT GCAACTCGTA
2521 GGACAGGTGC CGGCAGCGCC CAACAGTCCC CCGGCCACGG GGCCTGCCAC CATACCCACG
2581 CCGAAACAAG CGCCCTGCAC CATATGTTC CGGATCTGCA TCGCAGGATG CTGCTGGCTA
2641 CCCTGTGGAA CACCTACATC TGTATTAACG AAGCGCTAAC CGTTTTTATC AGGCTCTGGG
2701 AGGCAGAATA AATGATCATA TCGTCAATTA TTACCTCCAC GGGGAGAGCC TGAGCAAACF
2761 GGCCTCAGGC ATTTGAGAAG CACACGGTCA CACTGCTTCC GGTAGTCAAT AAACCGGTAA
2821 ACCAGCAATA GACATAAGCG GCTATTTAAC GACCCGTGCC TGAACCGAGG ACCGGGTGGA
2881 ATTTGCTTTC GAATTTCTGC CATTCATCCG CTTATTATCA CTTATTCAGG CGTAGCACCA
2941 GCGGTTTAAG GGCACCAATA ACTGCCTTAA AAAAAATTAC CCCC GCCCTG CCACTCATCG
3001 CAGTACTGTT GTAAATTCATT AAGCATTCTG CCGACATGGA AGCCATCACA GACGGCATGA
3061 TGAACCTGAA TCGCCAGCGG CATCAGCACC TTGTCGCCCT GCGTATAATA TTTGCCCATG
3121 GTGAAAACGG GGGCGAAGAA GTTGTCCATA TTGGCCACGT TTAAATCAA ACTGGTGAAA
3181 CTCACCCAGG GATTGGCTGA GACGAAAAAC ATATTCTCAA TAAACCCFTT AGGGAAATAG
3241 GCCAGGTTTT CACCGTAACA CGCCACATCT TCGGAATATA TGTGTAGAAA CTGCCGAAA
3301 TCGTCGTGGT ATTCACTCCA GAGCGATGAA AACGTTTCAG TTTGCTCATG GAAAACGGTG
3361 TAACAAGGGT GAACACTATC CCATATCACC AGCTCACCCT CTTTCATTGC CATAAG

Figure 2

64

pET28ProIL18Casp5

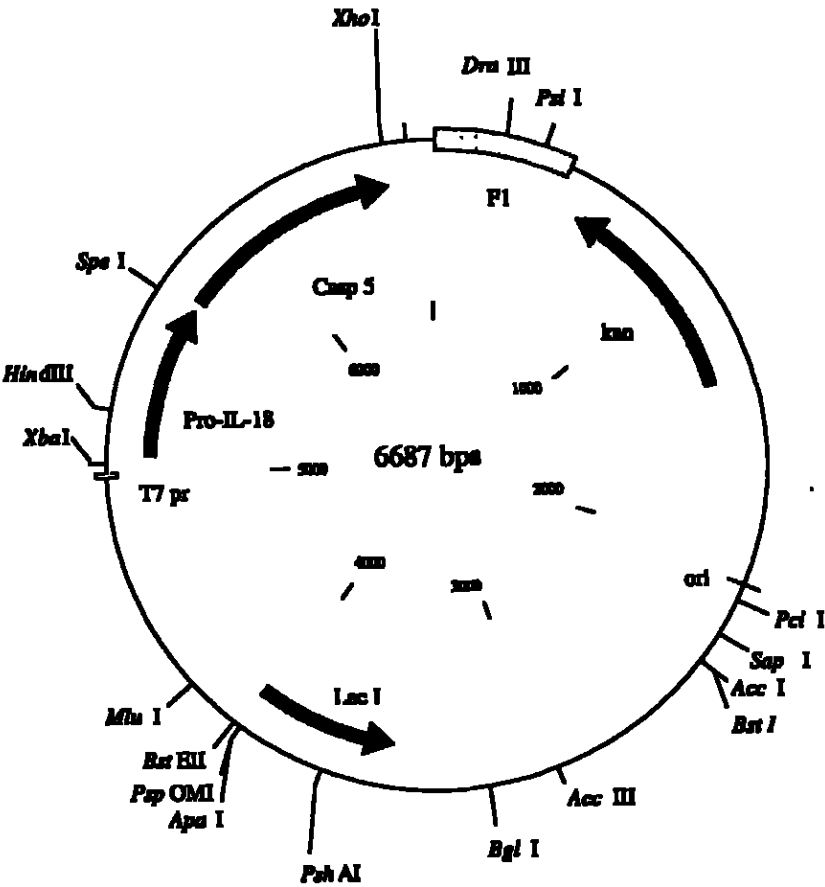


Figure 3

SEQ ID NO:13

DNA

pBT28ProIL18Casp5

```
1  TGGCGAATGG GACGCGCCCT GTAGCGGCGC ATTAAGCGCG GCGGGTGTGG TGGTTACGCG
61  CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT CCTTCGCTT TCTTCCCTTC
121 CTTTCTCGCC ACGTTGCGCG GCTTCCCCG TCAAGCTCTA AATCGGGGCG TCCCTTTAGG
181 GTTCCGATTT AGTGCTTTAC GGCACCTCGA CCCCCAAAAA CTTGATTAGG GTGATGGTTC
241 ACGTAGTGGG CCATCGCCCT GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTTGG AGTCCACGTT
301 CTTTAATAGT GGACTCTTGT TCCAAACTGG AACAACTCTC AACCCCTATCT CGGTCTATTC
361 TTTTGATTTA TAAGGGATTT TGCCGATTTT GGCTTATTGG TTAAAAAATG AGCTGATTTA
421 AAAAAAATTT AACGCGAATT TTAACAAAT ATTAACGTTT ACAATTTTCTG GTGGCACTTT
481 TCGGGGAAAT GTGCGCGGAA CCCCTATTTG TTTATTTTTT TAAATACATT CAAATATGTA
541 TCCGCTCATG AATTAATTCT TAGAAAACT CATCGAGCAT CAAATGAAC TGCAATTTAT
601 TCATATCAGG ATTATCAATA CCATATTTTT GAAAAAGCCG TTTCTGTAAAT GAAGGAGAAA
661 ACTCACCAGG GCAGTTCCAT AGGATGGCAA GATCCTGGTA TCGGTCTGCG ATTCGGACTC
721 GTCCAACATC AATACAACCT APTAATTTCC CCTCGTCAA AATAAGGTTA TCAAGTGAGA
781 AATCACCATG AGTGACGACT GAATCCGGTG AGAATGGCAA AAGTTTATGC ATTTCTTTCC
841 AGACTTGTTC AACAGGCCAG CCATACGCT CGTCAATCAA ATCACTCGCA TCAACCAAC
901 CATTATTCTT TCGTGATTGC GCCTGAGCGA GACGAAATAC GCGATCGCTG TTAAAAGGAC
961 AATTACAAAC AGGAATCGAA TGCAACCGGC GCAGGAACAC TGCCAGCGCA TCAACATAT
1021 TTTACCTGA ATCAGGATAT TCTCTAATA CCTGGAATGC TGTTTTCCCG GGGATCGCAG
1081 TGGTGAGTAA CCATGCATCA TCAAGAGTAC GGATAAAATG CTTGATGGTC GGAAGAGGCA
1141 TAAATTCGGT CAGCCAGTTT AGTCTGACCA TCTCATCTGT AACATCAATG GCAACGCTAC
1201 CTTTGCCATG TTTGAGAAAC AACTCTGGCG CATCGGGCTT CCCATACAAT CGATAGATTG
1261 TCGCACCTGA TTGCCGACA TTATCGCGAG CCCATTTATA CCCATATAAA TCAGCATCCA
1321 TGTTGGAATT TAATCGCGGC CTAGAGCAAG ACGTTTCCCG TTGAATATGG CTCATAACAC
1381 CCCTTGTATT ACTGTTTATG TAAGCAGACA GTTTTATGTT TCATGACCAA AATCCCTTAA
1441 CGTGAGTTTT CGTTCCACTG AGCGTCAGAC CCCGTAGAAA AGATCAAAGG ATCTTCTTGA
1501 GATCCTTTTT TTCTGCGCGT AATCTGCTGC TTGCAACAA AAAAAACCAC GCTACCAGCG
1561 GTGGTTTGTG TGCCGATCA AGAGCTACCA ACTCTTTTTC CGAAGGTAAC TGGCTTCAGC
1621 AGAGCGCAGA TACCAATATC TGTCCTTCTA GTGTAGCCGT AGTTAGGCCA CCACTTCAAG
1681 AACTCTGTAG CACCGCCTAC ATACCTCGCT CTGCTAATCC TGTACCAGT GGCTGCTGCC
1741 AGTGGCGATA AGTCGTGTCT TACCGGTTG GACTCAAGAC GATAGTTACC GGATAAGGCG
1801 CAGCGGTCGG GCTGAACGGG GGGTTCGTGC ACACAGCCCA GCTTGAGCGG AACGACCTAC
1861 ACCGAACTGA GATACCTACA GCGTGAGCTA TGAGAAAGCG CCACGCTTCC CGAAGGGAGA
1921 AAGCGGACA GGTATCCGGT AAGCGGCAGG GTCGGAACAG GAGAGCGCAC GAGGGAGCTT
1981 CCAGGGGAA ACGCCTGGTA TCTTTATAGT CCTGTGCGGT TCGCCACCT CTGACTTGAG
2041 CGTGATTTT TGTGATGCTC GTCAGGGGG CGGAGCCTAT GGAAAAACCG CAGCAACGCG
2101 GCGTTTTTAC GGTTCTTGGC CTTTTCCTGG CCTTTTCTC ACATGTTCTT TCCTGCGTTA
2161 TCCCTGATTT CTGTGATAA CCGTATTACC GCCTTTGAGT GAGCTGATAC CGCTCGCCCG
2221 AGCCGAACGA CCGAGCGCAG CGAGTCAGTG AGCGAGGAAG CGGAAGAGCG CCTGATGCGG
2281 TATTTTCTCC TTACGCATCT GTGCGGTATT TCACACCGCA TATATGGTGC ACTCTCAGTA
```

b

2341 CAATCTGCTC TGATGCCGCA TAGTTAAGCC AGTATACACT CCGCTATCGC TACGTGACTG
2401 GGTTCATGGCT GCGCCCCGAC ACCCGCCAAC ACCCGCTGAC GCGCCCTGAC GGGCTTGTCT
2461 GCTCCCGGCA TCCGCTTACA GACNAGCTGT GACCGTCTCC GGGAGCTGCA TGTGTCAAG
2521 GTTTTCACCG TCATCACCAG AACGCGCGAG GCAGCTCGCG TAAAGCTCAT CAGCGTGGTC
2581 GTGAAGCGAT TCACAGATGT CTGCGCTGTC ATCCGCGTCC AGCTCGTTGA GTTCTCCAG
2641 AAGCGTTAAT GTCTGGCTTC TGATAAAGCG GGCATGTTA AGGGCGGTTT TTTCTGTTT
2701 GGTCACTGAT GCCTCCGTGT AAGGGGATT TCTGTTTCATG GGGTAATGA TACCGATGAA
2761 ACCAGAGAGG ATGCTCACGA TACGGGTAC TGATGATGAA CATGCCCGGT TACTGGAACG
2821 TTGTGAGGGT AAACAACCTGG CGGTATGGAT GCGGCGGGAC CAGAGAAAAA TCACTCAGGG
2881 TCAATGCCAG CGCTTCGTTA ATACAGATGT AGGTGTTCCA CAGGGTAGCC AGCAGCATCC
2941 TCGATGCGAG ATCCGGAACA TAATGGTGCA GGGCGCTGAC TTCCGCGTTT CCAGACTTTA
3001 CGAAACACGG AAACCGAAGA CCATTCATGT TGTGCTCAG GTCGCAGACG TTTTGCGACA
3061 GCAGTCGCTT CACGTTGCTT CCGGTATCGG TGATTCATTC TGCTAACCAG TAAGGCAACC
3121 CCGCCAGCCT AGCCGGGTCC TCAACGACAG GAGCACGATC ATGCGCACCC GTGGGGCCGC
3181 CATGCCGGCG ATAATGGCCT GTTCTCGCC GAAACGTTG GTGGCGGGAC CAGTGACGAA
3241 GGCTTGAGCG AGGGCGTGCA AGATTCCGAA TACCGCAAGC GACAGGCCGA TCATCGTCCG
3301 GCTCCAGCGA AAGCGTCTCT CGCCGAAAAT GACCCAGAGC GCTGCCGGCA CCTGTCTTAC
3361 GAGTTGCATG ATAAAGAAGA CAGTCATAAG TGCGCGGACG ATAGTCATGC CCCGCGCCCA
3421 CCGGAAGGAG CTGACTGGGT TGAAGGCTCT CAAGGGCATC GGTGAGATC CCGGTGCCTA
3481 ATGAGTGAGC TAACCTACAT TAATTCGCTT GCGCTCACTG CCCGCTTTCC AGTCGGGAAA
3541 CCTGTCGTGC CAGCTGCATT AATGAATCGG CCAACGCGCG GGGAGAGGCG GTTTGCGTAT
3601 TGGCGGCCAG GGTGGTTTTT CTTTTCACCA GTGAGACGGG CAACAGCTGA TTGCCCTTCA
3661 CCGCCTGGCC CTGAGAGAGT TGCAGCAAGC GGTCCACGCT GGTTTGCCCC AGCAGGCGAA
3721 AATCCTGTTT GATGGTGGTT AACGGCGGGA TATAACATGA GCTGTCTTCG GTATCGTCTG
3781 ATCCCACTAC CGAGATATCC GCACCAACGC GCAGCCCGGA CTCGGTAATG GCGCGCATG
3841 CGCCAGCGC CATCTGATCG TTGGCAACCA GCATCGCAOT GGGAACGATG CCTTCATTCA
3901 GCATTTGCAT GTTTGTTGA AAACCGGACA TGGCACTCCA GTCGCCTTCC CGTTCGCTA
3961 TCGCTGAAT TTGATTGCGA GTGAGATATT TATGCCAGCC AGCCAGACGC AGACGCGCCG
4021 AGACAGAACT TAATGGGCCC GCTAACAGCG CGATTTGCTG GTGACCCAT GCGACCAGAT
4081 GCTCCACGCC CAGTCGCGTA CGTCTTCAT GGGAGAAAAT AATACTGTTG ATGGGTGTCT
4141 GGTCAAGAC ATCAAGAAAT AACGCCGGA CATTAGTGCA GGCAGCTTCC ACAGCAATGG
4201 CATCCTGGTC ATCCAGCGGA TAGTTAATGA TCAGCCCACT GACGCGTTGC GCGAGAAGAT
4261 TGTGCACCGC CGCTTTACAG GCTTCGACGC CGCTTCGTTT TACCATCGAC ACCACCACGC
4321 TGGACCCAG TTGATCGGCG CGAGATTTAA TCGCCGCGAC AATTTGCGAC GCGCGGTGCA
4381 GGGCCAGACT GGAGGTGCGA ACGCCAATCA GCAACGACTG TTTGCCCGCC AGTTGTTGTG
4441 CCACGCGGTT GGGAAATGTA TTCAGCTCCG CCATCGCCGC TTCCACTTTT TCCCGCGTTT
4501 TCGCAGAAAC GTGGCTGGCC TGGTTCACCA CGCGGGAAC GGTCTGATAA GAGACACCGG
4561 CATACTCTGC GACATCGTAT AACGTTACTG GTTTCACATT CACCACCCTG AATTGACTCT
4621 CTTCGGGCG CTATCATGCC ATACCGCGAA AGGTTTTGCG CCATTCGATG GTGTCCGGGA
4681 TCTCGACGCT CTCCCTTATG CGACTCCTGC ATTAGGAAGC AGCCCACTAG TAGGTTGAGG
4741 CCGTTGAGCA CCGCCGCCGC AAGGAATGGT GCATGCAAGG AGATGGCGCC CAACAGTCCC
4801 CCGGCCACGG GGCCTGCCAC CATACCCACG CCGAAACAAG CGCTCATGAG CCCGAAGTGG

69

4861 CGAGCCCGAT CTTCCCCATC GGTGATGTCG GCGATATAGG CGCCAGCAAC CGCACCTGTG
4921 GCGCCGGTGA TGCCGGCCAC GATGCGTCCG GCGTAGAGGA TCGAGATCTC GATCCCGCGA
4981 AATTAAATACG ACTCACTATA GGGGAATTGT GAGCGGATAA CAATTCCCTT CTAGACCACA
5041 CCTTAAGGAG GATATAACAT ATGGCTGCTG AACCAGTAGA AGACAATTGC ATCAACTTTG
5101 TGGCAATGAA ATTTATTGAC AATACGCTTT ACTTTATAGC TGAAGATGAT GAAAACCTGG
5161 AATCAGATTA CTTTGGCAAG CTTGAGAGCA AACTATCGGT CATTCGTART TTAAATGACC
5221 AGGTCCCTATT TATCGACCAA GGGAAATCGT CACTATTCTGA GGACATGACA GACAGTGACT
5281 GCCGAGACAA TGCGCCGCGA ACCATTTTCA TTATATCTAT GTACAAGGAT TCTCAGCCGC
5341 GCGGAATGGC CGTAACCTATT TCTGTCAAAT GTGAAAAGAT ATCCACGCTG TCGTGTGAGA
5401 ACAAGATTAT TAGTTTCAA GAGATGAATC CGCCGGATAA TATCAAGGAC ACQAAGTCTG
5461 ATATCATATT TTTCCAGCGC AGCGTGCCGG GGCACGATAA CAAGATGCAA TTGAATCAT
5521 CCAGCTATGA AGGGTACTTT CTTGCTGCG AGAAGGAACG CGATCTCTTT AAACCTTTTT
5581 TAAAGAAAGA GGACGAGCTA GGCGATCGCA GCATTATGTT CACTGTCCAA AATGAAGACT
5641 AGTGGAGGAT ATAATACCAG GAATAAATAA AATCCATGGG CCATCATCAT CATCATCATG
5701 GCATACTCAA ACTTTGTCTT CGTGAAGAAT TCCTGAGACT GTGTAAAAA AATCATGATG
5761 AGATCTATCC AATAAAAAAG AGAGAGGACC GCAGACGCCT GGCTCTCCTC ATATGCAATA
5821 CAAAGTTTGA TCACCTGCCT GCAAGGAATG GGGCTCACTA TGACATCGTG GGGATGAAAA
5881 GGCTGCTTCA AGGCCTGGGC TACACTGTGG TTGACGAAAA GAATCTCACA GCCAGGGATA
5941 TGGAGTCAGT GCTGAGGGCA TTTGCTGCCA GACCAGAGCA CAAGTCTCTT GACAGCACGT
6001 TCTTGGTACT CATGTCTCAT GGCATCCTAG AGGGAATCTG CGGAAGTGGG CATAAAAAGA
6061 AAAAACCGGA TGTGCTGCTT TATGACACCA TCTTCCAGAT ATTCAACAAC CCGAAGTGGC
6121 TCAGTCTAAA GGACAAACCC AAGGTCTATC TTGTCCAGGC CTGCAGAGGT GAAAAACATG
6181 GGGAACTCTG GGTCAAGAGC TCTCCAGCAT CCTTGGCAGT CATCTCTTCA CAGTCATCTG
6241 AGAACCTGGA GGCAGATTCT GTTTGCAAGA TCCACGAGGA GAAGGACTTC ATTGCTTTCT
6301 GTTCTTCAAC ACCACATAAC GTGTCTCTGA GAGACCGCAC AAGGGGCTCC ATCTTCATTA
6361 CGGAATCAT CACATGCTTC CAGAAATATT CTTGCTGCTG CCACCTAATG GAAATATTTT
6421 GGAAGGTACA GAAATCATTT GAAGTTCCAC AGGCTAAAGC CCAGATGCCC ACCATAGAAC
6481 GAGCAACCTT GACAAGAGAT TTCTACCTCT TTCTGGCAA TTGACTCGAG CACCACCACC
6541 ACCACCACTG AGATCCGGCT GCTAACAAAG CCCGAAAGGA AGCTGAGTTG GCTGCTGCCA
6601 CCGCTGAGCA ATAACCTAGCA TAAACCTTTG GGGCCTCTAA ACGGGTCTTG AGGGGTTTTT
6661 TGCTGAAAGG AGGAACTATA TCCGGBT

Figure 4

66

pET28proIL18casp5+pgl

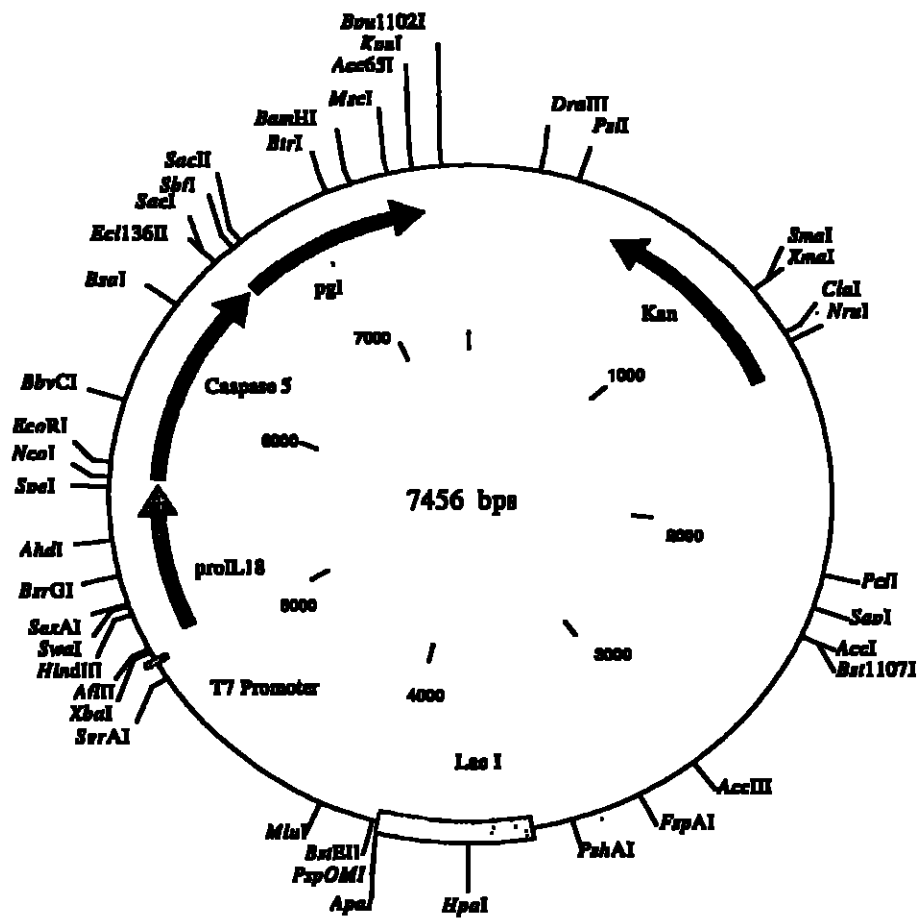


Figure 5

SEQ ID NO:14

DNA

pET28proIL18casp5+pgl

1 TGGCGAATGG GACGCGCCCT GTAGCGGCGC ATTAAGCGCG GCGGGTGTGG TGGTTACGCG
61 CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT AGCGCCGCTT CCTTTCGCTT TCTTCCCTTC
121 CTTTCTCGCC ACCTTCGCGG GCTTTCGCCG TCAAGCTCTA AATCGGGGGC TCCCTTTAGG
181 GTTCCGATTT AGTGCTTTAC GGCACCTCGA CCCCCAAAAA CTTGATTAGG GTGATGGTTC
241 ACCTAGTGGG CCATCGCCCT GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTTGG AGTCCACGTT
301 CTTTAATAGT GGAATCTTGT TCCAACTGG AACAACTC AACCCATATCT CGGTCTATTC
361 TTTTGATTTA TAAGGGATTT TGCCGATTTT GGCCTATTGG TTAATAAATG AGCTGATTTA
421 ACAAAAAATT AACGCGAATT TTAACAAAT ATTAACGTTT ACAATTTTCA GTGGCACTTT
481 TCGGGGAAAT GTGCGCGGAA CCCCTATTTG TTTATTTTTC TAAATACATT CAAATATGTA
541 TCCGCTCATG AATTAATTCT TAGAAAACT CATCGAGCAT CAAATGAAAC TGCAATTTAT
601 TCATATCAGG ATTATCAATA CCATATTTTT GAAAAAGCCG TTTCTGTAAT GAAGGAGAAA
661 ACTCACCGAG GCAGTTCCAT AGGATGGCAA GATCCTGGTA TCGGTCTGCG ATTCGACTC
721 GTCCAACATC AATACAACCT ATTAATTTCC CCTCGTCAA AATAAGGTTA TCAAGTGAGA
781 AATCACCATG AGTGACGACT GAATCCGGTG AGAATGGCAA AAGTTTATGC ATTTCTTTCC
841 AGACTTGTTC AACAGGCCAG CCATTACGCT CGTCATCAA ATCACTCGCA TCAACCAAC
901 CGTTATTTCAT TCGTGATTGC GCCTGAGCGA GACGAAATAC GCGATCGCTG TTAAGAGGAC
961 AATTACAAAC AGGAATCGAA TGCAACCGGC GCAGGAACAC TGCCAGCGCA TCAACAATAT
1021 TTTCACCTGA ATCAGGATAT TCTTCTAATA CCTGGAATGC TGTTFCTCCG GGGATCGCAG
1081 TGGTGAGTAA CCATGCATCA TCAGGAGTAC GGATAAAATG CTTGATGGTC GGAAGAGGCA
1141 TAAATTCGGT CAGCCAGTTT AGTCTGACCA TCTCATCTGT AACATCATTC GCAACGCTAC
1201 CTTTGCCATG TTTCAGAAAC AACTCTGGCG CATCGGGCTT CCCATACAAT CGATAGATTG
1261 TCGCACCTGA TTGCCCGACA TTATCGCGAG CCCATTTATA CCCATATAAA TCAGCATCCA
1321 TGTTCGGAAT TAATCGCGGC CTAGAGCAAG ACGTTTCCCG TTGAATATGG CTCATAACAC
1381 CCCTTGTATT ACTGTTTATG TAAGCAGACA GTTTTATTGT TCATGACCAA AATCCCTTAA
1441 CGTGAGTTTT CGTTCACCTG AGCGTCAGAC CCCGTAGAAA AGATCAAAGG ATCTTCTTGA
1501 GATCCTTTTT TTCTGCGCGT AATCTGCTGC TTGCAACAA AAAAACCACC GCTACCAGCG
1561 GTGGTTTGTG TGCCCGATCA AGAGCTACCA ACTCTTTTTC CGAAGGTAA TGGCTTCAGC
1621 AGAGCGCAGA TACCAAATAC TGTCTTCTTA GTGTAGCCGT AGTTAGGCCA CCACTTCAAG
1681 AACTCTGTAG CACCGCTTAC ATACCTCGCT CTGCTAATCC TGTTACCAGT GGTCTGCTCC
1741 AGTGGCGATA AGTCGTGTCT TACCGGGTTG GACTCAAGAC GATAGTTACC GGATAAGGCG
1801 CAGCGGTCGG GCTGAACGGG GGGTTCGTGC ACACAGCCCA GCTTGGAGCG AACGACCTAC
1861 ACCGAATGTA GATACCTACA GCGTGAGCTA TGAGAAAGCG CCACGCTTCC CGAAGGGAGA
1921 AAGGCGGACA GGTATCCGGT AAGCGGCAGG GTCGGAACAG GAGAGCGCAC GAGGGAGCTT
1981 CCAAGGGGAA ACGCTTGGTA TCTTTATAGT CCTGTGCGGT TTCGCCACCT CTGACTTGAG
2041 CGTCGATTTT TGTGATGCTC GTCAGGGGGG CGGAGCCTAT GGAAAAACGC CAGCAACGCG
2101 GCTTTTTTAC GGTTCCTGGC CTTTGTCTGG CCTTTTGTCT ACATGTTCTT TCCTGCGTTA
2161 TCCCCTGATT CTGTGATAA CCGTATTACC GCCTTTGAGT GAGCTGATAC CGCTCGCCGC
2221 AGCCGAACGA CCGAGCGCAG CGAGTCAGTG AGCGAGGAG CGGAAGAGCG CCTGATGCGG
2281 TATTTTCTCC TTACGCATCT GTGCGGTATT TCACACCGCA TATATGGTGC ACTCTCAGTA

40

2341 CAATCTGCTC TGATGCCGCA TAGTTAAGCC AGTATACACT CCGCTATCGC TACGTGACTG
2401 GGTCAATGGCT GCGCCCCGAC ACCCGCCAAC ACCCGCTGAC GCGCCCTGAC GGGCTTGTCT
2461 GCTCCCCGCA TCCGCTTACA GACAAGCTGT GACCGTCTCC GGGAGCTGCA TGTGTGAGAG
2521 GTTTTCACCG TCATCACCGA AACGCGCGAG GCAGCTGCGG TAAAGCTCAT CAGCGTGGTC
2581 GTGAAGCGAT TCACAGATGT CTGCCTGTTT ATCCGCGTCC AGCTCGTTGA GTTCTCCAG
2641 AAGCGTTAAT GTCTGGCTTC TGATAAAGCG GGCCATGTTA AGGGCGGTTT TTCTCTGTTT
2701 GGTCACTGAT GCCTCCGTGT AAGGGGATT TCTGTTTCATG GGGGTAATGA TACCGATGAA
2761 ACGAGAGAGG ATGCTCACGA TACGGGTAC TGATGATGAA CATGCCCGGT TACTGGAACG
2821 TTGTGAGGGT AAACAACCTGG CGGTATGGAT GCGCGCGGAC CAGAGAAAAA TCACTCAGGG
2881 TCAATGCCAG CGCTTCGTTA ATACAGATGT AGGTGTTCCA CAGGGTAGCC AGCAGCATCC
2941 TCGATGCGAG ATCCGGAACA TAATGGTGCA GGGCGCTGAC TTCCGCGTTT CCAGACTTTA
3001 CGAAACACGG AAACCGAAGA CCAATTCATGT TGTGTGTCAG GTCGCAGACG TTTTGCAGCA
3061 GCAGTCGCTT CACGTTGCTT CCGGTATCGG TGATTCAATC TGCTAACCAAG TAAGGCAACC
3121 CCGCCAGCCT AGCCGGGTCC TCAACGACAG GAGCACGATC ATGCGCACCC GTGGGGCCGC
3181 CATGCCGCG ATAAAGGCTT GCTTCTCGCC GAAACGTTTG GTGGCGGGAC CAGTGACGAA
3241 GCGTTGAGCG AGGGCGTGCA AGATTCCGAA TACCGCAAGC GACAGGCCGA TCATCGTGGC
3301 GCTCCAGCGA AAGCGGTCTT CGCCGAAAT GACCCAGAGC GCTGCCGGCA CCTGTCTTAC
3361 GAGTTGCATG ATAAAGAAGA CAGTCATAAG TGCGGCGAGC ATAGTCATGC CCCGCGCCCA
3421 CCGGAAGGAG CTGACTGGGT TGAAAGCTCT CAAGGGCATC GGTGAGATC CCGGTGCCTA
3481 ATGAGTGAGC TAACCTACAT TAATTGCTT GCGTCACTG CCCGCTTTC AGTCGGGAAA
3541 CCTGTGCTGC CAGCTGCATT AATGAATCG CCAACGCGCG GGGAGAGGCG GTTGTGCTAT
3601 TGGGCGCCAG GGTGCTTTT CTTTTCACCA GTGAGACGGG CAACAGCTGA TTGCCCTTCA
3661 CCGCTGGCC CTGAGAGAGT TGCAGCAAGC GGTCCACGCT GGTTTGCCCC AGCAGGCGAA
3721 AATCCTGTTT GATGGTGGTT AACGGCGGGA TATAACATGA GCTGTCTTCG GTATCGTCTG
3781 ATCCCACTAC CGAGATATCC GCACCAACGC GCAGCCCGGA CTCGGTAATG GCGCGCATTG
3841 CGCCAGCGC CATCTGATCG TTGGCAACCA GCATCGCAGT GGGAACGATG CCTTCATTCA
3901 GCAATTCAT GGTGTTGTTA AAACCGGACA TGGCACTCCA GTCGCTTCC CGTTCCGCTA
3961 TCGGCTGAAT TTGATTGCGA GTGAGATATT TATGCCAGCC AGCCAGACGC AGACGCGCCG
4021 AGACAGAACT TAATGGGCCC GCTAACAGCG CGATTGCTG GTGACCCAAT GCGACCAGAT
4081 GCTCCACGCC CAGTCGCGTA CCGTCTTCAT GGGAGAAAAT AATACTGTTG ATGGGTGTCT
4141 GGTCAAGAC ATCAAGAAAT AACGCCGGA CATTAGTGCA GGCAGCTTCC ACAGCAATGG
4201 CATCTGGTC ATCCAGCGGA TAGTTAATGA TCAGCCCACT GACGCGTTGC GCGAGAAGAT
4261 TGTGCACCGC CGCTTTACAG GCTTCGACGC CGCTTCGTTT TACCATCGAC ACCACCACGC
4321 TGGCACCCAG TTGATCGGCG CGAGATTAA TCGCCGCGAC AATTTGCGAC GGGCGTGCA
4381 GGGCCAGACT GGAGGTGGCA ACGCCAATCA GCAACGACTG TTTGCCCGCC AGTTGTTGTG
4441 CCACGCGGTT GGGAATGTAA TTCAGCTCCG CCATCGCCGC TTCCACTTTT TCCCGCGTTT
4501 TCGCAGAAAC GTGGCTGGCC TGGTTACCA CGCGGGAAC GGTCTGATAA GAGACACCGG
4561 CATACTCTGC GACATCGTAT AACGTTACTG GTTTCACATT CACCACCCTG AATGACTCT
4621 CTTCCGGCG CTATCATGCC ATACCGCGAA AGGTTTTGCG CCATTCGATG GTGTCCGGGA
4681 TCTCGACGCT CTCCCTTATG CCACTCTGCT ATTAGGAAGC AGCCCACTAG TAGGTTGAGG
4741 CCGTTGAGCA CCGCGCGCGC AAGGAATGCT GCATGCAAGG AGATGGCGCC CAACAGTCCC
4801 CCGGCCACGG GGCCTGCCAC CATACCACG CCGAAACAG CGCTCATGAG CCCGAAGTGG

27

4861 CGAGCCCCGAT CTTCCCCATC GGTGATGTCG GCGATATAGG CCCCAGCAAC CCGACCTGTG
4921 GCGCCGGTGA TGCCGGCCAC GATGCGTCCG GCGTAGAGGA TCGAGATCTC GATCCCGCGA
4981 AATTAATACG ACTCACTATA GGGGAATTGT GAGCGGATAA CAATTCCCCT CTAGACCACA
5041 CCTTAAGGAG GATATAACAT ATGGCTGCTG AACCAGTAGA AGACAATTGC ATCAACTTTG
5101 TGGCAATGAA ATTTATTGAC AATACGCTTT ACTTTATAGC TGAAGATGAT GAAAACCTGG
5161 AATCAGATTA CTTTGCCAAG CTTGAGAGCA AACTATCGGT CATTCGTAAT TTAAATGACC
5221 AGGTCCCTATT TATCGACCAA GGGAAATCGTC CACTATTCTGA GGACATGACA GACAGTGAAT
5281 GCCGAGACAA TGCGCCGCGA ACCATTTTCA TTATATCTAT GTACAAGGAT TCTCAGCCGC
5341 GCGGAATGCG CGTAACCTATT TCTGTCAAAT GTGAAAAGAT ATCCACGCTG TCGTGTGAGA
5401 ACAAGATTAT TAGTTTCAAA GAGATGAATC CGCCGGATAA TATCAAGGAC ACGAAGTCTG
5461 ATATCATATT TTTCCAGCGC AGCGTGCCCG GGCACGATAA CAAGATGCAA TTTGAATCAT
5521 CCAGCTATGA AGGGTACTTT CTTGCATGCG AGAAGGAACG CGATCTCTTT AACTTATTT
5581 TAAAGAAAGA GGACGAGCTA GCGGATCGCA GCATTATGTT CACTGTCCAA AATGAAGACT
5641 AGTGGAGGAT ATAATACCAG GAATAAATAA AATCCATGGG CCATCATCAT CATCATCATG
5701 GCATACTCAA ACTTTGTCTT CGTGAAGAAT TCCTGAGACT GTGTAAAAA AATCATGATG
5761 AGATCTATCC AATAAAAAAG AGAGAGGACC GCGAGCGCCT GGCTCTCATC ATATGCAATA
5821 CAAAGTTTGA TCACCTGCCCT GCAAGGAATG GGGCTCACTA TGACATCGTG GGGATGAAAA
5881 GGCTGCTTCA AGGCCTGGGC TACACTGTGG TTGACGAAAA GAATCTCACA GCCAGGGATA
5941 TGGAGTCAGT GCTGAGGGCA TTTGCTGCCA GACCAGAGCA CAAGTCCTCT GACAGCACGT
6001 TCTTGGTACT CATGTCTCAT GGCATCCTAG AGGGAATCTG CCGAACTGCG CATAAAAAGA
6061 AAAAACCGBA TGTGCTGCTT TATGACACCA TCTTCCAGAT ATTCAACAAC CGCAACTGCC
6121 TCAGTCTAAA GGACAAACCC AAGGTCAATC TTGTCCAGGC CTGCAGAGGT GAAAAACATG
6181 GGGAACTCTG GGTGAGAGAC TCTCCAGCAT CCTTGGCAGT CATCTCTTCA CAGTCATCTG
6241 AGAACCCTGA GGCAGATTCT GTTTGCAAGA TCCACGAGGA GAAGGACTTC APTGCTTTCT
6301 GTTCTTCAAC ACCACATAAC GTGTCTTGA GAGACCGCAC AAGGGGCTCC ATCTTCATTA
6361 CGGAATCAT CACATGCTTC CAGAAATATT CTTGCTGCTG CCACCTAATG GAAATATTTT
6421 GGAAGGTACA GAAATCATTT GAAGTTCCAC AGGCTAAGC CCAGATGCCC ACCATAGAAC
6481 GAGCAACCTT GACAAGAGAT TTCTACCTCT TTCTTGGCAA TTGACTCGAG CTCGGTGGCC
6541 CTGGTGGCCC GCGATGGGAG GAGTTGGTAT GCGGATTTCT GAGTTGAAGC TGCCGGCCGG
6601 CGTCGGCTG CAGGTCTGGG GCAGCGCCGC CGAGCAGGCC CGCGGCTGG CCGCCGAGGT
6661 CGCCGGCCCG TTGCGCTCGG CGCTGGCCGA GCAGGGCCAG GCGCTGCTGG TGGTGTCCGG
6721 TGGGCGCAGT CCGGTGGCCT TCCTCGAAGC CTTGAGCGAG GAGCCGCTGG ACTGGTCCGG
6781 GATCACAGTC AGCCTGGCCG ACGAGCGCTG GGTGCCGGAG TCGCATGCCG ATAGCAACGC
6841 CGGCCTGGTT CGCCGCCACC TGCTCCGTGG CGAGGCGGCG AAGGCGGCT TCATCGGCCT
6901 CTACCAGCCG GCGCGGAGCC TGGAGGAAGC GGCCGAGCTG GCCGACCATC ACCTGCACGA
6961 GCTGCCATG CCGATCGACG TGCTGGTCTT CCGCATGGGC GACGACGGCC ATACCGCCTC
7021 GCTGTTCCCG AACAGCCCTG GCCTGGACCT GCGGATGGAT CCCAGGGGA CGCGCGTTG
7081 CCTGCCGATG TGGGCGCCGA GCGTGCCGCA CCAGCGCCTG ACCCTGCCGC GCGCCGTGCT
7141 GCGGCGGCG AAGGTGCAGC TGCTGGCGAT CCAGGGCCAG TCCAAGCTGG CCACCTGAA
7201 CGCCGCGCTG GCGGTGAGG ACGAACGGCG GATGCCGCTT CGCGCCTTCC TCCGCGCGCC
7261 GCTGACGATC CATTGGTACC CCTGAGTGGC GGACTCGAGC ACCACCACCA CCACCACTGA
7321 GATCCGGCTG CTAACAAAGC CCGAAAGGAA GCTGAGTTGG CTGCTGCCAC CGCTGAGCAA



7381 TAACTAGCAT AACCCCTTGG GGCCTCTAAA CGGCTCTTGA GGGGTTTTTT GCTGAAAGGA
7441 GGA ACTATAT CCGG

Figure 6



SEQ ID NO:7

DNA

Pseudomonas aeruginosa PGL

ATG GGA GGA GTT GGT ATG GCG ATT TCT GAG TTG AAG CTG CCG GCC GGC
GTC GGC CTG CAG GTC TGG GGC AGC GCC GAG CAG GCC CGC GGC CTG
GCC GCC GAG GTC GCC GGC CGG TTG CGC TCG GCG CTG GCC GAG CAG GGC
CAG GCG CTG CTG GTG GTG TCC GGT GGG CGC AGT CCG GTG GCC TTC CTC
GAA GCC TTG AGC GAG GAG CCG CTG GAC TGG TCG CCG ATC ACC GTC AGC
CTG GCC GAC GAG CGC TGG GTG CCG GAG TCG CAT GCC GAT AGC AAC GCC
GGC CTG GTT CGC CGC CAC CTG CTC CGT GGC GAG GCG GCG AAG GCG CGC
TTC ATC GGC CTC TAC CAG CCG GCG GCG AGC CTG GAG GAA GCG GCC GAG
CTG GCC GAC CAT CAC CTG CAC GAG CTG CCA TTG CCG ATC GAC GTG CTG
GTC CTC GGC ATG GGC GAC GAC GGC CAT ACC GCC TCG CTG TTC CCG AAC
AGC CCT GGC CTG GAC CTG GCG ATG GAT CCC CAG GGG ACG CGC CGT TGC
CTG CCG ATG TGG GCG CCG AGC GTG CCG CAC CAG CGC CTG ACC CTG CCG
CGC GCC GTG CTG GCG GCG GCG AAG GTG CAG CTG CTG GCG ATC CAG GGC
CAG TCC AAG CTG GCC ACC CTG AAC GCC GCG CTG GCG GTC GAG GAC GAA
CGG CGG ATG CCG GTT CGC GCC TTC CTC CGC GCG CCG CTG ACG ATC CAT
TGG TAC CCC TGA

Figure 7

SEQ ID NO:8
amino acid
Pseudomonas aeruginosa PGL

MGGVGMATSEKLPAAGVGLQVWGSAAEQARGLAEEVAGRLRSALAEQQQALLVVSQGRSPVAFLEA
LSREPLDWERITVSLADERMVPRSHADSNAGLVRRHTLRGEAAKARFIGLYQPAASLEAAELADH
HLHELPLPIDVLVLGMGDDGHTASLFPNSPGLDLANDPQGTTRCLPMQAPSVPHQRLTLPRAVLAA
AKVQLLAIQQQSKLATLKAALAVEDEREMFVRAFLRAPLTIHWYP

Figure 8

7528

SEQUENCE LISTING

<110> GARDNER, Alan R.
SWETZER, Thomas D.
TAYLOR, Alexander H.
PATEL, Prematesh

<120> METHODS FOR PREVENTING GLYCONOYLATION OF
PROTEINS

<130> PU60116

<140> To Be Assigned

<141> 2004-03-04

<150> 60/451,686

<151> 2003-03-04

<160> 14

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> ESCHERICHIA COLI

<400> 1

agctggccat tgctcaggtc gaag

24

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> ESCHERICHIA COLI

<400> 2

gtactgtccg gaatacacga cgatg

25

<210> 3

76 ~~76~~

<211> 413

<212> DNA

<213> ESCHERICHIA COLI

<400> 3

agctggccat tgctcaggtc gaagagatgc aggcagtttc tgcctgctt aagggcaaat 60
acaccatgac cggatgaagcc ttcatccgg ttgaggtgga tatgggccgc agtgaggaga 120
ataacatcac gcagtcgggc ggcacggagt ggagcaagcg tgacaagtc acgtatgacc 180
cgaccgacga tatcgaagcc tacgcgctga acgccagcgt tgtggtgaat atcatcgtgt 240
tcgatccgaa aggcctgggc ctgttccgtt ccttcaagc cgtcaaggag aagctggata 300
cccgctgtgg ctctaattcc gagctggaga cagcgggtga agacctgggc aaagcgggtgt 360
cctataaggg gatgtatggc gatgtggcca tcgtcgtgta ttccggacag tac 413

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 4

Asn Ile Gln Ser Val Lys Val Lys

1

5

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 5

ggcctcgagc tcggtggccc tgggtggccc

29

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 6

ggcctcgagt ccgccactca ggggtaccua t

31

<210> 7

<211> 732

<212> DNA

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 7

```

atgggaggag ttggtatggc gatttctgag ttgaagctgc cggccggcgt cggcctgcag 60
gtctggggca gcgcgcgca gcaggccgc gccttggccg ccgaggtcgc cggccggttg 120
cgctcggcgc. tggccgagca gggccaggcg ctgctggttg tgtccggttg gcgcagtccg 180
gtggccttcc tcgaagcctt gagcgaggag ccgctggact ggtcgcggat caccgtcagc 240
ctggccgacg agcgttgggt gccggagtcg catgccgata gcaacgccgg cctggttcgc 300
cgccacctgc tccgtggcga ggcggcgaag gcgcgcttca tcggcctcta ccagccggcg 360
gcgagcctgg aggaagcggc cgagctggcc gaccatcacc tgcacgagct gccattgccg 420
atcgacgtgc tggtcctcgg catggggcag gacggccata ccgcctcgtt gttcccgaac 480
agccctggcc tggacctgyc gatggatccc caggggacgc gccgttgctt gccgatgttg 540
gcgcgagcgc tgcgcacca gcgcctgacc ctgcgcgcgc ccgtgctgyc ggcggcgaag 600
gtgcagctgc tggcgatcca gggccagtc aagctggcca ccctgaacgc cgcgctggcg 660
gtcgaggacy aacggcggtt gccggttcgc gccttcctcc gcgcgccgct gacgatccat 720
tggtaccctt ga 732

```

<210> 8

<211> 243

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 8

```

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

```

115	120	125
Leu Ala Asp His His Leu His Glu Leu Pro Leu Pro Ile Asp Val Leu		
130	135	140
Val Leu Gly Met Gly Asp Asp Gly His Thr Ala Ser Leu Phe Pro Asn		
145	150	155
Ser Pro Gly Leu Asp Leu Ala Met Asp Pro Gln Gly Thr Arg Arg Cys		
165	170	175
Leu Pro Met Trp Ala Pro Ser Val Pro His Gln Arg Leu Thr Leu Pro		
180	185	190
Arg Ala Val Leu Ala Ala Ala Lys Val Gln Leu Leu Ala Ile Gln Gly		
195	200	205
Gln Ser Lys Leu Ala Thr Leu Asn Ala Ala Leu Ala Val Glu Asp Glu		
210	215	220
Arg Arg Met Pro Val Arg Ala Phe Leu Arg Ala Pro Leu Thr Ile His		
225	230	235
Trp Tyr Pro		

<210> 9

<211> 3416

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Comprised of PECO-1 Expression & Pseudomonas aeruginosa

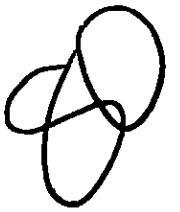
<400> 9

```

gaattccgga tgagcattca tcagggcgcc aagaatgtga ataaaggccg gataaaactt 60
gtgcttattt ttctttacgg tctttaaaaa ggccgtaata tccagctgaa cggctctgggt 120
ataggtacat tgagcaactg actgaatgac ctcaaatgtt tctttacgat gccattggga 180
tatatcaacg gtggtatata cagtgatttt tttctccatt ttagcttctt tagctcctga 240
aatctcgat aactcaaaa atacgcccgg tagtgatctt atttcattat ggtgaagtt 300
ggaacctctt acgtgccgat caacgtctca ttttcgccaa aagttggccc agggcttccc 360
ggtatcaaca gggacaccag gatttattta ttctgcgaag tgatcttccg tcacagggtat 420
ttattcggcg caaagtgcgt cgggtgatgc tgccaactta ctgatttagt gtatgatggt 480
gtttttgagg tgctccagtg gcttctgttt ctatcagctg tccctcctgt tcagctactg 540
acgggtggtt gcgtaacggc aaaagcacgg ccggacatca gcgctagcgg agtgataact 600
ggcttactat gttggcactg atgaggggtgt cagtgaagtg cttcatgttg caggagaaaa 660
aaggctgcac cggtgcgta gcagaatatg tgatacagga tatattccgc ttctcgtctc 720
actgactcgc tacgctcggc cgttcgactg cggcgagcgg aatggctta cgaacggggc 780
ggagatttcc tggagatgc caggaagata cttaacaggg aagtgagagg gccgcggcaa 840
agccgttttt ccataggctc cgccccctg acaagcatca cgaatctga cgtcaaatc 900

```

agtgggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggccggctccc 960
tcgtgcgctc tcctgttccct gccttttcgggt ttaccgggtgt cattccgctg ttatggccgc 1020
gtttgtctca ttccacgcct gacactcagt tccgggtagg cagttcgctc caagctggac 1080
tgtatgcacg aaccccccggt tcagtcgcac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt 1140
gagtcacaacc cggaaagaca tgcaaaagca ccactggcag cagccactgg taattgattt 1200
agaggagtta gtcttgaagt catgcgcggg ttaaggctaa actgaaagga caagttttgg 1260
tgactgcgct cctccaagcc agttacctcg gttcaagag ttggtagctc agagaacctt 1320
cgaaaaacccg ccctgcaagg cggtttttttc gttttcagag caagagatta cgcgcagacc 1380
aaaacgatct caagaagatc atcttattaa tcagataaaa tatttctaga tttcagtgc 1440
atttatctct tcaantgtag caactgaagt cagccccata cgatataagt tgtaattctc 1500
atgtttgaca gcttatcctc gataagcttt aatgcggtag tttatcacag ttaaattgct 1560
aacgtagtcg ggcaccgtgt catatggatc ccgggtaccg tcgagctcga gctcggtggc 1620
cctgggtggcc cgcgatggga ggagttggta tggcgatttc tgagttgaag ctgccgggccg 1680
gcgtcggcct gcaggtctgg ggcagcgccg ccgagcaggc ccgcccctg gccgcccagg 1740
tcgcggcccg gttgcgctcg gcgctggccg agcagggcca ggcgctgctg gtggtgtccg 1800
gtgggcgcag tcgggtggcc ttccctgaag ccttgagcga ggagccgctg gactggtcgc 1860
ggatcacctg cagcctggcc gacgagcgct gggcgccgga gtcgcctgcc gatagcaacg 1920
ccggcctggt tcgcgcacac ctgctccgtg gcgaggcgcc gaaggcgccg ttcctcggcc 1980
tctaccagcc ggcggcgagc ctggagggaag cggccgagct ggccgacctat cactgcacg 2040
agctgccatt gccgatcgac gtgctggtcc tcggcatggg cgacgacggc cataccgct 2100
cgctgttccc gaacagccct ggcctggacc tggcgatgga tccccagggg acgcgccgtt 2160
gcctgcgat gtgggcgcgg agcgtgcgc accagcgctt gacctgcgc cgcgccgtgc 2220
tggcgccggc gaaggtgcag ctgctggcga tccagggcca gtccaagctg gccaccctga 2280
acgcgcgctt ggcggctcag gacgaacggc ggtatccggt tcgcgccttc ctccgcgcgc 2340
cgctgacgat ccattggtac ccctgagtg ggcactcgac tagtcaacgc catgagcgcc 2400
ctcattttct attctgagtt acaacagtc gcaccgctgt ccggtagctc ctccgggtgg 2460
gcgcggggca tgactatgt cgcgcactt atgactgtct tctttatct gcaactcgt 2520
ggacaggtgc cggcagcgcc caacagtcct ccggccaagg ggcctgccac catacccacg 2580
ccgaacaag cgcctgcac cattatgttc cggatctgca tcgcaggatg ctgctggcta 2640
ccctgtggaa cactacatc tgtattaacg aagcgctaac cgtttttatc aggcctctggg 2700
aggcagaata aatgatcata tcgtcaatta ttacctcac ggggagagcc tgagcaaaact 2760
ggcctcaggc atttgagaag cacacggtca cactgcttcc ggtagtcaat aaaccggtaa 2820
accagcaata gacataagcg gctatttaac gacctgcgc tgaaccgacg accgggtcga 2880
atttgcttcc gaatttctgc cattcatccg cttattatca cttattcagg cgtagcacca 2940
ggcgtttaag ggcaccaata actgccttaa aaaaattacg ccccgccctg ccactcatcg 3000
cagtactgtt gtaattcatt aagcattctg ccgacatgga agccatcaca gacggcatga 3060
tgaacctgaa tcgccagcgg catcagcacc ttgtgcctt gcgtataata tttgccctg 3120
gtgaaaacgg gggcgagaa gttgtccata ttggccacgt ttaaatcaa actggtgaa 3180
ctcaccaggg gattggctga gacgaaaaac atattctcaa taaacctttt agggaaatag 3240
gccaggtttt caccgtaaca cgcacatct tcggaatata tgtgtagaaa ctgccggaaa 3300



togtctgggt attcactcca gagcgatgaa aacgttttcag ttgctcatg gaaaacgggtg 3360
 taacaagggt gaacactatc ccatatcacc agtcacccgt ctttcattgc catatg 3416

<210> 10

<211> 157

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 10

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

<210> 11

<211> 582

<212> DNA

<213> HOMO SAPIENS

<400> 11

atggctgctg aaccagtaga agacaattgc atcaactttg tggcaatgaa atttattgac 60
 aatacgcttt actttatagc tgaagatgat gaaaacctgg aatcagatta ctttggcaag 120
 cttgagagca aactatcggg cattcgtaat ttaaatgacc aggtcctatt tatcgaccaa 180

```

gggaatcgtc cactattcga ggacatgaca gacagtgaact gccgagacaa tgcgcgcgca 240
accattttca ttatatctat gtacaaggat tctcagccgc gccgaatggc cgttaactatt 300
tctgtcaaat gtgaaaagat atccacgctg tctgttgaga acaagattat tagtttcaaa 360
gagatgaatc cgcgggataa tatcaaggac acgaagtctg atatcatatt tttccagcgc 420
agcgtgcggg ggcacgataa caagatgcaa tttgaatcat ccagctatga agggtaacttt 480
cttgcacgcg agaaggaaacg cgatctcttt aaacttattt taaagaaaga ggacgagcta 540
ggcgatcgca gcattatgtt cactgtocaa aatgaagact ag 582

```

<210> 12

<211> 849

<212> DNA

<213> HOMO SAPIENS

<400> 12

```

atggggccatc atcatcatca tcatggcata ctcaaaacttt gtctctgtga agaattcctg 60
agactgtgta aaaaaaatca tgatgagatc tatccaataa aaaagagaga ggaccgcaga 120
cgcttggtc tcatcatatg caatacaaaag tttgatcacc tgcctgcaag gaatggggct 180
cactatgaca tctgtgggat gaaaaggctg cttcaaggcc tgggctacac tgtggttgac 240
gaaaagaatc tcacagccag ggtataggag tcagtgtctga gggcatttgc tgccagacca 300
gagcacaagt cctctgacag caggttcttg gtactcatgt ctcatggcat cctagaggga 360
atctgcggaa ctgcgcataa aaagaaaaaa ccggtgtgct tgctttatga caccatcttc 420
cagatattca acaaccgcaa ctgcctcagt ctaaaaggaca aacccaaggc catcattgtc 480
caggcctgca gaggtgaaaa acatggggaa ctctgggtca gagactctcc agcatccttg 540
gcagtcatct cttcacagtc atctgagaac ctggaggcag attctgtttg caagatccac 600
gaggagaagg acttcattgc tttctgttct tcaacaccac ataactgtgc ctggagagac 660
cgcaaaaggg gctccatctt cattacggaa ctcatcacat gcttcagaa atattcttgc 720
tgctgccacc taatggaat atttcggag gtacagaaat catttgaagt tccacaggct 780
aaagcccaga tgcccaccat agaacgagca accttgacaa gagatttcta cctctttcct 840
ggcaattga 849

```

<210> 13

<211> 6687

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Comprised of pET Vector and Homo Sapien

<400> 13

```

tggcgaatgg gacgcgccct gtacgggcgc attaagcgcg ggggtgtggt tggttacggc 60
cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcccgct cctttcgctt tcttcccttc 120
ctttctcgcc acgttgcgcg gctttccccc tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg 180

```

gttccgatttt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatgggtc 240
acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt 300
ctttaatagt ggactccttg tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggctctattc 360
ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctatttg ttaaaaaatg agctgattta 420
acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt 480
tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taatatcatt caaatatgta 540
tcgcgtcatg aattaattct tagaaaaact catcgagcat caaatgaac tgcaatttat 600
tcatatcagg attatcaata ccatattttt gaaaaagcgg tttctgtaat gaaggagaaa 660
actcacogag gcagttccat aggatggcaa gatcctggta tcgggtctgg attccgactc 720
gtccaacatc aatacaacct attaatttcc cctcgtcaaa aataaggtta tcaagtgaga 780
aatcaccatg agtgacgact gaatccgggt agaatggcaa aagtttatgc atttctttcc 840
agacttggtc aacaggccag ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgca tcaaccaaac 900
cgttattcat tcgtgattgc gcctgagcga gacgaatac gcgatcgtg ttaaaaggac 960
aattacaaac aggaatcgaa tgcaaccggc gcaggaaacac tgccagcgca tcaacaatat 1020
tttcacctga atcaggatat tcttctaata cctggaatgc tgttttcccg gggatcgag 1080
tggtgagtaa ccatgcatca tcaggagtac ggataaatg cttgatggtc ggaaggaggca 1140
taaattccgt cagccagttt agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac 1200
ctttgccatg tttcagaaac aactctggcg catcgggctt cccatacaat cgatagattg 1260
tcgcacctga ttgcccga tlatcgcgag cccatttata cccatataaa tcagcatcca 1320
tgttggaaat taatcgcggc ctagagcaag acgtttcccg ttgaatatgg ctcataacac 1380
cccttgattt actgtttatg taagcagaca gttttattgt tcatgaccaa aatcccttaa 1440
cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga 1500
gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaaaaa aaaaaccacc gctaccagcg 1560
gtggtttggt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc 1620
agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag 1680
aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaatac tgttaccagt ggctgctgcc 1740
agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 1800
cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac 1860
accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaagcgg ccacgcttcc cgaagggaga 1920
aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt 1980
ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag 2040
cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg 2100
gcctttttac ggttccctgg cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta 2160
tccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc 2220
agccgaacga ccgagcgag cgagtcagt agcaggaag cggagagcg cctgatgcgg 2280
tattttctcc ttacgcatct gtgcgggtatt tcacaccgca tatatgggtc actctcagta 2340
caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agtatacact ccgctatcgc tacgtgactg 2400
ggtcatggct gcgccccgac acccgccaac acccgctgac gcgcccctgac gggcttgctc 2460
gctccgggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 2520
gttttcaccg tcatcacga aacgcgcgag gcagctgcgg taaagctcat cagcgtggtc 2580



gtgaagcgat tcacagatgt ctgcctgttc atccgcgtcc agctcgttga gtttctccag 2640
aagcgttaat gtctggcttc tgataaagcg ggcacatgta agggcgggtt tttcctgttt 2700
ggtcactgat gcctccgtgt aagggggatt tctgttcatt ggggtaatga taccgatgan 2760
acgagagagg atgctcacga tacgggttac tgatgatgan catgcccggt tactgganag 2820
ttgtgagggg aaacaactgg cggatatgat gggcggggac cagagaaaaa tcaactcagg 2880
tcaatgccag cgcttcgtta atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc 2940
tgogatgcag atccggaaaca taatgggtgca gggcgtgac ttccgogttt ccagacttta 3000
cgaaacacgg aaacogaaga ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg ttttgacgca 3060
gcagtcgctt caggttcgct cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc 3120
ccgcagccct agccgggtcc tcaacgacag gagcacgac atgcgcaccc gtggggccgc 3180
catgccggcg ataattggct gcttctcggc gaacagtttg gtggcgggac cagtgcgaa 3240
ggcttgagcg agggcgtgca agattccgaa taccgcaagc gacagggcga tcatcgtcgc 3300
gtccacgcga aagcggctct cgcgaaaaat gacccagagc gctgcgggca cctgtcctac 3360
gagttgcatt ataaagaaga cagtcataag tgcggcgacg atagtcattc ccgcgcacca 3420
ccggaaggag ctgactgggt tgaaggctct caaggcgatc ggtcgagatc ccggtgccta 3480
atgagtgagc taacttacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 3540
cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgat 3600
tgggcgccag ggtggttttt cttttcacca gtgagacggg caacagctga ttgcccttca 3660
ccgcctggcc ctgagagagt tgcagcaagc ggtccacgct ggtttgcccc agcagggcga 3720
aatcctgttt gatggtggtt aacggcggga tataacatga gctgtcttcg gtatcgtcgt 3780
atcccactac cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccgga ctcggtaant gcgcgcattg 3840
cgccacgcgc catctgatcg ttggcaacca gcacgcagc gggaaacgat ccttcattca 3900
gcatttgcat ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca gtgccttcc cgttcgccta 3960
tcggctgaat ttgattgcga gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacgcgcgc 4020
agacagaact taatggggcc gctaacagcg cgtttgtctg gtgacccaat gcgaccagat 4080
gtccacgcgc cagtcgcgta ccgtcttcct gggagaaaaa aatactgttg atgggtgtct 4140
ggtcagagac atcaagaana aacgcgggaa cattagtga ggcagcttcc acagcaatgg 4200
catcctggtc atccagcgga tagttaatga tcagcccaat gacgcgttgc gcgagaagat 4260
tgtgcacgcg cgctttacag gcttcgacgc cgcttcgttc taccatcgac accaccacgc 4320
tggaacccag ttgatcggcg cgagatttaa tcgcgcgcac aatttgcgac ggcgcgtgca 4380
gggcagact ggaggtggca acgccaatca gcaacgactg tttgcccgcc agttgttgtg 4440
ccacgcggtt gggaaatgta ttcagctccg ccacgcgcgc ttccactttt tcccgcgttt 4500
tcgcagaaac gtggtcggcc tggttcacca cgcgggaaac ggtctgataa gagacaccgg 4560
catactctgc gacatcgtat aacgttactg gtttcacatt caccaccctg aattgactct 4620
cttcggggcg ctatcatgcc ataccgcgaa aggttttgcg ccattcgatg gtgtccggga 4680
tctcgacgct ctcccttatg cgaactcctg attaggaagc agccagtag taggttgagg 4740
ccgttgagca ccgcgcgcgc aaggaaatgg gcacgcaagg agatggcgcc caacagtcac 4800
ccggccacgg ggctgcacac catacccaag ccgaacaag cgtcatgag ccgaagtg 4860
cgagcccgat ctcccccac ggtgatgtcg gcgatatagg cgcagcaac cgcacctgtg 4920
ggcgcggtga tgccggccac gatgcgtcgg gcgtagaggc tcgagatctc gatcccgca 4980

```

aattaatagc actcactata ggggaattgt gagcggataa caattcccct ctagaccaca 5040
ccttaaggag gatataacat atggctgctg aaccagtaga agacaattgc atcaactttg 5100
tggcaatgaa atttattgac aatacgtttt actttatagc tgaagatgat gaaaacctgg 5160
aatcagatta ctttggcaag cttgagagca aactatcggc cattcgtaat ttaaatgacc 5220
aggtcctatt tatcgaccaa gggaaatcgt cactattcga ggacatgaca gacagtgaat 5280
gccgagacaa tgcgcgcgca accattttca ttatatctat gtacaaggat tctcagccgc 5340
ggggaatggc cgtaactatt tctgtcaaat gtgaaaagat atccacgctg tctgtgtgaga 5400
acaagattat tagtttcaaa gagatgaatc cgccggataa tatcaaggac acgaagtctg 5460
atatcatatt ttccagcgc agcgtgccgg ggcacgataa caagatgcaa tttgaatcat 5520
ccagctatga agggtaacttt cttgcatgag agaaggaaac cgatctcttt aaacttattt 5580
taaagaaaga ggacgagcta ggcgatcgca gcattatgtt cactgtccaa aatgaagact 5640
agtggaggat ataataccag gaataaataa aatccatggg ccatcatcat catcatcatg 5700
gcatactcaa actttgtcct cgtgaagaat tctgagact gtgtaaaaa aatcatgatg 5760
agatctatcc aataaaaaag agagaggacc gcagacgcct ggctctcatc atatgcaata 5820
caaagtttga tcacctgcct gcaaggaaat gggctcacta tgacatcgtg gggatgaaa 5880
ggctgcttca aggcctgggc taaactgttg ttgacgaaa gaatctcaca gccagggata 5940
tggagtcagt gctgagggca tttgctgcca gaccagagca caagtcctct gacagcaagt 6000
tcttggtagt catgtctcat ggcactctag agggaaatct cggaactgag cataaaaaa 6060
aaaaaccgga tgtgctgctt tatgacacca tcttcagat attcaacaac cgcaactgcc 6120
tcagtctaaa ggacaaacct aaggtcatca ttgtccaggc ctgcagaggt gaaaacatg 6180
gggaactctg ggtcagagac tctccagcat ccttggcagt catctcttca cagtcatctg 6240
agaacctgga ggcagattct gtttgcaaga tccacgagga gaaggacttc attgctttct 6300
gttcttcaac accacataac gtgtcctgga gagaccgac aaggggctcc atcttcatta 6360
cggaactcat cacatgcttc cagaatattt cttgctgctg ccacctaatt gaatatattt 6420
ggaaggtaga gaaatcattt gaagttccac aggtctaaag ccagatgccc accatagaac 6480
gagcaacctt gacaagagat ttctacctct ttctggcaa ttgactcgag caccaccacc 6540
accaccactg agatccggct gctaaanaag ccggaaggga agctgagttg gctgctgcca 6600
ccgctgagca ataactagca taacctctg gggcctctaa acgggtcttg aggggttttt 6660
tgctgaaagg aggaactata tccggt 6687

```

<210> 14

<211> 7454

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<214> Comprised of pET Vector & Homo Sapien, Pseudomonas Aeruginosa

<400> 14

```

tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcggtgtgg tggttacgcg 60
cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcgcgct cctttcgtt tottcccttc 120
ctttctcgcc acgttcgccc gctttccccc tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg 180

```

gttccgatttt agtgcttttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatgggttc 240
 acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt 300
 ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaaactc aacctatct cggctctattc 360
 ttttgattta taagggtatt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta 420
 acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt 480
 tcgggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taantacatt caaatatgta 540
 tcgcctcatg aattaattct tagaaaaact catcgagcat caaatgaac tgcaatttat 600
 tcatatcagg attatcaata ccatattttt gaaaaagcgg tttctgtaat gaaggagaaa 660
 actcaccgag gcagttccat aggatggcaa gatcctggta tcggtctggc attccgactc 720
 gtccaacatc aatacaacct attaatctcc cctcgtcama aataagggtta tcaagtga 780
 aatcaccatg agtgacgact gaatccgggtg agaatggcaa aagtttatgc atttctttcc 840
 agacttggtc aacaggccag ccattacgct cgtcatcama atcactcgca tcaaccaaac 900
 cgttatcatc tcgtgattgc gcctgagcga gacgaatat gcgactcgctg ttaaaaggaa 960
 aattacaac aggaatcgaa tgcaaccggc gcaggaaacac tgccagcgca tcaacaatat 1020
 tttcacctga atcaggatat tcttctaata cctggaaatgc tgttttcccg gggatcgag 1080
 tggtagtaaa ccatgcatca tcaggagtac ggataaaatg cttgatggtc ggaagaggca 1140
 taatttcgtc cagccagttt agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac 1200
 ctttgccatg tttcagaac aactctggcg catcgggctt cccatacaat cgatagattg 1260
 tcgcacctga ttgcccgaca ttatcgcgag cccattttata cccatataaa tcagcatcca 1320
 tgttggaatt taatcgccgc ctagagcaag acgtttcccg ttgaatatgg ctcataaac 1380
 cccttgattt actgtttatg taagcagaca gttttattgt tcattgaccaa aatcccttaa 1440
 cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga 1500
 gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaaaca aaaaaccacc gctaccagcg 1560
 gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc 1620
 agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag 1680
 aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaatec tgttaccagt ggctgctgcc 1740
 agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 1800
 cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac 1860
 accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga 1920
 aaggcggaca ggtatccggg aagcggcagg gtccgaaacg gagagcgac gaggagcctt 1980
 ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtgggtt ttccgccact ctgacttgag 2040
 cgtcgatttt tgtgatgtc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg 2100
 gcctttttac ggttcctggc ctttttctgg ccttttggct acatgttctt tcttgcgtta 2160
 tcccttgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc 2220
 agccgaacga ccgagcgag cgagtcagtg agcgaggaa cgggaagagcg cctgatggcg 2280
 tattttctcc ttacgcactt gtgcggtatt tcacaccgca tatatgggtc actctcagta 2340
 caatctgtc tgatgcgcga tagttaagcc agtataact ccgtatcgc tacgtgactg 2400
 ggtcatggct gcgcccgac acccgccaa acccgctgac ggcacctgac gggcttgtct 2460
 gctcccgga tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 2520
 gttttcacccg tcatcaccca aacgcgcgag gcagctggcg taaagctcat cagcgtggtc 2580



gtgaagcgat tcacagatgt ctgcctgttc atccgcgtcc agctcgttga gtttctccag 2640
aagcgtaant gtctggcttc tgataaagcg ggccatgtta agggcggttt tttcctgttt 2700
ggtcactgat gcctccgtgt aagggggatt tctgttcatt ggggtaatga taccgatgaa 2760
acgagagagg atgctcacga tacgggttac tgatgatgaa catgcccggt tactggaaacg 2820
ttgtgagggc aaacaactgg cggtatggat gggcggggac cagagaaaaa tcaactcaggc 2880
tcaatgccag cgcttcgtta atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc 2940
tgogatgcag atccggaaac taatgggtgca gggcgctgac ttccgcgttt ccagacttta 3000
cgaaacacgg aaaccgaaga ccattcatgt tgttgctcag gtccgagacg ttttgacgca 3060
gcagtcgctt caggttcgct cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc 3120
ccgccagcct agccgggtcc tcaacgacag gagcacgata atgpcaccc gtggggccgc 3180
catgccggcg ataattggct gcttctcgcc gaacggtttg gtggcgggac cagtgcgaa 3240
ggcttgagcg agggcggtgca agattccgaa taccgcaagc gacaggccga tcatcgtcgc 3300
gctccagcga aagcggtcct cgcgaaat gaccagagc gctgccggca cctgtcctac 3360
gagttgcatg ataaagaaga cagtcataag tggcgcgacg atagtcatgc ccgcgccc 3420
ccggaaggag ctgactgggt tgaaggctct caagggcata ggtcgagatc ccggtgccta 3480
atgagtgagc taacttacat taattgcgtt gcgctcactg ccgcctttcc agtcgggaaa 3540
cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagagggc gtttgcgat 3600
tggggcccg ggtgggtttt cttttcacca gtgagacggg caacagctga ttgcccttca 3660
ccgcctggcc ctgagagagt tgcagcaagc ggtccacgct ggtttgcccc agcaggcgaa 3720
aatcctgttt gatggtggtt aacggcggga tataacatga gctgtcttcg gtatcgtcgt 3780
atcccactac cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccgga ctgggtaatg gcgcgcattg 3840
cgcccagcgc catctgatcg ttggcaacca gcacgcagat gggaaacgat cctcattca 3900
gcatttgcat ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca gtgccttcc cgttccgcta 3960
tcggctgaat ttgattgcga gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacggccg 4020
agacagaact taatggggcc gctaacagcg cgatttgctg gtgacccaat ggcaccagat 4080
gctccacgcc cagtcgcgta ccgtcttcat gggagaaaat aatactgttg atgggtgtct 4140
ggtcagagac atcaagaat aacgcgggaa cattagtga ggcagcttcc acagcaatgg 4200
catcctggte atccagcgga tagttaatga tcagccact gacgcgttgc gcgagaagat 4260
tgtgcaccgc cgctttacag gcttcgagc cgcttcttc taccatcgac accaccagc 4320
tggcaccag ttgatcgcg cgagatttaa tgcgcgcgac aatttgcnac ggcgcgtgca 4380
gggccagact ggaggtggca accccaatca gcaacgactg tttgccgcgc agttgttgtg 4440
ccacgcggtt gggaaatgtaa ttcagctcgg ccacgcgcgc ttccactttt tcccgcgttt 4500
tcgcagaaac gttgctggcc tggttcacca cgggggaaac ggtctgataa gagacaccgg 4560
catactctgc gacatcgtat aacgttactg gtttcacatt caccaccctg aattgactct 4620
cttccggggc ctatcatgcc ataccgcgaa aggttttgcg ccattcgatg gtgtccggga 4680
tctcgacgct ctcccttatg cgaactcctgc attaggaagc agcccagtag taggttgagg 4740
ccgttgagca ccgcgcgcgc aaggaaatgg gcatgcaagg agatggcgcc caacagtooc 4800
ccggccacgg ggcctgcoac catacccacg ccgaaacaag cgctcatgag cccgaagtgg 4860
cgagcccgat cttcccacgc ggtgatgtcg gcgatatagg cgcagcaac cgcacctgtg 4920
gcgcgggtga tgccggccac gatgcgtccg gcgtagagga tcgagatctc gatcccgcca 4980

aattaatacgy actcactata ggggaattgt gagcggataa caattccoot ctagaccaca 5040
ccttaaggag gatataacat atggctgctg aaccagtaga agacaattgc atcaactttg 5100
tggcaatgaa atttattgac aatacgcctt actttatagc tgaagatgat gaaaacctgg 5160
aatcagatta ctttggcaag cttgagagca aactatcggt cattcgtaat ttaaattgacc 5220
aggtcctatt tatcgaccac ggggaatcgt cactattcga ggcacatgaca gacagtgact 5280
ggcgagacaa tgcgcgcgca accattttca ttatatctat gtacaaggat tctcagccgc 5340
gggaatgyc cgtaaactatt totgtcaaat gtgaaaagat atccacgctg tctgtgtgaga 5400
acaagattat tagttttcaa gagatgaatc cgcgggataa tatcaaggac acgaagtctg 5460
atatcatatt tttccagcgc agcgtgcccgg ggcacgataa caagatgcaa tttgaatcat 5520
ccagctatga aggytacttt cttgcatgcy agaaggaaacg cgtctctttt aaacttattt 5580
taaagaaaga ggcagagcta ggcgacgca gcattatgtt cactgtocaa aatgaagact 5640
agtggaggat ataataccag gaataaataa aatccatggg ccatcatcat catcatcatg 5700
gcatactcaa actttgtcct cgtgaagaat tcttgagact gtgtaaaaaa aatcatgatg 5760
agatctatcc aataaaaaag agagaggacc gcagacgcct ggcctctcat atatgcaata 5820
caaagtttga tcacctgcct gcaaggaaatg ggcctcacta tgacatcgtg gggatgaaa 5880
ggctgcttca aggcctgggc tacactgtgg ttgacgaaa gaatctcaca gccagggata 5940
tggagtcatg gctgagggca tttgctgcca gaccagagca caagtccctt gacagcacgt 6000
tcttggact catgtctcat ggcacctag aggyaatctg cggaaactgc cataaaaaa 6060
aaaaaccgga tgtgtgtctt tatgacacca tctccagat attcaacaac cgcaactgcc 6120
tcagtctaaa ggcacaaacc aaggtcatca ttgtccaggc ctgcagaggt gaaaacatg 6180
gggaactctg ggtcagagac tctccagcat ccttggcagt catctcttca cagtcatctg 6240
agaacctgga ggcagattct gtttgcaaga tccacgagga gaaggacttc attgctttct 6300
gttcttcaac accacataac gtgtcctgga gagaccgcac aaggggctcc atcttcatta 6360
cggaaactcat cacatgcttc cagaatatt cttgctgctg ccacctaatg gaaatatttc 6420
ggaaggatca gaattcattt gaagttccac aggcataagc ccagatgccc accatagaac 6480
gagcaacctt gacaagagat ttctacctt ttctgggcaa ttgactogag ctcggtggcc 6540
ctggtggccc gcgatgggag gagttggat ggogatttct gagtgaagc tgccggccgg 6600
cgtcggcctg caggtctggg gcagcgcgcg cgagcaggcc cgcggcctgg ccgcccagggt 6660
cgccggccgg ttgcgctcgg cgtgggcga gcaggccag gcgctgctgg tgggtgtcgg 6720
tgggcgagc cgggtggcct tctcgaagc cttgagcgag gagccgctgg actggtcgg 6780
gatcacagtc agcctggcgg acgagcgtg ggtgcggag tgcgatgccc atagcaacgc 6840
cggcctggtt cgccgcacac tgcctcgtgg cgaggcggcg aaggcgcgct tcatcggcct 6900
ctaccagcgg gggcgagcc tggaggaaagc ggccgagctg gccgaccatc acctgcacga 6960
gctgcattg ccgatcgagc tgcctggctct cggcatgggc gacgacgggc ataccgcctc 7020
gctgttcccg aacagccctg gcctggacct ggcgatggat cccagggga cgcgcggtt 7080
cctgcgatg tgggcgcga gcgtgcgca ccagcgcctg acctgcgcg gcgcgctgct 7140
ggcggcggcg aaggtgcagc tgcctggcat ccaggccag tccaagctgg ccaccctgaa 7200
cgccgcgctg gcggtcgagg acgaacggcg gatgcgggtt cgcgccttcc tccgcgcgc 7260
gctgacgac cattggtaac cctgagtggc ggactcgagc accaccacca ccaccactga 7320
gatccggctg ctaacaaagc ccgaaggaa gctgagttgg ctgctgccac cgctgagcaa 7380



taactagcat aaccctcttg ggctctaaa cgggtcttga ggggtttttt gctgaaagga 7440
ggaactatat ccgg 7454

Métodos para prevenir la gluconoilación de proteínas

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención está en el campo de la ingeniería bioquímica. Más particularmente, esta invención se refiere a procedimientos de fermentación para producir polipéptidos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Escherichia coli ("E. coli") es un hospedante usado habitualmente para expresar proteínas para propósitos de investigación, diagnóstico, terapéuticos e industriales. Los sistemas de expresión modernos pueden lograr altos niveles de una amplia variedad de proteínas (Baneyx, *Current Opinion in Biotechnology* 10:411-421 (1999)). Sin embargo, la calidad de la proteína expresada con frecuencia es tan importante o más importante que la cantidad. Las proteínas expresadas en *E. coli* se pueden formar como agregados insolubles, o pueden tener aminoácidos mal incorporados (Bogosian, et al., *Journal of Biological Chemistry* 264:531-539 (1989)), o retener la metionina N-terminal (Chaudhuri, et al., *Journal of Molecular Biology* 285:1179-1194 (1999); Vassileva-Atanassova, et al., *Journal of Biotechnology* 69:63-67 (1999); Yamashita, et al., *Protein Expression & Purification* 16:47-52 (1999)). Además, se pueden producir modificaciones postraduccionales indeseadas tales como oxidación (Berti, et al., *Protein Expression & Purification* 11:111-118 (1997); Konz, et al., *Biotechnology Progress* 14:393-409 (1998)) o α -N-6-fosfogluconoilación (Geoghegan, et al., *Anal. Biochem.* 267:169-184 (1999); Kim et al., *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 57:759-762 (2001); Yan, et al., *Biochemical & Biophysical Research Communications* 262:793-800 (1999) "Yan et al. I"; Yan, et al., *Biochemical & Biophysical Research Communications* 259:271-282 (1999) "Yan et al. II"). Estas modificaciones pueden afectar adversamente a la actividad, estabilidad, estructura o inmunogenicidad de la proteína expresada, reduciendo en gran medida la utilidad de *E. coli* como hospedante para expresar polipéptidos.

Se ha descrito la alfa(α)-N-6-fosfogluconoilación de varias proteínas recombinantes fusionadas con marcadores de afinidad de hexahistidina ("marcadores hexa-His") (Geoghegan, et al.; Kim, et al.; Yan et al. I; Yan et al. II). En estos estudios, se encontró que un derivado de ácido glucónico se unía al extremo de la proteína recombinante. Todas estas proteínas se expresaron en cepas B de *E. coli*, usando vectores basados en pET (Novagen). Donde se indicaba, se usó medio LB. El aducto se detectó como una masa adicional asociada con el polipéptido de 258 Daltons ("Da"), que

90

- representaba la adición de la 6-fosfogluconolactona (6-PGL), o de 178 Da, que representaba la presencia de gluconolactona sin el fosfato. Se supuso que la fosfogluconoilación se producía en el grupo α -amino N-terminal por reacción con la 6-PGL endógena, un producto intermedio del ciclo de las pentosas fosfato. Se propuso que el aducto de +178 Da era el resultado de la actividad enzimática actuando en el aducto de +258 Da para eliminar el fosfato. Se mostró que la formación del aducto era específica para la secuencia de aminoácidos en el extremo N adyacente al marcador de His. Las secuencias polipeptídicas GXXHHHH, donde XX es SS, SA, AS, o AA, eran las más propensas a la α -N-6-fosfogluconoilación, mientras que SHHHHHH era menos propensa, y PHHHHHH y PFHHHHHH no se modificaban en absoluto (Geoghegan, et al.). No se detectaron modificaciones de otros grupos amino en ninguna otra parte de la proteína en experimentos in vivo o in vitro que usaron niveles altos de gluconolactona añadida. (Geoghegan, et al.)
- Se ha mostrado que la fosfogluconoilación N-terminal inhibe la cristalización de proteínas (Kim, et al.), pero se sabe relativamente poco más sobre su efecto en la función, estabilidad o inmunogenicidad de la proteína. Se espera que la 6-PGL, que es un potente electrófilo, pueda estar implicada en reacciones de glicación in vivo (Rakitzis and Papandreou, *Chemico-Biological Interactions* 113:205-216 (1998)). La glicación de proteínas se ha estudiado ampliamente y se sabe que juega un papel fundamental en el envejecimiento y estados patológicos relacionados con complicaciones diabéticas (Baynes and Monnier, *The Maillard Reaction in Aging, Diabetes, and Nutrition*. Alan R. Liss, New York (1989)). Se ha mostrado que la delta-gluconolactona añadida de forma exógena, produce glicación de la hemoglobina, que puede ser un factor en las complicaciones vasculares de la diabetes (Lindsay, et al., *Clinica Chimica Acta* 263:239-247 (1997)). Además, la glicación de la alanina-aminotransferasa en el grupo epsilon-amino de la Lys 313 reduce notablemente su actividad catalítica (Beranek, et al., *Molecular & Cellular Biochemistry* 218:35-39 (2001)).
- Se ha mostrado que la 6-fosfogluconolactonasa ("pgl") es una enzima esencial de la ruta de las pentosas fosfato, específicamente en la hidrólisis de PGL a ácido 6-fosfogluconico. (Miclet, et al., *J. Biol. Chem.* 276:34840-34846 (2001)). Se ha identificado el gen que codifica esta enzima en seres humanos (Collard, et al., *FEBS Letters* 459:223-226 (1999)), *Pseudomonas aeruginosa* (Hager, et al., *Journal of Bacteriology* 182:3934-3941 (2000)), y *Trypanosoma brucei* y *Plasmodium falciparum* (Miclet, et al.). Aunque se ha

Q

observado la actividad de la pgl desde hace tiempo en *E. coli* (Kupor and Fraenkel, *Journal of Bacteriology* 100:1296-1301 (1969) "Kupor I" and Kupor and Fraenkel, *Journal of Biological Chemistry* 247:1904-1910 (1972) "Kupor II"), no se ha identificado la secuencia génica responsable de la codificación de una enzima con esta actividad (Cordwell, S. J. *Arch. Microbiol.* 172:269-279 (1999)). Se ha sugerido que además de permitir el flujo metabólico por el ciclo de las pentosas fosfato, la actividad de la pgl dentro de la célula previene la acumulación de 6-PGL y las consiguientes reacciones perjudiciales con nucleófilos intracelulares (Miclet, et al.). Las observaciones descritas de fosfogluconoilación de proteínas en el extremo N, apoyan la hipótesis de que la 6-PGL producida en la ruta puede modificar proteínas, pero no se han descrito pruebas de que la modulación de la actividad de la pgl pueda afectar a los niveles de proteína modificada.

Además, la cepa de *Escherichia coli* BL21(DE3) es un hospedante usado habitualmente para expresar proteínas con propósitos de investigación, diagnóstico, terapéuticos e industriales, Studier, F.W., and Moffatt, B.A., *J. Mol. Biol.* 1986 May 5; 189(1):113-130. Esta cepa es comercialmente atractiva porque alcanza niveles muy altos de expresión de proteína recombinante mediante acoplamiento de la expresión de una copia cromosómica de la RNA-polimerasa de T7 y el uso de un promotor de RNA-polimerasa de T7 basado en plásmido en la proteína recombinante de interés. De acuerdo con esto, puesto que la RNA-polimerasa de T7 es una RNA-polimerasa extremadamente selectiva y activa, la transcripción de la proteína recombinante se acumula con niveles muy altos, con frecuencia incluso hasta el punto de que disminuyen los transcritos de la célula hospedante.

Desafortunadamente, la cepa BL21(DE3) libera muy lentamente, aunque detectable, partículas de fago lambda infeccioso, del orden de 10-20 unidades formadoras de placa/ml (UFP), Stewart Shuman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 89:3489-3493. Según parece, se introdujo el gen de la RNA-polimerasa de T7 en el cromosoma de la célula hospedante BL21 mediante transducción con el fago lambda defectuoso DE3 que llevaba el gen de la RNA-polimerasa de T7 insertado en el gen *int* de lambda, Studier, F.W., and Moffatt, B.A., *J. Mol. Biol.* 1986; 189(1):113-130. El profago defectuoso resultante no puede replicarse normalmente debido a la interrupción del gen *int*. La escisión cromosómica del profago DE3 es un requisito para la replicación del profago antes del empaquetamiento y liberación de partículas de fago infeccioso, y depende de la recombinación de la escisión homóloga

QV

que es dirigida por el producto del gen *int*. Como se describe en la presente memoria, niveles muy bajos de partículas de fago liberadas son debidos a sucesos de escisión del profago aleatorios independientes de *int*. Aunque la liberación de niveles muy bajos de partículas de fago infeccioso puede ser
5 aceptable en algunos laboratorios de investigación, cualquier liberación de fago infeccioso es totalmente inaceptable en el marco de instalaciones de fabricación biofarmacéuticas, tanto debido a consideraciones de seguridad para el paciente como a que la liberación de agentes infecciosos puede poner en riesgo otros procedimientos de fabricación basados en *E. coli*.

10 Es muy necesario un método para expresar o sobreexpresar polipéptidos en un microorganismo, tal como *E. coli*, con una menor incidencia de fosfogluconoilación durante la fermentación. Además, sería muy conveniente la creación de una célula hospedante BL21(DE3) totalmente libre de fagos, para fabricar proteínas recombinantes terapéuticas en el formato de
15 *E. coli*.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona métodos para prevenir la gluconoilación de polipéptidos expresados por microorganismos, mediante crecimiento del microorganismo en medio de cultivo rico.

20 La presente invención también proporciona métodos para prevenir la gluconoilación de polipéptidos expresados por microorganismos, que incluyen introducir (por ejemplo, transformar, infectar o transfectar) DNA que codifica un polipéptido que demuestra actividad de pgl en el microorganismo. Este polipéptido puede ser una enzima fosfogluconolactonasa. En otro aspecto de la
25 invención, la enzima fosfogluconolactonasa puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90% respecto a la enzima fosfogluconolactonasa producida por *Pseudomonas*, incluyendo, pero sin limitar, *P. aeruginosa*.

La presente invención también proporciona microorganismos capaces
30 de prevenir la gluconoilación de proteínas. En una realización, un microorganismo puede contener DNA que codifica un polipéptido que demuestra actividad de pgl.

La presente invención también proporciona un polinucleótido aislado que tiene una identidad de al menos 90% respecto al polinucleótido expuesto
35 en el SEQ ID NO:7.

La presente invención también proporciona un microorganismo sin expresión detectable de fago lambda infeccioso.



BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra un mapa de enzimas de restricción del vector pECO-1-pgl-2-f3.

La Figura 2 muestra una secuencia polinucleótida para el vector pECO-1-pgl-2-13. (SEQ ID NO:9).

La Figura 3 muestra un mapa de enzimas de restricción del vector pET28ProIL18Casp5.

La Figura 4 muestra una secuencia polinucleótida para el vector pET28ProIL18Casp5. (SEQ ID NO:13)

La Figura 5 muestra un mapa de enzimas de restricción del vector pET28proIL18Casp5+pgl.

La Figura 6 muestra una secuencia polinucleótida para el vector pET28proIL18Casp5+pgl (SEQ ID NO:14).

La Figura 7 muestra una secuencia polinucleótida, SEQ ID NO:7.

La Figura 8 muestra una secuencia polipeptídica, SEQ ID NO:8.

Glosario

"Célula(s) hospedante(s)" es una célula, incluyendo pero sin limitar, una célula bacteriana o célula de un microorganismo, en la que se ha introducido (por ejemplo, transformado, infectado o transfectado) o se puede introducir (por ejemplo, transformar, infectar o transfectar) una secuencia polinucleótida aislada.

"Transformado" como se conoce en la técnica, es la modificación directa del genoma o episoma de un organismo mediante la introducción de DNA o RNA externo, o cualquier otra introducción estable de DNA o RNA externo.

"Transfectado" como se conoce en la técnica, es la introducción de DNA o RNA externo en un microorganismo, incluyendo, pero sin limitar, DNA o RNA recombinante.

"Identidad", como se conoce en la técnica, es una relación entre dos o más secuencias polipeptídicas o dos o más secuencias polinucleótidas, según el caso, determinada comparando las secuencias. En la técnica, "identidad" también significa el grado de conexión entre las secuencias polipeptídicas o polinucleótidas, según el caso, determinado por la correspondencia entre las hebras de dichas secuencias. La "Identidad" se puede calcular fácilmente por métodos conocidos, incluyendo, pero sin limitar, los descritos en (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence

- Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; y Carillo, H., and Lipman, D.,
- 5 SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988)). Los métodos para determinar la identidad están diseñados para dar la mayor correspondencia entre las secuencias ensayadas. Además, los métodos para determinar la identidad están codificados en programas de ordenador disponibles por el público. Entre los métodos de los programas de ordenador para determinar la identidad entre
- 10 dos secuencias se incluyen, pero no se limita, el paquete de programas GCG (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research* 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul, S.F. et al., *J. Molec. Biol.* 215: 403-410 (1990)). El programa BLAST X está disponible por el público en NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894;
- 15 Altschul, S., et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990)). También se puede usar el conocido algoritmo de Smith Waterman para determinar la identidad.

Entre los parámetros para comparar secuencias polipeptídicas se incluyen los siguientes:

- Algoritmo: Needleman and Wunsch, *J. Mol Biol.* 48: 443-453 (1970)
- 20 Matriz de comparación: BLOSSUM62 de Hentikoff and Hentikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:10915-10919 (1992).

Penalización por hueco: 12

Penalización por longitud del hueco: 4

- Un programa útil con estos parámetros está disponible por el público
- 25 como el programa "gap" de Genetics Computer Group, Madison WI. Los parámetros mencionados son los parámetros por defecto para comparaciones de péptidos (junto con la no penalización por huecos terminales).

Entre los parámetros para comparar polinucleótidos se incluyen los siguientes:

- 30 Algoritmo: Needleman and Wunsch, *J. Mol Biol.* 48: 443-453 (1970)

Matriz de comparación: correspondencias = +10, no correspondencias = 0

Penalización por hueco: 50

Penalización por longitud del hueco: 3

- 35 Disponible como: El programa "gap" de Genetics Computer Group, Madison WI. Estos son los parámetros por defecto para las comparaciones de ácidos nucleicos.

A continuación se proporciona un significado preferido para "identidad" para polinucleótidos y polipéptidos, según el caso, en (1) y (2).

(1) Las realizaciones de polinucleótidos incluyen además un polinucleótido aislado que comprende una secuencia polinucleótida que tiene una identidad de al menos 70, 80, 85, 90, 95, 97 ó 100% respecto a la secuencia de referencia del SEQ ID NO:7, en el que dicha secuencia polinucleótida puede ser idéntica a la secuencia de referencia del SEQ ID NO:7, o puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones de nucleótidos comparado con la secuencia de referencia, en el que dichas alteraciones se seleccionan del grupo que consta de al menos una supresión, sustitución, incluyendo transición o transversión, o inserción de nucleótido, y en el que dichas alteraciones se pueden producir en las posiciones terminales 5' o 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier sitio entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos en la secuencia de referencia, y en el que dicho número de alteraciones de nucleótidos se determina multiplicando el número total de nucleótidos en el SEQ ID NO:7 por el número entero que define el porcentaje de identidad dividido entre 100, y después restando este producto a dicho número total de nucleótidos en el SEQ ID NO:7, o:

$$n_n < x_n - (x_n \cdot y)$$

en el que n_n es el número de alteraciones de nucleótidos, x_n es el número total de nucleótidos en el SEQ ID NO:7, y es 0,95 para 95%, 0,97 para 97%, o 1,00 para 100%, y $\cdot$ es el símbolo del operador de multiplicación, y en el que cualquier producto no entero de x_n e y se redondea por defecto al número entero más cercano antes de restarlo a x_n . Las alteraciones de una secuencia polinucleótida que codifica un polipéptido pueden crear mutaciones sin sentido, sustitutivas, o con desplazamiento del marco de lectura en esta secuencia codificante, y por lo tanto pueden alterar el polipéptido codificado por el polinucleótido después de dichas alteraciones.

(2) Las realizaciones de polipéptidos incluyen además un polipéptido aislado que comprende un polipéptido que tiene una identidad de al menos 70, 80, 85, 90, 95, 97 ó 100% respecto a una secuencia polipeptídica de referencia, en el que dicha secuencia polipeptídica puede ser idéntica a la secuencia de referencia, o puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones de aminoácidos comparado con la secuencia de referencia, en el que dichas alteraciones se seleccionan del grupo que consta de al menos una

supresión, sustitución, incluyendo sustitución conservativa y no conservativa, o inserción de aminoácido, y en el que dichas alteraciones se pueden producir en las posiciones amino o carboxi terminales de la secuencia polipeptídica de referencia o en cualquier sitio entre esas posiciones terminales, intercaladas
 5 individualmente entre los aminoácidos en la secuencia de referencia, o en uno o más grupos contiguos en la secuencia de referencia, y en el que dicho número de alteraciones de aminoácidos se determina multiplicando el número total de aminoácidos por el número entero que define el porcentaje de identidad dividido entre 100 y después restando este producto a dicho número
 10 total de aminoácidos, o:

$$n_a < x_a - (x_a \cdot y)$$

en el que n_a es el número de alteraciones de aminoácidos, x_a es el número total de aminoácidos en la secuencia, y es 0,95 para 95%, 0,97 para 97%, o 1,00 para 100%, y $\cdot$ es el símbolo del operador de multiplicación, y en
 15 el que cualquier producto no entero de x_a e y se redondea por defecto al número entero más cercano antes de restarlo a x_a .

"Aislado" significa alterado "por la mano del hombre" de su estado natural, es decir, si se encuentra en la naturaleza, se ha cambiado o sacado de su entorno natural, o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido
 20 presente de forma natural en un organismo vivo no está "aislado", pero este mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales con los que coexiste en su estado natural, está "aislado", incluyendo, pero sin limitar, cuando dicho polinucleótido o polipéptido se vuelve a introducir en una célula.

"Polinucleótido(s)" en general se refiere a cualquier polirribonucleótido o
 25 polidesoxirribonucleótido, que puede ser RNA o DNA no modificado o RNA o DNA modificado. "Polinucleótido(s)" incluye, sin limitación, DNA mono y bicatenario, DNA que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias o regiones mono, bi y tricatenarias, RNA mono y bicatenario, y RNA que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden
 30 DNA y RNA que pueden ser regiones monocatenarias o, más típicamente, bicatenarias o tricatenarias, o una mezcla de regiones mono y bicatenarias. Además, "polinucleótido" tal como se usa en la presente memoria se refiere a regiones tricatenarias que comprenden RNA o DNA, o tanto RNA como DNA. Las hebras en dichas regiones pueden ser de la misma molécula o de
 35 diferentes moléculas. Las regiones pueden incluir toda la región de una o más de las moléculas, pero más típicamente implican solo una región de algunas de las moléculas. Una de las moléculas de una región helicoidal triple es con

9X

frecuencia un oligonucleótido. Tal como se usa en la presente memoria, el término "polinucleótido(s)" también incluye DNA o RNA como se han descrito antes, que comprenden una o más bases modificadas. Por lo tanto, los DNA o RNA con cadenas principales modificadas por estabilidad o por otras razones son "polinucleótido(s)" tal como se entiende este término en la presente memoria. Además, los DNA o RNA que comprenden bases poco comunes, tales como inosina, o bases modificadas, tales como bases tritiladas, sólo por nombrar dos ejemplos, son polinucleótidos tal como se usa el término en la presente memoria. Se observará que se han hecho una gran variedad de modificaciones al DNA y RNA que sirven para propósitos muy útiles para los expertos en la técnica. El término "polinucleótido(s)" tal como se usa en la presente memoria, abarca dichas formas de polinucleótidos química, enzimática o metabólicamente modificadas, así como las formas químicas de DNA y RNA características de virus y células, incluyendo, por ejemplo, células sencillas y complejas. "Polinucleótido(s)" también abarca polinucleótidos cortos, denominados con frecuencia oligonucleótido(s).

"Polipéptido(s)" se refiere a cualquier péptido o proteína que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados. "Polipéptido(s)" se refiere tanto a cadenas cortas, normalmente denominadas péptidos, oligopéptidos y oligómeros, como a cadenas más largas denominadas en general proteínas. Los polipéptidos pueden comprender aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes. Los "polipéptido(s)" incluyen los modificados por procedimientos naturales, tales como modificaciones en el procesamiento y otras postraduccionales, pero también por técnicas de modificación química. Dichas modificaciones están descritas en los textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una voluminosa bibliografía de investigación, y son conocidas por los expertos en la técnica. Se apreciará que puede haber el mismo tipo de modificación con el mismo grado o distinto grado en varios sitios en un polipéptido dado. También, un polipéptido dado puede comprender muchos tipos de modificaciones. Las modificaciones se pueden producir en cualquier sitio en un polipéptido, incluyendo la cadena principal peptídica, las cadenas laterales de los aminoácidos, y los extremos amino o carboxilo. Entre las modificaciones se incluyen, por ejemplo, acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol,

AB

reticulación, ciclación, formación de enlace disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, formación de anclaje de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, glicosilación, unión de lípido, sulfatación, gamma-carboxilación de los restos de ácido glutámico, hidroxilación y ADP-ribosilación, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos a proteínas mediada por RNA de transferencia, tales como arginilación y ubiquitinación. Véase por ejemplo, **PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES**, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993), y Wold, F., *Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects*, pgs. 1-12 en **POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS**, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York (1983); Seifter et al., *Meth. Enzymol.* 182:626-646 (1990), y Rattan et al., Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging, Ann. N.Y. Acad. Sci. 663: 48-62 (1992). Los polipéptidos pueden ser ramificados o cíclicos, con o sin ramificaciones. Los polipéptidos cíclicos, ramificados y circulares ramificados pueden ser resultado de procesos postraduccionales naturales, y se pueden hacer también por métodos completamente sintéticos.

"Sistema(s) de expresión recombinante" se refiere a sistemas de expresión o sus partes, o polinucleótidos de la invención, introducidos o transformados en una célula hospedante o lisato de célula hospedante, para producir polinucleótidos y polipéptidos de la invención

"Variante(s)" tal como se usa el término en la presente memoria, es un polinucleótido o polipéptido que difiere de un polinucleótido o polipéptido de referencia respectivamente, pero que retiene las propiedades esenciales. Una variante típica de un polinucleótido difiere en la secuencia de nucleótidos de otro polinucleótido de referencia. Los cambios en la secuencia de nucleótidos de la variante pueden alterar o no la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia. Los cambios de nucleótidos pueden dar como resultado sustituciones, adiciones, supresiones de aminoácidos, proteínas de fusión y truncamientos en el polipéptido codificado por la secuencia de referencia, como se discute a continuación. Una variante típica de un polipéptido difiere en la secuencia de aminoácidos de otro polipéptido de referencia. En general, las diferencias están limitadas, de modo que las secuencias del polipéptido de referencia y de la variante son muy

99
H

similares en su totalidad, y en muchas regiones idénticas. Una variante y un polipéptido de referencia pueden diferir en la secuencia de aminoácidos en una o más sustituciones, adiciones, supresiones en cualquier combinación. Un resto de aminoácido sustituido o insertado puede ser uno codificado o no por el código genético. La presente invención también incluye variantes de cada uno de los polipéptidos de la invención, es decir, polipéptidos que varían de las referencias por sustituciones de aminoácidos conservativas, por las cuales un resto es sustituido por otro con características similares. Dichas sustituciones típicas son entre Al, Val, Leu e Ile; entre Ser y Thr, entre los restos ácidos Asp y Glu; entre Asn y Gln; y entre los restos básicos Lys y Arg; o restos aromáticos Phe y Tyr. Son particularmente preferidas las variantes en las que varios, 5-10, 1-5, 1-3, 1-2 o 1 aminoácidos son sustituidos, suprimidos o añadidos en cualquier combinación. Una variante de un polinucleótido o polipéptido puede ser una natural tal como una variante alélica, o puede ser una variante que no se sabe que sea natural. Las variantes de polinucleótidos y polipéptidos que no son naturales se pueden hacer por técnicas de mutagénesis, por síntesis directa y por otros métodos recombinantes conocidos por los expertos en la técnica.

"Microorganismo(s)" significa un (i) procariota, incluyendo, pero sin limitar, un miembro del género *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bordetella*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Actinomycetes*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Enterobacter*, *Yersinia*, *Fancisella*, *Pasturella*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Erysipelothrix*, *Branhamella*, *Actinobacillus*, *Streptobacillus*, *Listeria*, *Calymmatobacterium*, *Brucella*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Treponema*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Vibrio*, *Proteus*, *Erwinia*, *Borrelia*, *Leptospira*, *Spirillum*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Legionella*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Rickettsia*, *Chlamydia*, *Borrelia* y *Mycoplasma*, e incluyendo además pero sin limitar, un miembro de la especie o grupo, *Streptococcus* del Grupo A, *Streptococcus* del Grupo B, *Streptococcus* del Grupo C, *Streptococcus* del Grupo D, *Streptococcus* del Grupo G, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium*, *Streptococcus durans*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium leprae*, *Actinomycetes israelii*, *Listeria monocytogenes*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica*,

- Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus aegyptius*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus ducreyi*, *Bordetella*, *Salmonella typhi*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia pestis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, *Vibrio cholera*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Treponema pallidum*, *Rickettsia rickettsii* y *Chlamydia trachomatis*, (ii) un arqueón, incluyendo, pero sin limitar, *Archaeobacter*, y (iii) un eucariota unicelular o filamentoso, incluyendo, pero sin limitar, un protozoo, un hongo, un miembro del género *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, o *Candida*, y un miembro de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, o *Candida albicans*.
- "Bacteria(s)(no)" significa un (i) procariota, incluyendo, pero sin limitar, un miembro del género *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bordetella*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Actinomycetes*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Enterobacter*, *Yersinia*, *Francisella*, *Pasteurella*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Erysipelothrix*, *Branhamella*, *Actinobacillus*, *Streptobacillus*, *Listeria*, *Calymmatobacterium*, *Brucella*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Treponema*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Vibrio*, *Proteus*, *Erwinia*, *Borrelia*, *Leptospira*, *Spirillum*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Legionella*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Rickettsia*, *Chlamydia*, *Borrelia* y *Mycoplasma*, e incluyendo además, pero sin limitar, un miembro de la especie o grupo, *Streptococcus* del Grupo A, *Streptococcus* del Grupo B, *Streptococcus* del Grupo C, *Streptococcus* del Grupo D, *Streptococcus* del Grupo G, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium*, *Streptococcus durans*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium leprae*, *Actinomyces israelii*, *Listeria monocytogenes*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus aegyptius*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus ducreyi*, *Bordetella*, *Salmonella typhi*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia pestis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, *Vibrio cholera*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus*

cereus, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Treponema pallidum*, *Rickettsia rickettsii* y *Chlamydia trachomatis*, y (ii) un arqueón, incluyendo, pero sin limitar, *Archaeobacter*.

5 Tal como se usa en la presente memoria, "polipéptido(s) heterólogo(s)" se refiere a un polipéptido no sintetizado naturalmente por una célula o microorganismo hospedante transformado de interés, e introducido en la célula o microorganismo hospedante por DNA recombinante. Por ejemplo, *E. coli* puede actuar como un microorganismo hospedante para la expresión de interleuquina, la cual no se produce en una *E. coli* no transformada. Los
10 polipéptidos heterólogos pueden incluir polipéptidos que se han modificado para facilitar el aislamiento.

Tal como se usa en la presente memoria, "marcador de afinidad" se refiere a cualquier resto asociado con una molécula que puede dar a dicha molécula una afinidad selectiva por otra sustancia o molécula. Por ejemplo, se
15 puede usar un marcador de afinidad para facilitar la purificación de una molécula proporcionando a la molécula una afinidad selectiva por un material de empaquetamiento de columna. Un ejemplo no limitante de un marcador de afinidad es un marcador de His.

Tal como se usa en la presente memoria, "marcador de His" se refiere a
20 una repetición de aminoácidos histidina, y puede incluir otros aminoácidos codificados en un polipéptido por técnicas de ingeniería. Típicamente, un marcador de His contiene al menos seis repeticiones de histidina ("hexa"), y está situado cerca del extremo N- del polipéptido. Los marcadores de His se pueden usar para facilitar la purificación de polipéptidos heterólogos en
25 columnas con Ni.

Tal como se usa en la presente memoria, "medio mínimo" se refiere al medio de crecimiento celular que comprende ingredientes químicamente definidos que incluyen; pero no se limitan, tampones tales como tampón de fosfato, sales tales como sulfato magnésico, cloruro cálcico, cloruro sódico, o
30 sulfato de manganeso, minerales tales como hierro, cinc, cobre, cobalto, o molibdeno, una fuente de carbono tal como glucosa o glicerol, y una fuente de nitrógeno tal como sulfato o nitrato amónico. Un ejemplo es el medio M9 (Kim, YS, JH Seo and HY Cha, *Enzyme and Microbial Technology* 33 (2003):460-465.)

35 Tal como se usa en la presente memoria, "medio rico" se refiere al medio de crecimiento celular que comprende ingredientes no definidos y que incluyen, pero no se limitan, componentes adicionales tales como tampones

102

(por ejemplo tampón de fosfato), sales (por ejemplo sulfato magnésico, cloruro cálcico, cloruro sódico o sulfato de manganeso), y una fuente de carbono que puede ser glucosa o glicerol, por ejemplo. La fuente de nitrógeno puede estar compuesta por un hidrolisato de proteína tal como extracto de levadura, hidrolisato de carne, o hidrolisato de soja. La fuente de nitrógeno se puede proporcionar en una concentración capaz de mantener el crecimiento celular, con una relación de fuente de nitrógeno complejo (en gramos por litro) a densidad celular máxima (en unidades de DO) de 1:1 o mayor. Entre los ejemplos de medio rico se incluyen, pero no se limitan, Superbroth (Atlas RM, Handbook of Microbiological Media; Parks LC Ed.; CRC Press: Boca Raton FL, pp. 281, 523, 529, 859), caldo de Terrific (Alpha Biosciences, Baltimore, MD EE.UU.), Caldo Turbo (Athena Enzyme Systems, Baltimore, MD EE.UU.), o caldo Hyper (Athena Enzyme Systems, Baltimore, MD EE.UU.).

Tal como se usa en la presente memoria, "gluconilación" se refiere a la unión de un derivado de ácido glucónico a una proteína. La gluconilación puede incluir, pero no se limita, la formación de aducto de 6-fosfogluconolactona (6-PGL), acetilación, formilación, desformilación, gluconolactonación, o derivatización con ácido glucónico.

Tal como se usa en la presente memoria, "rendimiento de la concentración" se refiere a la concentración de un producto (por ejemplo, polipéptido expresado heterológamente) en solución (por ejemplo, caldo de cultivo, o mezcla de lisis celular o tampón) y normalmente se expresa como mg/l o g/l. Un aumento del rendimiento de la concentración se puede referir a un aumento absoluto o relativo de la concentración de un producto producido en dos conjuntos definidos de condiciones.

Tal como se usa en la presente memoria, "actividad de pgl" se refiere a cualquier actividad de una 6-fosfogluconolactonasa ("pgl"). Dicha actividad puede incluir hidrólisis de 6-PGL a ácido 6-fosfogluconico. La actividad de pgl significativa se puede definir como actividad de hidrólisis de al menos 0,2 UI/min/g.

Tal como se usa en la presente memoria, las expresiones "condiciones rigurosas" y "condiciones de hibridación rigurosas" significan que la hibridación se producirá sólo si hay una identidad de al menos 70% y preferiblemente al menos 80%, pero especialmente preferiblemente al menos 95% entre las secuencias. Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas es incubación toda la noche a 42°C en una solución que comprende: formamida al 50%, 5xSSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6),

103

5x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10%, y DNA de esperma de salmón fraccionado y desnaturalizado 20 microgramos/ml, seguido de lavado de los filtros en 0,1xSSC aproximadamente a 65°C. Las condiciones de hibridación y lavado son conocidas y ejemplificadas por Sambrook, et al.,

- 5 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), particularmente en su capítulo 11, cuya descripción se incorpora en la presente memoria en su totalidad como referencia.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 10 Las tensiones celulares que provienen del crecimiento en medio mínimo, altas densidades celulares, y alto nivel de expresión de polipéptido heterólogo, entre otras tensiones, pueden contribuir a la gluconoilación del polipéptido heterólogo. Por lo tanto, aliviar uno o más de estos factores de tensión puede afectar al nivel de gluconoilación de la proteína expresada en el microorganismo, que a su vez puede afectar a la pureza y rendimiento de la
- 15 concentración de un polipéptido deseado. Algunas cepas de *E. coli* pueden tener niveles mayores de actividad de pgl que otras (aunque no se ha identificado el gen responsable de esta actividad en *E. coli*. Cordwell, S.J. 1999. *Arch. Microbiol.* 172:269-279). Además, la gluconoilación de polipéptidos puede afectar a la cristalización y determinación estructural de estos
- 20 polipéptidos.

- La presente invención, proporciona métodos para prevenir la gluconoilación de un polipéptido expresado en un microorganismo, que comprenden hacer crecer dicho microorganismo en un medio de cultivo rico. En otro aspecto de la invención, el microorganismo no demuestra actividad de
- 25 6-fosfogluconolactonasa significativa cuando se hace crecer en medio mínimo. El microorganismo puede ser una cepa de *E. coli*. En otro aspecto de la invención, una *E. coli* es una cepa B. En otro aspecto de la invención, un medio de cultivo rico comprende una fuente de nitrógeno complejo. Un medio de cultivo rico puede mantener el crecimiento celular en una relación de
- 30 concentración de fuente de nitrógeno complejo a densidad celular 1:1. Una fuente de nitrógeno complejo puede comprender triptona, peptona, o extracto de levadura. En otro aspecto de la invención, un medio de cultivo es Superbroth. El medio Superbroth puede estar doblemente concentrado. En otro aspecto de la invención, se transfecta un microorganismo con una molécula de
- 35 DNA recombinante que codifica un polipéptido heterólogo.

En otra realización de la presente invención, se proporcionan métodos para prevenir la gluconoilación de un polipéptido expresado en *E. coli*, que

102

comprenden fermentar una variedad de la cepa K de *E. coli* para expresar el polipéptido. En otro aspecto de la invención, una cepa K demuestra actividad de fosfogluconolactonasa al menos aproximadamente 100 veces mayor comparada con la cepa B hecha crecer sustancialmente en las mismas condiciones. En otro aspecto de la invención, una cepa K es K-12.

En otra realización de la presente invención, se proporcionan métodos para prevenir la gluconoilación de polipéptidos expresados en un microorganismo, que comprenden introducir DNA en el microorganismo, en el que el DNA codifica un polipéptido que demuestra actividad de 6-fosfogluconolactonasa. En otro aspecto de la invención, un microorganismo es *E. coli*. Un DNA comprende DNA que codifica una enzima 6-fosfogluconolactonasa. En otro aspecto de la invención, un DNA que codifica una enzima 6-fosfogluconolactonasa tiene una identidad de secuencia de al menos 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 100% respecto a un DNA que codifica la 6-fosfogluconolactonasa de una *Pseudomonas*, que puede ser *P. aeruginosa*. En otro aspecto de la invención, un DNA que codifica una enzima 6-fosfogluconolactonasa tiene una identidad de secuencia de al menos 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 100% respecto al SEQ ID NO:7. En otro aspecto de la invención, una enzima 6-fosfogluconolactonasa tiene una secuencia de aminoácidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 100% respecto al SEQ ID NO:8. Un DNA que codifica una enzima 6-fosfogluconolactonasa comprende la secuencia expuesta en el SEQ ID NO:7. El DNA puede ser DNA recombinante, y/o se puede transformar en un DNA genómico de un microorganismo.

En otra realización de la presente invención, se proporciona un microorganismo que puede prevenir la gluconoilación de polipéptidos. Un microorganismo comprende DNA que codifica un polipéptido que demuestra actividad de 6-fosfogluconolactonasa. Un microorganismo comprende DNA que codifica 6-fosfogluconolactonasa. En otro aspecto de la invención, un DNA que codifica 6-fosfogluconolactonasa tiene una identidad de secuencia de al menos 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 100% respecto al DNA que codifica una enzima 6-fosfogluconolactonasa de una *Pseudomonas* y en el que el microorganismo no es *Pseudomonas*. En otro aspecto de la invención, un DNA que codifica 6-fosfogluconolactonasa es de *P. aeruginosa*. En otro aspecto de la invención, un microorganismo es una cepa de *E. coli*. En otro aspecto de la invención, un microorganismo es una cepa de *E. coli*, en el que se incorpora un DNA que codifica la 6-fosfogluconolactonasa en el genoma del

105 G
X

microorganismo.

En otra realización de la presente invención, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende un polinucleótido que tiene una identidad de al menos 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 100% respecto al
5 polinucleótido expuesto en el SEQ ID NO:7. En otro aspecto de la invención, un polinucleótido aislado comprende un polinucleótido que tiene una identidad de secuencia de al menos 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o 100% respecto a un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende aminoácidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 70%, 80%, 85%, 90%,
10 95%, 97% o 100% respecto al SEQ ID NO:8. En otro aspecto de la invención, un DNA codifica una proteína que demuestra actividad de 6-fosfogluconolactonasa. En otro aspecto de la invención, se expone una secuencia de DNA en el SEQ ID NO:7. En otro aspecto de la invención, una secuencia de DNA es homóloga a un DNA que codifica la 6-
15 fosfogluconolactonasa de *P. aeruginosa*. En otro aspecto de la invención, un polinucleótido aislado comprende además un polinucleótido que codifica una interleuquina-18 humana, o sus variantes.

En otra realización de la presente invención, se proporcionan métodos para mejorar la formación de cristal del polipéptido, que comprenden expresar
20 dicho polipéptido por un método de la invención, con el fin de reducir la gluconoilación del polipéptido.

En otra realización de la presente invención, se proporcionan métodos para mejorar la eficacia del crecimiento y expresión de un polipéptido en un microorganismo. En un aspecto, un polipéptido demuestra un mayor
25 rendimiento de la concentración en la etapa de fermentación comparado con el polipéptido gluconoilado.

En otra realización de la presente invención, se proporcionan métodos para producir una interleuquina humana, que comprenden coexpresar dicha interleuquina humana en un microorganismo con una enzima que tiene
30 actividad de 6-fosfogluconolactonasa ("pgl"). En un aspecto, una interleuquina humana es una proteína IL-18, o sus variantes. En un aspecto, un microorganismo es *E. coli*. En un aspecto, la pgl es codificada por un polinucleótido que es transformado o transfectado en *E. coli*, incluyendo, pero sin limitar, ser transformado en el genoma o episoma.

35 En otra realización de la presente invención, se proporcionan métodos para producir una interleuquina humana, que comprenden expresar la interleuquina humana en un microorganismo que se hace crecer en un medio

106

de cultivo rico. En un aspecto, una interleuquina humana es una proteína IL-18, o una de sus variantes. En otro aspecto, el microorganismo es *E. coli*. En un aspecto, un medio de cultivo rico comprende peptona de fitona. En un aspecto, un medio de cultivo rico comprende extracto de levadura Bacto.

5 En otra realización de la presente invención, se proporciona un microorganismo sin expresión detectable de fago lambda infeccioso. En un aspecto, se suprime o altera la proteína estructural de la cápside del fago lambda, gpE, en un microorganismo. La supresión o alteración de una proteína se puede lograr de varias formas no limitantes. Se puede eliminar parcial o
10 completamente de un microorganismo un gen que codifica una proteína. Un gen que codifica una proteína se puede modificar genéticamente mediante técnicas no limitantes tales como mutación puntual o mutación aleatoria. Una proteína se puede escindir o modificar química o enzimáticamente para alterar su estructura o función. Se puede alterar o suprimir la expresión de un gen
15 regulador promotor para eliminar o reducir la expresión del gen. Se pueden regular las condiciones de la solución o temperatura para afectar a la estructura o función de la proteína. En un aspecto, un microorganismo es una *E. coli*. En otro aspecto un microorganismo comprende un gen de RNA-polimerasa de T7.

20 Los siguientes ejemplos ilustran diferentes aspectos de la invención. Estos ejemplos no limitan el alcance de esta invención que se define por las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

25 Se creó una cepa mejorada de la cepa BL21(DE3) de *E. coli* que no tiene expresión detectable de fago lambda infeccioso, por supresión de la expresión de una proteína estructural principal de la cápside del fago lambda, gpE. Esta cepa se usó en los Ejemplos presentados en la presente memoria.

30 Se amplificó por PCR un fragmento interno de 413 pares de bases de la región que codifica gpE usando la pareja de cebadores:

5' AGCTGGCCATTGCTCAGGTCTGAAG 3' (SAQ ID NO: 1)

5' GTACTGTCCGGAATACACGACGATG 3' (SAQ ID NO:2)

y DNA cromosómico de BL21(DE3) como molde. El fragmento resultante:

02

AGCTGGCCAT TGCTCAGGTC GAAGAGATGC AGGCAGTTTC TGCCGTGCTT AAGGGCAAAT
ACACCATGAC CGGTGAAGCC TTCGATCCGG TTGAGGTGGA TATGGGCCGC AGTGAGGAGA
ATAACATCAC GCAATCCGGC GGCACGGAGT GGAGCAAGCG TGACAAGTCC ACGTATGACC
CGACCGACGA TATCGAAGCC TACGCGCTGA ACGCCAGCGG TGTGGTGAAT ATCATCGTGT
TCGATCCGAA AGGCTGGGCG CTGTTCCGTT CCTTCAAAGC CGTCAAGGAG AAGCTGGATA
CCCGTCGTGG CTCTAATTCC GAGCTGGAGA CAGCGGTGAA AGACCTGGGC AAAGCGGTGT
CCTATAAGGG GATGTATGGC GATGTGGCCA TCGTCGTGTA TTCCGGACAG TAC
(SEQ ID NO:3)

5 producto de la amplificación por PCR, se clonó TA y se verificó la
secuencia usando técnicas patrón. Después, se introdujo una copia funcional
de un gen de resistencia al cloranfenicol en el sitio de EcoRV situado en el
centro y mostrado en negrita en la secuencia de gpE clonada. Después la
construcción del fragmento de gpE interrumpido con cloranfenicol se usó como
un vector knock-out de recombinación homóloga lineal para la supresión de la
expresión genética del gen de gpE de lambda (DE3) que reside en la cepa
hospedante BL21(DE3) de *E. coli*. El vector knock-out se introdujo en la célula
10 hospedante exactamente como describen Kirill A. Datsenko y Barry Wanner,
Proc. Natl. Acad. Sci USA 2000; 97:6640-6645, excepto que se usó el vector
descrito en la presente memoria. Se identificaron preliminarmente los knock-
outs para gpE putativos por la capacidad de crecimiento en presencia de
cloranfenicol 6 µg/ml, y posteriormente se confirmaron por análisis por PCR. Se
15 depositó uno de dichos knock-outs para gpE de BL21(DE3), con la designación
en GSK ECC-023.

Se ensayó en ECC-023 la presencia de partículas de fago infeccioso en
un ensayo de placa muy sensible. Como se muestra en la Tabla 1, el
BL21(DE3) padre, expresaba cantidades apenas detectables de fago cuando
20 no se inducía a hacerlo, aproximadamente 20 ufp, pero aproximadamente tres
órdenes de magnitud más cuando se inducía por la respuesta SOS al daño
genético (irradiación UV). Sin embargo, el derivado knock-out para gpE, ECC-
023, no producía ninguna prueba de fago infeccioso, incluso cuando se trató
de inducir la respuesta SOS. Los datos muestran que el derivado de
25 BL21(DE3), ECC-023, no produce ninguna partícula de fago infeccioso
detectable, y de acuerdo con esto es una cepa de célula hospedante adecuada
para la fabricación biofarmacéutica.

108

Tabla 1: Producción de partículas de fago Infeccioso de E. coli.

	UFP/ml	
	No inducido	Inducido por SOS
BL21(DE3)	21	10.000
ECC-023	0	0

Ejemplo 2

5 Este ejemplo muestra que cultivar células en un medio rico puede prevenir la formación de un aducto de 6-PGL de proteínas marcadas con His, comparado con el medio mínimo.

Se hizo crecer *E. coli* BL21(DE3) transformada con el plásmido pET28FabZSa, que codifica el gen para Hexa-His-FabZ, en MCJK (medio mínimo) o MCJKLB (medio rico) a 37°C, hasta que se alcanzó una DO₆₀₀ de 1,0. En la Tabla 2 se describen las composiciones de los medios para MCJK y MCJKLB.

Tabla 2: Composiciones de los medios para producir Hexa-His-FabZ

Componente	MCJK	MCJKLB
K ₂ HPO ₄	56 mM	56 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	38 mM	38 mM
MgSO ₄	5 mM	5 mM
CaCl ₂	1 mM	1 mM
Metales en trazas*	1 ml/l	1 ml/l
Glucosa	10 g/l	10 g/l
Extracto de levadura	nada	5 g/l
Triptona Bacto	nada	10 g/l
*Metales en trazas: FeCl ₂ 161 mM, Na ₂ MoO ₄ 2,7 mM, ZnSO ₄ 1,4 mM, MnCl ₂ 2,5 mM, CuSO ₄ 3,2 mM, CoCl ₂ 3,4 mM, y H ₃ BO ₃ 3,2 mM		

15 Se añadió isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido ("IPTG") con una concentración final 1 mM, y las células se mantuvieron a 37°C durante cuatro horas hasta la recolección. Las células se recogieron por centrifugación a 16.000 x g durante 10 min y se lisaron por agitación suave en Tris 10 mM, pH 8,0, Na₂EDTA 1 mM, lisozima 10 µg/ml y Benzonasa 25 U/ml (Sigma). Se separaron los restos celulares por centrifugación a 16.000 x g durante 10 minutos, y la proteína recombinante se purificó del extracto soluble con resina

109

Ni-NTA en modo discontinuo de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Qiagen Inc., Valencia, CA). Se analizó en las proteínas heterólogas la presencia de modificación con gluconolactona por análisis de LC/MS.

5 El polipéptido heterólogo MGSSH₄ con marcador de His se gluconoila en un nivel de 34% de la proteína recombinante total cuando el cultivo se lleva a cabo en medio mínimo (MCJK) como se muestra en la Tabla 3. Cuando el medio se complementa o se hace rico con extracto de levadura y triptona, la proteína gluconoilada no es detectable, como se muestra también en la Tabla 3. Por lo tanto, el uso de un medio más rico puede prevenir la formación del
10 aducto de 6-PGL.

Tabla 3: Efecto de medio mínimo frente a rico en la gluconollación de una proteína marcada con His expresada en *E. coli*

Vector	Extremo N	Inserto	% Modificado	Hospedante	Medio	Comentarios
pET28FabZSa	MGSSH ₄	FabZ	34%	BL21(DE3)	MCJK	medio mínimo
pET28FabZSa	MGSSH ₄	FabZ	No detectable	BL21(DE3)	MCJKLB	medio rico

Ejemplo 3

15 Este ejemplo demuestra que un resto de lisina interno de una quimioquina CXC recombinante (también conocida como Gro-beta-T) puede ser gluconoilado cuando se expresa en *E. coli*. Las secuencias del cDNA y de aminoácidos de Gro-beta-T humano se proporcionan en la solicitud de patente Internacional, Publicación nº WO 92/00327 (9 de Enero, 1992), así como en la
20 patente de EE.UU. nº 6.042.821 y patente de EE.UU. nº 6.413.510, incorporadas en la presente memoria en su totalidad como referencia.

La acumulación de proteína heteróloga durante la producción de una quimioquina CXC (Gro-beta-T) se siguió de forma rutinaria usando un ensayo de fase inversa de alta producción, cuantitativo. Esta separación se conectó
25 con un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo, de electropulverización ("ESI-TOF") y de alto rendimiento, para proporcionar un medio para seguir rutinariamente la formación de las variantes relacionadas con el producto.

Cuando se expresó en el hospedante *E. coli* BL21(DE3), sólo se observaron dos modificaciones del producto. La deconvolución de los
30 espectros de masas caracterizó las variantes que presentaban desplazamientos de masa de +178 Da y +258 Da comparadas con el producto

110

nativo a 7.542 Da.

El producto obtenido de estas fermentaciones se pasó por un procedimiento de purificación. Las muestras durante el procedimiento se caracterizaron usando un ensayo de fase inversa de alta resolución que puede resolver variantes minoritarias del producto. El análisis por cromatografía líquida-espectroscopía de masas ("LCMS") confirmó que las nuevas variantes del producto presentaban desplazamientos de masa de +258 Da (tiempo de retención ~14,8 min) y +178 Da (tiempo de retención ~15,2 min).

La bibliografía publicada indicaba que estos desplazamientos de masa de +178 Da y +258 Da se habían observado previamente en proteínas expresadas con marcadores de hexa-His, y que resultaban de la adición de 6-PGL o gluconolactona al resto N-terminal. La quinioquina CXC (Gro-beta-T) no se expresó usando un marcador de hexa-His. Además, la molécula no presenta ninguna región rica en histidina. Para confirmar que las especies estaban relacionadas con el producto, se aisló cada variante y se sometió a secuenciación N-terminal. La secuenciación confirmó la secuencia correcta del producto y aseguró que no había marcador de hexa-His.

Las variantes se sometieron a digestión con tripsina y cartografía del péptido. La comparación con los mapas de péptidos generados usando el producto patrón, puso de manifiesto dos nuevos picos en el mapa de tripsina, eluyendo el primer pico a 45,8 min (m/z 1094) y eluyendo el segundo pico a 46,5 min (m/z 1174). Los nuevos péptidos se aislaron y sometieron a secuenciación N-terminal que indicó que ambos tenían la misma secuencia (NIQSVKVK (SEQ ID NO:4)). La homología de la secuencia y la presencia de una diferencia de masa de 80 Da sugería que las especies diferían sólo en la presencia de fosforilación.

Se llevó a cabo espectrometría de masas LCMS del pico con m/z 1174. El experimento de MS/MS confirmó que el pico tiene una secuencia de NIQSVKVK (SEQ ID NO:4). Además, los iones fragmento de la serie y empezando por y_3 e incluyendo y_3 , y_4 , y_5 e y_6 mostraron un aumento de masa de 258 Da. Sin embargo, el ion y_2 no mostró el aumento de masa de 258 Da. Estos datos indicaban que la modificación estaba en la lisina (nº 23 en la secuencia) con aumento de masa de 258 Da.

Para confirmar que la modificación observada se debía a la gluconoilación del producto, se desarrollaron reacciones in vitro que usaban L-glucono-1,5-lactona o ácido galactónico reactivo. Los trabajos previos habían mostrado que estas especies podían inducir la adición de especies gluconoilo

241

al marcador hexa-His [Geohegan, et al.].

La quimioquina CXC (Gro-beta-T) purificada se intercambi6 con tamp6n en un tamp6n de TRIS a pH 8,0. Se a~adieron L-glucono-1,5-lactona o 6cido galact6nico en una concentraci6n 450 mM, y las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante veinte minutos. Ambas lactonas indujeron la misma modificaci6n de +178 Da de la quimioquina CXC observada durante la expresi6n en *E. coli*.

Ejemplo 4

Este ejemplo ilustra la gluconoilaci6n de los restos de lisina internos de una interleuquina humana recombinante (IL-18 humana) expresada en *E. coli*.

Se us6 HPLC de fase inversa de alta resoluci6n acoplada con espectrometría de masas ESI-TOF, para cribar los aductos de 6-PGL de un producto de interleuquina. El an6lisis de la interleuquina expresada en la cepa B dio una especie relacionada con el producto que presentaba una diferencia de masa de +178 Da. Puesto que la proteína se expres6 sin un marcador de hexa-His, era probable que la modificaci6n se produjera en un resto de lisina interno, como se había observado con la quimioquina CXC (véase el Ejemplo 3).

El an6lisis por HPLC de fase inversa de alta resoluci6n de la mol6cula de Interleuquina permiti6 la identificaci6n de m6ltiples especies del producto que presentaban desplazamientos de masa de +178 Da a RT de 21,0, 22,0, 23,0 minutos y una especie minoritaria adicional que presentaba un desplazamiento de +258 Da (RT ~27,5 minutos).

La modificaci6n in vitro de la interleuquina tambi6n se evalu6 con L-glucono-1,5-lactona a pH 8,0, como se ha descrito en el ejemplo previo. Esta reacci6n otra vez dio las mismas modificaciones de +178 Da observadas cuando se expresaba la interleuquina en la cepa B de *E. coli*.

Ejemplo 5

Este ejemplo muestra que cultivar c6lulas en medio rico previene la gluconoilaci6n o formaci6n de aducto de PGL de los restos de lisina internos de una proteína recombinante. En este estudio se compararon tres procedimientos de fermentaci6n discontinua alimentada. La diferencia entre los experimentos de fermentaci6n era el medio discontinuo y las composiciones de la alimentaci6n usadas durante la fase de producci6n. Se uso un medio rico en el Procedimiento I de fermentaci6n, mientras que los lotes segundo y tercero (Procedimientos II y III) se llevaron a cabo con un medio mínimo. Se us6 glicerol como medio de alimentaci6n en el Procedimiento I y II, mientras que se

usó glucosa en el Procedimiento III.

El procedimiento de fermentación para producir una interleuquina recombinante en *E. coli* se llevó a cabo en un modo discontinuo alimentado en un fermentador de 15 litros. La fermentación se inició como un procedimiento discontinuo. Se preparó el inóculo mediante transferencia aséptica de 0,5 ml de un cultivo madre en glicerol a 1000 ml de medio PYE en un matraz de 2,8 litros, como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición del medio de siembra para la expansión del inóculo en los fermentadores

Artículo	Concentración del medio discontinuo
Extracto de levadura	5 g/l
Peptona de fitona	10 g/l
Cloruro sódico	10 g/l
Dextrosa	10 g/l
Sulfato de kanamicina	50 mg/l

El cultivo se hizo crecer toda la noche a 27,5°C en un agitador rotatorio. Después el cultivo del matraz agitado se transfirió a un fermentador que contenía 5 litros de medio discontinuo. El medio de producción consta de sales, aminoácidos, y sulfato de kanamicina. Adicionalmente, el medio rico se complementa con altas concentraciones de extracto de levadura y peptona de fitona, como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5: Composición del medio de la etapa de producción para comparar medio rico frente a mínimo

Artículo	Concentración de medio discontinuo		
	Procedimiento I	Procedimiento II	Procedimiento III
Extracto de levadura	48 g/l	5,8 g/l	5,8 g/l
Peptona fitona	24 g/l	1,6 g/l	1,6 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	nada	5 g/l	5 g/l
NaCl	nada	1.3 g/l	1,3 g/l
Dextrosa	nada	nada	33,5 g/l
Glicerol	26 g/l	26 g/l	nada
K ₂ HPO ₄	15,3 g/l	6 g/l	6 g/l
KH ₂ PO ₄	1,7 g/l	3 g/l	3 g/l
Metales en trazas*	1 ml/l	1 ml/l	1 ml/l
MgSO ₄	5 mM	5 mM	5 mM
CaCl ₂	1 mM	1 nM	1 nM
Sulfato de kanamicina	30 mg/l	30 mg/l	30 mg/l
*Solución de metales en trazas: FeCl ₂ .6H ₂ O, 37,8 g/l; Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O, 0,7 g/l; ZnSO ₄ .7H ₂ O, 0,4 g/l; MnCl ₂ .4H ₂ O, 0,5 g/l; CuSO ₄ .5H ₂ O, 0,8 g/l; CoCl ₂ .6H ₂ O, 0,8 g/l; H ₃ BO ₃ , 0,2 g/l.			

5 El pH de cada medio se mantuvo a aproximadamente 7,3 usando hidróxido amónico. La temperatura se controló a aproximadamente 27,5°C. El medio de alimentación, glicerol o dextrosa se esterilizaron por separado y se conectaron asépticamente a un fermentador usando tubo de goma de silicona.

10 El suministro de medio de alimentación se inició cuando se redujo la cantidad del lote inicial en el cultivo. Un electrodo de oxígeno polarográfico seguía la presión de oxígeno disuelto en el fermentador. La velocidad de alimentación de carbono se controló en un modo de cascada para mantener constante la presión de oxígeno disuelto alrededor de 20%. La aireación se mantuvo a 10 l ptn/min y la presión a una sobrepresión de 0,49 kg/cm² de. Se usó una velocidad de agitación de 800 rpm desde el principio hasta el final del experimento de fermentación. A una DO₃₃₀ de aproximadamente 40 unidades, se inyectaron 100 ml de IPTG 1 mM en el cultivo para inducir la expresión génica recombinante.

El análisis por HPLC de fase inversa de las muestras recogidas 24 horas después de la adición de IPTG indicaban la reducción del nivel de

112

gluconolactona en el producto. La ausencia de aducto de 6-PGL en el Procedimiento I, y su presencia en el Procedimiento II y III, indica que el uso de medio rico, y la fuente de carbono sin glicerol, eran responsables de la eliminación del aducto de 6-PGL. La Tabla 6 resume los resultados del análisis.

Tabla 6. Análisis del aducto de fosfogluconolactona en tres procedimientos de fermentación para producir una Interleuquina recombinante.

Procedimiento nº	Aducto de fosfogluconolactona en Interleuquina humana (IL-18)
Procedimiento I	Ausente
Procedimiento II	Presente
Procedimiento III	Presente

Ejemplo 6

Este ejemplo muestra que la cepa K-12 de *E. coli* tiene actividad de pgl 100 veces mayor que la cepa B.

Se midió la actividad de 6-fosfogluconolactonasa en extractos de dos cepas diferentes con BL12(DE3) como madre, ECC005 y ECO880, y otras dos cepas originadas de un genotipo de K-12, ECO706 y ATG3995.

Para cultivar las cepas, en matraces de agitación de 2 litros que contenían 1 litro de medio PYE + glucosa al 1% y kanamicina 50 µg/ml, se inocularon 0,4 ml de suspensión celular de viales congelados. La incubación fue a 30°C con una agitación de 220 rpm durante 6 ó 7,5 horas. Se tomaron muestras en los puntos de tiempo indicados para medir la densidad óptica a 550 nm, y se recogieron sedimentos para medir la actividad de pgl. A continuación se presentan detalles del ensayo in vitro para medir la actividad de pgl.

La actividad de pgl se ensayó por fluorometría, a 340 nm y 25°C, en extractos sin células. Los extractos sin células se prepararon como se ha descrito previamente (Maitra and Lobo, *Journal of Biological Chemistry* 246: 475-488 (1971)); esencialmente con los mismos tampones de resuspensión, HEPES 50 mM pH 7,3 que contenía EDTA 5 mM y β-mercaptoetanol 5 mM, pero las células se rompieron por sonicación (5 ciclos de 20 s).

La pgl se ensayó usando un método previamente publicado (Sinha and Maitra *Journal of General Microbiology*, 1992; 138: 1865-1873) con algunas

115
150

modificaciones. El ensayo consistía en una preincubación de 1 ml de mezcla que contenía glucosa-6-fosfato 50 μ M, NADP⁺ 0,5 mM, y una unidad de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa en tampón de MES 100 mM, pH 6,5, que contenía KCl 25 mM y MgCl₂ 10 mM. Una vez que la reacción alcanzó la

5 meseta, se siguió por adición de 2 unidades de 6-fosfogluconato-deshidrogenasa, que dio como resultado un lento aumento de la absorbancia debido a la hidrólisis espontánea de la 6-PGL formada durante la etapa de preincubación. Cuando se añaden los extractos sin células, cualquier aumento significativo de la fluorescencia se debe a la actividad de

10 fosfogluconolactonasa. Todas las actividades de pgl se calcularon en el intervalo lineal del aumento de absorbancia después de la adición de extracto sin células.

La actividad enzimática se calculó restando la tasa de hidrólisis espontánea de la 6-PGL. Las actividades enzimáticas se expresaron en

15 mmoles de NADPH por minuto y por mg de proteína total. La proteína total se determinó por el ensayo de proteínas con ácido bicinconínico (BCA) (Pierce, Illinois, EE.UU.).

En las cepas basadas parentalmente en el genotipo de K-12, se ha detectado aumento de actividad de 100 veces más que en las cepas B.

20 La Tabla 7 resume los resultados de los ensayos enzimáticos en las dos familias de cepas.

116

Tabla 7: Actividad de fosfogluconolactonasa medida en cepas K-12 y B de E. coli.

CEPAS "K"		Cultivo	Actividad	Hidrólisis esp.
Cepa		Tiempo (h)	(mmoles de NADH/ min/mg de proteína)	(mmoles/min/mg de proteína)
ATCC 10798		5,5	1,061	0,0011
		6,5	2,899	0,0012
		7,5	2,584	0,0012
K-12 que expresa una interleuquina humana (IL-18)		7,5	3,539	0,0011
CEPAS "B"		Cultivo	Actividad	Hidrólisis esp.
Cepa		Tiempo (h)	(mmoles de NADH/ min/mg de proteína)	(mmoles/min/mg de proteína)
ATCC 47092		5,5	0,028	0,0012
BL21(DE3) que expresa una interleuquina humana (IL-18)		5,5	0,032	0,0012
		6,5	0,019	0,0011
		7,5	0,032	0,0012

Ejemplo 7

- 5
- Este ejemplo muestra que la expresión de un polipéptido heterólogo, una quimioquina CXC (conocida también como Gro-beta-T) en la cepa BL21 de *E. coli* da como resultado el aducto de 6-PGL, mientras que la expresión del mismo polipéptido en una cepa K-12 previene la gluconoilación de las lisinas internas.
- 10
- Se llevaron a cabo diez experimentos de fermentación usando cuatro cepas diferentes de *E. coli* construidas para la expresión recombinante de una quimioquina CXC. Este ejemplo demuestra el efecto de la familia del hospedante frente al sistema promotor en la presencia de formación de aducto de 6-PGL de la proteína recombinante usando dos sistemas de expresión con cada familia celular del hospedante. La Tabla 8 describe las cepas que se usaron.
- 15

117

Tabla 8: Familia del hospedante y sistemas promotores usados para expresar una quimioquina CXC en *E. coli*

Cepa nº	Familia del hospedante	Sistema promotor
1	BL21 (DE3)	polimerasa de T7
2	K-12(DE3)	polimerasa de T7
3	BL21 (DE3)	Lambda pL
4	K-12	Lambda pL

- La fermentación para producir la quimioquina CXC (Gro-beta-T) en *E. coli* se llevó a cabo en un modo discontinuo alimentado en un fermentador de 15 litros. La fermentación se inició como un procedimiento discontinuo. El inóculo se preparó por transferencia aséptica de 0,75 ml de un cultivo madre en glicerol a 100 ml de medio PYE a un matraz con tampón de 500 ml. El cultivo se hizo crecer durante 7 horas a 32,0°C en un agitador rotatorio.
- Después el cultivo del matraz agitado se mezcló con 1,0 litro de medio PYE y se transfirió a un fermentador que contenía 8,0 litros de medio discontinuo. El medio de producción constaba de sales y carbenicilina o sulfato de kanamicina dependiendo del promotor. Las formulaciones de los medios para la expansión de la semilla se proporcionan en la Tabla 9, y la formulación del medio para la producción de la quimioquina CXC en *E. coli* se proporciona en la Tabla 10.

Tabla 9: Formulación del medio para la expansión de la semilla.

Componente	Concentración
Extracto de levadura	5 g/l
Peptona de fitona	10 g/l
Cloruro sódico	10 g/l
Dextrosa	10 g/l
Sulfato de kanamicina	50 mg/l

118

Tabla 10: Formulación del medio para producir quilmloquina CXC en E. coli

Componente	Concentración
Sulfato amónico	5 g/l
Fosfato potásico, dibásico	6 g/l
Fosfato potásico, monobásico	3 g/l
Cloruro sódico	1,3 g/l
Dextrosa	18 g/l
Sulfato magnésico	4,8 g/l
Biotina	1 mg/l
Metales en trazas*	10 ml/l
Sulfato de kanamicina	50 mg/l
	o
Carbenicilina	25 mg/l
*Solución de metales en trazas: FeCl ₂ .6H ₂ O, 3,78 g/l; Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O, 0,7 g/l; ZnSO ₄ .7H ₂ O, 0,4 g/l; MnCl ₂ .4H ₂ O, 0,5 g/l; CuSO ₄ .5H ₂ O, 0,8 g/l; CoCl ₂ .6H ₂ O, 0,8 g/l; H ₃ BO ₃ , 0,2 g/l.	

El pH de cada medio se mantuvo aproximadamente a 7,0 usando hidróxido amónico. La temperatura se controló a aproximadamente 32,0°C y se aumentó a aproximadamente 37,5°C en la inducción. El medio de alimentación y la dextrosa se esterilizaron por separado y se conectaron asépticamente a un fermentador usando un tubo de goma de silicona.

El suministro de medio de alimentación se inició cuando se redujo la cantidad del lote inicial en el cultivo. Un electrodo de oxígeno polarográfico seguía la presión de oxígeno disuelto en el fermentador. La velocidad de alimentación de carbono se controló en un modo de cascada para mantener constante la presión de oxígeno disuelto alrededor de 25%. La aireación se mantuvo a 10 l ptn/min y la presión a una sobrepresión de aproximadamente 0,49 kg/cm². Se usó una velocidad de agitación de aproximadamente 400 rpm al principio y se aumentó según fuera necesario para mantener una presión de oxígeno disuelto de aproximadamente 25%. A una DO₅₅₀ de aproximadamente 14 unidades, se inyectaron 100 ml de IPTG 1,0 mM en el cultivo, o la temperatura se aumentó a 37,5°C para inducir la expresión génica recombinante.

Ninguno de los experimentos de fermentación usando una familia de

119

hospedante K-12 tenía formación de aducto de 6-PGL detectable en el polipéptido expresado de modo recombinante, mientras que los experimentos usando la cepa B junto con el promotor de T7 presentaban todos la presencia de formación de aducto de 6-PGL detectable en el polipéptido expresado de modo recombinante. Los tres experimentos usando la cepa B y el promotor de pL no tenían formación de aducto detectable. Estos datos demuestran que la expresión de una proteína recombinante en una cepa de hospedante que tiene actividad de pgl, por ejemplo, K-12, puede prevenir la formación de aducto de 6-PGL en proteínas recombinantes que son susceptibles a esta modificación, véase el Ejemplo 3. En la Tabla 11 se presenta la presencia de formación de aducto de 6-PGL en la quimioquina CXC expresada en las cepas B y K-12 de *E. coli* para cada fermentación.

Tabla 11: Presencia de aducto de 6-PGL en quimioquina CXC expresada por el promotor de T7 o pL en cepas B y K12 de *E. coli*.

Genotipo de la cepa	Promotor	Experimento nº	Aducto de gluconolactona 5 h después de inducción [% de pico del producto]
B	T7	1	21,7
		2	5,8
		3	4,2
		Media	10,6
K-12	T7	1	0
		2	0
		Media	0
B	pL	1	0
		2	0
		3	0
		Media	0
K-12	pL	1	0
		2	0
		Media	0

15

Ejemplo 8

Este ejemplo muestra que la expresión de un polipéptido heterólogo, interleuquina humana (IL-18), en la cepa BL21 de *E. coli* da como resultado la formación de aducto de 6-PGL, mientras que la expresión del mismo

120

polipéptido en una cepa K-12 prevendrá la 6-fosfogluconoilación de las lisinas internas.

Se construyeron cepas BL21(DE3) y K-12 de *E. coli* para expresar una interleuquina humana (IL-18). Los cultivos se hicieron crecer en medio mínimo como se describe en el Ejemplo. El seguimiento de la modificación del producto con 6-PGL se llevó a cabo en diferentes puntos de tiempo a lo largo del cultivo, usando métodos descritos en el Ejemplo.

Los resultados se expresan como proporciones de las áreas de los picos del producto sin modificar a producto modificado. Los números mayores indican una menor proporción de producto gluconoilado. Es evidente que el grado de gluconoilación en la cepa BL21 (DE3) es significativamente mayor que en la cepa K-12. La fosfogluconoilación de una interleuquina humana (IL-18) expresada en las cepas B y K-12 de *E. coli* se resume en la Tabla 12.

Tabla 12: Fosfogluconoilación de una interleuquina humana expresada en las cepas B y K-12 de *E. coli*.

Cepa de <i>E. coli</i>	Tiempo después de Inducción (h)	Proporción de áreas de producto no modificado a producto modificado
K-12	16	58,4
	18	44,5
	20	N/d
	22	29,3
	24	30,0
BL21 (DE3)	22	8,3
	24	7,7
N/d = producto modificado no detectable		

Ejemplo 9

Este ejemplo ilustra que la sobreexpresión de pgl heteróloga en células hospedantes de *E. coli* conduce a una mayor conversión metabólica de la 6-PGL en su producto 6-fosfogluconato, reduciendo así el depósito de 6-PGL disponible para la formación de aducto. Se clonó un gen de pgl de *P. aeruginosa* y se introdujo por ingeniería en un sistema de vector de expresión inducible basado en plásmido que es compatible con plásmidos basados en el origen de replicación colE1, de modo que se pueden mantener dos plásmidos diferentes en la misma célula hospedante. El nivel de expresión inducible de pgl de *P. aeruginosa* se puede regular a voluntad, de una forma independiente

121

de las rutas metabólicas endógenas de *E. coli* e independiente de la expresión inducible de la proteína recombinante de interés. De acuerdo con esto, la expresión de pgl recombinante se puede regular de modo que se disminuya el depósito de 6-PGL por debajo del nivel requerido para la formación de aducto, pero no en un grado en el que los recursos de la célula hospedante estén sustancialmente afectados. Por lo tanto, el nivel de la proteína recombinante deseada se puede regular por separado para dar niveles de expresión muy altos.

Clonación de pgl de *P. aeruginosa*

Se clonó la pgl de *P. aeruginosa* como sigue. Se obtuvo *P. aeruginosa* del American Type Culture Collection (American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville MD 20852-1776): *Pseudomonas aeruginosa*, cepa ATCC 27853. Los cebadores para la amplificación por PCR 5' y 3' se designaron y sintetizaron para dirigir la amplificación por PCR del gen de pgl entero, incluyendo la región justo corriente arriba del codón de iniciación ATG. Las secuencias de los cebadores para la amplificación homosen sentido y antisense son:

5' **GGCCTCGAGCTCGGTGGCCCTGGTGGCCC** 3' (SEQ ID NO:4)

y

5' **GCCCTCGAGTCCGCCACTCAGGGGTACCAAT** 3' (SEQ ID NO:5)

respectivamente. Las secuencias en negrita indican sitios XhoI introducidos en el gen para permitir las posteriores etapas de clonación.

Adicionalmente, se encontró que el gen de *P. aeruginosa* era muy rico en GC y no se amplificaba por PCR en las condiciones normales de amplificación. Se encontró que la amplificación por PCR requiere el uso de condiciones de amplificación por PCR que están optimizadas para moldes ricos en GC, específicamente Advantage-GC cDNA Polymerase Mix (cat. 8419-1; BD Biosciences Clontech: Palo Alto, CA; EE.UU.). La correspondiente secuencia de DNA de pgl (SEQ ID NO:7) que codifica el polipéptido de SEQ ID NO:8 se amplificó por PCR a partir de células completas de *P. aeruginosa* después de 25 ciclos a 94°C durante 30 segundos, seguido de 68°C durante 1,5 minutos. Después la amplificación se completó por una sola incubación a 68°C durante 3 minutos. El producto de la PCR se aisló por electroforesis en gel de agarosa y cromatografía en columna en un kit de extracción en gel QIAquick (cat. 28704, Qiagen: Valencia, CA; EE.UU.). El DNA de pgl purificado

122
[Handwritten signature]

en gel y amplificado, se eluyó en agua y se clonó inmediatamente en el vector de clonación pCR2.1 usando un kit TOPO TA Cloning® (cat. K4550-40, Invitrogen: Carlsbad, CA; EE.UU.) y se transformó en *E. coli* químicamente competente One Shot® TOP10 (cat. C4040-06, Invitrogen: Carlsbad, CA; EE.UU.). En las colonias amp^r resultantes se seleccionaron los insertos por digestión con EcoRI y se llevó a cabo electroforesis de los productos. Los insertos con secuencia verificada se liberaron del vector de clonación por digestión con XhoI y se purificaron usando el kit de extracción en gel QIAquick. El DNA del vector de expresión pECO-1 (BioCat 73552, GlaxoSmithKline: King of Prussia, PA; EE.UU.) se cortó con Sall y se trató con fosfatasa alcalina de intestino de ternero (CIP) (cat M0290S, New England Biolabs: Beverly, MA; EE.UU.), y después se purificó usando el kit de extracción en gel QIAquick. Los insertos digeridos con XhoI y el pECO-1 tratado con Sall, se ligaron usando DNA-ligasa de T4 esencialmente como describía el fabricante (cat. M0202S; New England Biolabs: Beverly, MA; EE.UU.). Dos microlitros (2 µl) de la reacción de ligazón se transformaron en células de *E. coli* químicamente competentes One Shot® TOP10 como describía el fabricante (cat. C4040-06; Invitrogen: Carlsbad, CA; EE.UU.). Las colonias se cribaron según la presencia de insertos de pgl en la orientación correcta por PCR. Se seleccionó el clon pECO-1pglcl2-13 para estudio posterior como se expone a continuación.

La construcción resultante se basa en la cadena principal del plásmido pACYC184, y comprende los siguientes elementos funcionales genéticos: (1) p15A ori, que permite el mantenimiento del episoma plasmídico en la misma célula hospedante que los plásmidos heterólogos con el elemento ori de tipo colE1; (2) marcador seleccionable de cloranfenicol^r; (3) un promotor inducible de tetraciclina corriente arriba de un sitio de clonación múltiple; (4) gen de la pgl de *P. aeruginosa* de longitud completa.

La construcción final, pECO-1pglcl2-13, se transformó como se ha descrito antes en células BL21 (DE3) que expresan una interleuquina humana, para el estudio posterior. La secuencia de DNA de pECO-1pglcl2-13 se presenta como el SEQ ID NO:9 y el mapa de restricción de pECO-1pglcl2-13 se presenta en la Figura 1.

Los cultivos se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 3. El análisis del aducto de 6-PGL se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 4. La actividad de fosfogluconolactonasa se midió como se describe en el Ejemplo 6. Entre las cepas adicionales que expresan la interleuquina humana (IL-18) examinadas en el estudio, se incluye BL21 (DE3) sin pECO-1pglcl2-13 y

123

K-12. Las cepas con el plásmido de *pgl* se examinaron con y sin adición de anhidrotetraciclina 20 ng/ml. Se expone un resumen de la presencia o ausencia de formación del aducto de 6-PGL en células que expresan *pgl* en la Tabla 13 mostrada a continuación.

5 **Tabla 13: Impacto de la expresión de *pgl* en la fosfogluconolación de una interleuquina humana**

Cepa	Actividad máxima de <i>pgl</i> UI/min/g de PCS	Formación de aducto de 6-PGL en la interleuquina humana (IL-18)
BL21 (DE3)	0,002	Presente
BL21 (DE3) pECO-1 <i>pgl</i> cl2- 13, sin tet	0,56 ± 0,13	Ausente
BL21 (DE3) pECO-1 <i>pgl</i> cl2- 13, tet inducido	0,64 ± 0,11	Ausente
K-12	0,96 ± 0,14	Ausente
PCS = peso de célula seca		

10 Este ejemplo ha demostrado que la coexpresión de fosfogluconolactonasa de *Pseudomonas* con la interleuquina humana (IL-18) previene satisfactoriamente la formación del aducto de 6-PGL en la cepa B de *E. coli*.

Ejemplo 10

15 La interleuquina-18 humana (IL-18) es una citoquina inmunomoduladora que se está desarrollando como un agente anticancerígeno para tratar carcinomas de células renales y melanomas malignos. Se presentan descripciones de la IL-18 humana y murina en las siguientes patentes de EE.UU.: Patente de EE.UU. nº 6.582.689, Patente de EE.UU. nº 5.914.253, Patente de EE.UU. nº 5.879.942, Patente de EE.UU. nº 5.912.324, Patente de EE.UU. nº 5.914.253, Patente de EE.UU. nº 6.060.283, Patente de EE.UU. nº 20 6.087.116, y Patente de EE.UU. nº 6.214.584, que se incorporan en la presente memoria en su totalidad como referencia. Se cree que la IL-18 estimula el sistema inmunitario, promueve la muerte de células tumorales inducida por Fas y la inmunidad mediada por célula. La secuencia polipeptídica de la IL-18 (SEQ ID NO:10) se puede producir en BL21 (DE3) de *E. coli*. Se 25 puede expresar a partir de la secuencia polinucleótida para pro-IL-18 (SEQ ID NO:11), que después es procesada a IL-18 madura por una enzima de

124

procesamiento, Caspasa 5, coexpresada en la misma célula.

Se clonó la 6-fosfonoglucolactonasa de bacterias Gram-negativas, *Pseudomonas aeruginosa*, en una cepa BL21 (DE3). La producción de IL-18 en esta cepa produce IL-18 sin formación de aducto detectable que da como resultado un aumento directo del rendimiento del producto deseado. Además, la corrección de la deficiencia de pgl también ha dado como resultado un aumento >10% de la productividad específica. Por lo tanto, el efecto combinado de la calidad del producto y las mejoras de la productividad específica mediante el uso de esta cepa de producción modificada se ha traducido en un aumento >25% del rendimiento de la concentración en la etapa de fermentación. Se espera que la eliminación de la formación de aducto tendrá un impacto positivo directo en el procedimiento de purificación y aumentará más el rendimiento global del procedimiento.

Ejemplo 11

La gluconoilación de la IL-18 se siguió por análisis por HPLC de la IL-18 producida en células BL21 (DE3) con y sin coexpresión de pgl. La formación de aducto se detectó como un hombro del pico que eluía aproximadamente dos minutos después de la IL-18 purificada. Cuando se expresó la IL-18 en y se purificó de la cepa BL21DE3 de *E. coli* (pgl negativo), el área del pico principal (es decir, el área del pico de la IL-18 que no tenía formación de aducto gluconoilo detectable) para la IL-18 era aproximadamente 56%. Mientras que la expresión y purificación de IL-18 en células BL21 (DE3) (pgl positivo) produjo un área del pico principal de aproximadamente 88%, y no mostró formación de aducto basándose en el ensayo por HPLC de alta resolución.

Ejemplo 12

Se crearon dos vectores que comprendían polinucleótidos que codifican pro-IL-18 (SEQ ID NO:11), y Caspasa 5 (SEQ ID NO:12). Ambos eran vectores pET en los que se indujo la producción de polipéptido usando un promotor de T7. Un vector también comprendía un polinucleótido que codifica pgl de *P. aeruginosa* (SEQ ID NO:7) que se indujo con el mismo promotor que para pro-IL-18. La secuencia entera del vector pET que comprende pro-IL-18 y Caspasa 5 se presenta en el SEQ ID NO:13. Se presenta un mapa de restricción de este vector en la Figura 2. La secuencia entera del vector pET que comprende pro-IL-18, Caspasa 5 y pgl se presenta en el SEQ ID NO:14. Se presenta un mapa de restricción de este vector en 3. Cuando se expresó la IL-18 en células BL21 (DE3) de *E. coli* usando estos vectores, la cantidad de IL-18 recuperable mejoró mucho cuando el polipéptido se coexpresó con pgl, comparado con la

123
X

expresión de IL-18 sin pgl. La cantidad de IL-18 recuperable obtenida de cada vector de expresión en células BL21 (DE3) de *E. coli* se presenta en la Tabla 14.

5 **Tabla 14: Concentración máxima de IL-18 producida en cepa "B" de *E. coli* con y sin coexpresión de pgl**

Cepa*	gen pgl	Concentración máxima (g/l)
RBB057	No	4,32 (+/- 0,4)
RBB059	Si	6,78 (+/-0,1)
*Ambas cepas son cepa B de <i>E. coli</i>		

10 Todas las publicaciones y referencias, incluyendo, pero sin limitar, las patentes y solicitudes de patente, citadas en esta memoria descriptiva se incorporan en la presente memoria en su totalidad como referencia, como si se indicara específica e individualmente que cada publicación o referencia individual se incorpora como referencia en la presente memoria como si se expusiera completamente. Cualquier solicitud de patente a la que esta solicitud reivindica prioridad se incorpora también como referencia en la presente memoria en su totalidad de la forma antes descrita para las publicaciones y referencias.

15

REIVINDICACIONES

126
26

1. Un método para prevenir la gluconoilación de un polipéptido expresado en un microorganismo, que comprende hacer crecer dicho
5 microorganismo en un medio de cultivo rico.

2. El método de la reivindicación 1, en el que el microorganismo no demuestra actividad significativa de 6-fosfogluconolactonasa cuando se hace crecer en un medio mínimo.

10

3. El método de la reivindicación 1, en el que el microorganismo es *E. coli*.

4. El método de la reivindicación 3, en el que la *E. coli* es una cepa B.

15

5. El método de la reivindicación 1, en el que el medio de cultivo rico comprende una fuente de nitrógeno complejo.

6. El método de la reivindicación 5, en el que el medio de cultivo rico es capaz de mantener un crecimiento celular con una relación de concentración de fuente de nitrógeno complejo a densidad celular 1:1.

20

7. El método de la reivindicación 5, en el que la fuente de nitrógeno complejo comprende triptona.

25

8. El método de la reivindicación 5, en el que la fuente de nitrógeno complejo comprende peptona.

9. El método de la reivindicación 5, en el que la fuente de nitrógeno complejo comprende extracto de levadura.

30

10. El método de la reivindicación 1, en el que el medio de cultivo es Superbroth.

11. El método de la reivindicación 10, en el que el medio Superbroth está doblemente concentrado.

35

127
~~109~~

- 39 -

12. El método de la reivindicación 1, en el que el microorganismo se transfecta con una molécula de DNA recombinante que codifica un polipéptido heterólogo.

5 13. Un método para prevenir la gluconoilación de un polipéptido expresado en *E. coli*, que comprende fermentar una variedad de cepa K de *E. coli* para expresar el polipéptido.

10 14. El método de la reivindicación 13, en el que la cepa K demuestra actividad de fosfogluconolactonasa 100 veces mayor comparada con la cepa B hecha crecer en las mismas condiciones.

15 15. El método de la reivindicación 14, en el que la cepa K es K-12.

15 16. Un método para prevenir la gluconoilación de polipéptidos expresados en un microorganismo, que comprende introducir DNA en el microorganismo, en el que el DNA codifica un polipéptido que demuestra actividad de 6-fosfogluconolactonasa.

20 17. El método de la reivindicación 16, en el que el microorganismo es *E. coli*.

25 18. El método de la reivindicación 16, en el que el DNA comprende DNA que codifica una enzima 6-fosfogluconolactonasa.

25 19. El método de la reivindicación 18, en el que el DNA que codifica la enzima 6-fosfogluconolactonasa tiene una identidad de secuencia de al menos 70% respecto al DNA que codifica la 6-fosfogluconolactonasa de *Pseudomonas*.

30 20. El método de la reivindicación 19, en el que la *Pseudomonas* es *P. aeruginosa*.

35 21. El método de la reivindicación 18, en el que el DNA que codifica la enzima 6-fosfogluconolactonasa tiene una identidad de secuencia de al menos 90% respecto al SEQ ID NO:7.

128
128

- 40 -

22. El método de la reivindicación 18, en el que el DNA que codifica la enzima 6-fosfogluconolactonasa tiene una identidad de secuencia de al menos 95% respecto al SEQ ID NO:7.

5 23. El método de la reivindicación 18, en el que la enzima 6-fosfogluconolactonasa tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90% respecto al SEQ ID NO:8.

10 24. El método de la reivindicación 18, en el que la enzima 6-fosfogluconolactonasa tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 95% respecto al SEQ ID NO:8.

15 25. El método de la reivindicación 18, en el que el DNA que codifica la enzima 6-fosfogluconolactonasa comprende la secuencia expuesta en el SEQ ID NO:7.

26. El método de la reivindicación 16, en el que el DNA es DNA recombinante.

20 27. El método de la reivindicación 16, en el que el DNA se transforma en el DNA genómico del microorganismo.

25 28. Un microorganismo capaz de prevenir la gluconoilación de polipéptidos.

29. El microorganismo de la reivindicación 28, en el que el microorganismo comprende DNA que codifica un polipéptido que demuestra actividad de 6-fosfogluconolactonasa.

30 30. El microorganismo de la reivindicación 28, en el que el microorganismo comprende DNA que codifica la 6-fosfogluconolactonasa.

35 31. El microorganismo de la reivindicación 28, en el que el DNA que codifica la 6-fosfogluconolactonasa tiene una identidad de secuencia de al menos 90% respecto al DNA que codifica una enzima 6-fosfogluconolactonasa de *Pseudomonas*, y en el que el microorganismo no es *Pseudomonas*.

129

- 5 32. El microorganismo de la reivindicación 28, en el que el DNA que codifica la 6-fosfogluconolactonasa tiene una identidad de secuencia de al menos 95% respecto al DNA que codifica una enzima 6-fosfogluconolactonasa de *Pseudomonas*, y en el que el microorganismo no es *Pseudomonas*.
33. El microorganismo de la reivindicación 31, en el que el DNA que codifica la 6-fosfogluconolactonasa es de *P. aeruginosa*.
- 10 34. El microorganismo de la reivindicación 28, en el que el microorganismo es una cepa de *E. coli*.
35. El microorganismo de la reivindicación 31, en el que el microorganismo es una cepa de *E. coli*, y en el que el DNA que codifica la 6-fosfogluconolactonasa se incorpora al genoma del microorganismo.
- 15 36. Un polinucleótido aislado que comprende un polinucleótido que tiene una identidad de al menos 90% respecto al polinucleótido expuesto en el SEQ ID NO:7.
- 20 37. El polinucleótido aislado de la reivindicación 36, que comprende un polinucleótido que tiene una identidad de al menos 90% respecto a un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende aminoácidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 90% respecto al SEQ ID NO:8.
- 25 38. El polinucleótido aislado de la reivindicación 36, en el que el DNA codifica una proteína que demuestra actividad de 6-fosfogluconolactonasa.
39. El polinucleótido aislado de la reivindicación 36, en el que la secuencia de DNA está expuesta en el SEQ ID NO:7.
- 30 40. El polinucleótido aislado de la reivindicación 36, en el que la secuencia de DNA tiene una identidad de secuencia de al menos 90% respecto al DNA que codifica la 6-fosfogluconolactonasa de *P. aeruginosa*.
- 35 41. El polinucleótido aislado de la reivindicación 35, que además comprende un polinucleótido que codifica la interleuquina-18 humana.

42. Un polinucleótido aislado, que comprende un polinucleótido que tiene una identidad de al menos 95% respecto al polinucleótido expuesto en el SEQ ID NO:7.

5 43. Un método para mejorar la formación de cristal del polipéptido, que comprende expresar dicho polipéptido de acuerdo con el método de la reivindicación 1.

10 44. Un método para mejorar la formación de cristal del polipéptido, que comprende expresar dicho polipéptido de acuerdo con el método de la reivindicación 16.

15 45. El método de la reivindicación 1, que además comprende mejorar la eficacia del crecimiento, en el que dicho polipéptido demuestra un mayor rendimiento de la concentración en la etapa de fermentación comparado con el polipéptido gluconilado.

20 46. El método de la reivindicación 16, que además comprende mejorar la eficacia del crecimiento, en el que dicho polipéptido demuestra un mayor rendimiento de la concentración en la etapa de fermentación comparado con el polipéptido gluconilado.

25 47. Un método de producción de una interleuquina humana, que comprende coexpresar dicha interleuquina humana en un microorganismo con una enzima que tiene actividad de 6-fosfogluconolactonasa ("pgl").

 48. El método de la reivindicación 47, en el que la interleuquina humana es IL-18.

30 49. El método de la reivindicación 47, en el que el microorganismo es *E. coli*.

35 50. El método de la reivindicación 49, en el que la pgl es codificada por un polinucleótido que se transforma en el genoma de dicha *E. coli*.

 51. Un método de producción de interleuquina humana, que comprende expresar dicha interleuquina humana en un microorganismo que se hace

131

crecer en un medio de cultivo rico.

52. El método de la reivindicación 51, en el que la interleuquina humana es IL-18.

5

53. El método de la reivindicación 51, en el que el microorganismo es *E. coli*.

54. El método de la reivindicación 51, en el que el medio de cultivo rico comprende peptona de fitona.

10

1

55. El método de la reivindicación 51, en el que el medio de cultivo rico comprende extracto de levadura bacto.

56. Un microorganismo completamente libre de expresión de fago lambda infeccioso.

15

57. El microorganismo de la reivindicación 56, en el que se suprime o altera la proteína estructural de la cápside del fago lambda, gpE.

20

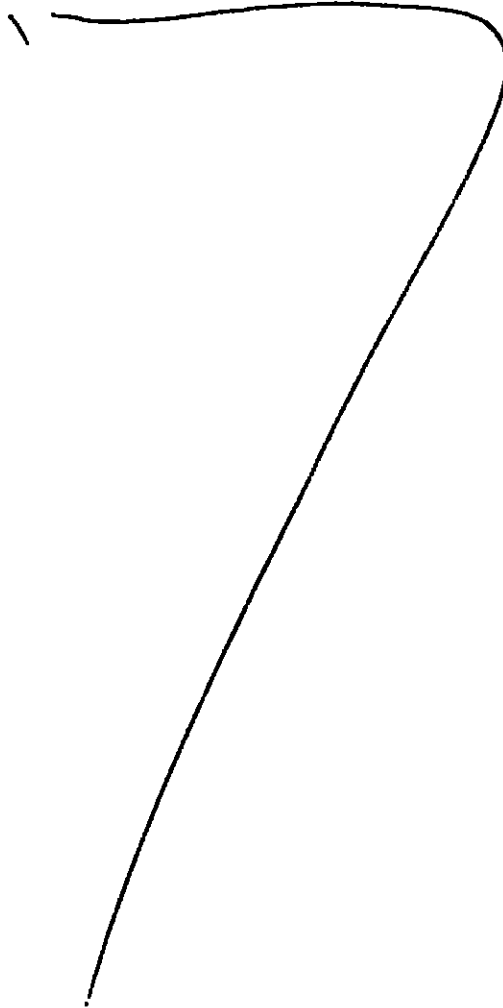
58. El microorganismo de la reivindicación 56, en el que el microorganismo es *E. coli*.

59. El microorganismo de la reivindicación 56, que comprende un gen de RNA-polimerasa de T7.

25

Resumen

La presente invención se refiere a métodos para prevenir la gluconoilación de polipéptidos producidos en microorganismos.



pECO-1-pgl-2-13

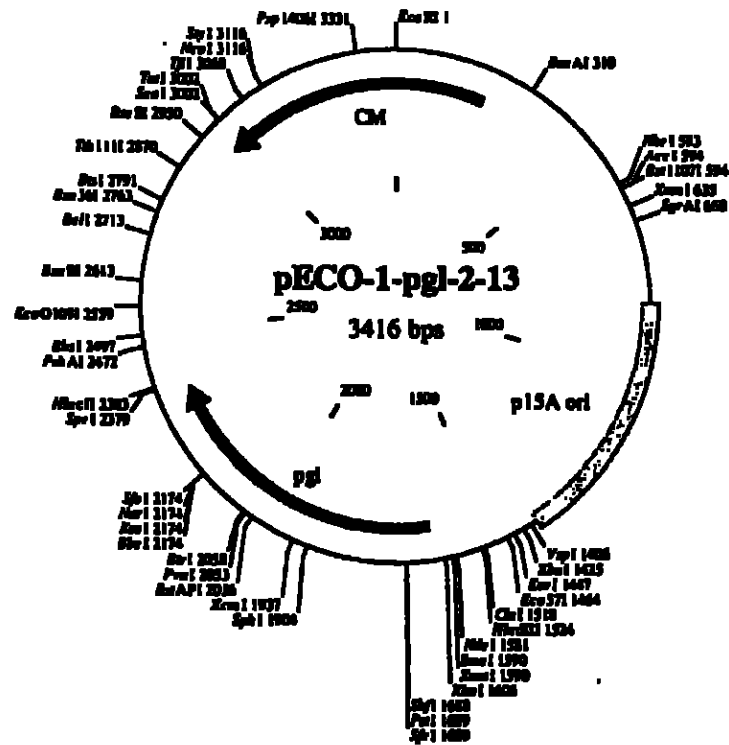


Figura 1

134

2/14

SEQ ID NO:9

DNA

pECO-1pg1c12-13

```
1 GAATTCGGGA TGAGCATTCA TCAGGCGGGC AAGAAATGTGA ATAAAGGCCG GATAAAACTT
61 GTGCTTATTT TTCTTTACGG TCTTTAAAAA GGCCGTAATA TCCAGCTGAA CGGTCCTGGT
121 ATAGGTACAT TGAGCAACTG ACTGAAATGC CTCAAAATGT TCTTTACGAT GCCATTGGGA
181 TATATCAACG GTGGTATATC CAGTGATTTT TTTCTCCATT TTAGCTTCCT TAGCTCCTGA
241 AAATCTCGAT AACTCAAAAA ATACGCCCGG TAGTGATCTT ATTTCAATTAT GGTGAAAGTT
301 GGAACCTCTT ACCTGCCGAT CAACGTCTCA TTTTCGCCAA AAGTTGGCCC AGGGCTTCCC
361 GGTATCAACA GGGACACCAG GATTTATTTA TTCTGCGAAG TGATCTTCCG TCACAGGTAT
421 TTATTCGGCG CAAAGTGGGT CGGGTGATGC TGCCAACTTA CTGATTTAGT GTATGATGGT
481 GTTTTGTAGG TGCTCCAGTG GCTTCTGTTT CTATCAGCTG TCCCTCCTGT TCAGCTACTG
541 ACGGGGTGGT GCGTAACGGC AAAAGCACCG CCGGACATCA GCGCTAGCGG AGTGTATACT
601 GGCTTACTAT GTTGCCACTG ATGAGGGTGT CAGTGAAAGT CTTCATGTGG CAGGAGAAAA
661 AAGGCTGCAC CGGTGCGTCA GCAGAATATG TGATACAGGA TATATTCCGC TTCCTCGCTC
721 ACTGACTCGC TACGCTCGGT CGTTCGACTG CGGCGAGCGG AAATGGCTTA CGAACGGGGC
781 GGAGATTTCC TGGAAAGATG CAGGAAGATA CTTAACAGGG AAGTGAGAGG GCCGCGGCAA
841 AGCCGTTTTT CCATAGGCTC CGCCCCCTG ACAAGCATCA CGAAATCTGA CGCTCAAATC
901 AGTGGTGGCG AAACCCGACA GGACTATAAA GATACCAGGC GTTTCGCCCT GCGGGCTCCC
961 TCGTGCCTC TCCTGTTCTT GCCTTTCGGT TTACCGGTGT CATTCGCTG TTATGGCCGC
1021 GTTTGTCTCA TTCCACGCCT GACACTCAGT TCCGGTAGG CAGTTCGCTC CAAGCTGAC
1081 TGTATGCACG AACCCCCCTT TCAGTCCGAC CGCTGCGCCT TATCCGGTAA CTATCGTCTT
1141 GAGTCCAACC CGGAAAGACA TCAAAAACA CCACTGGCAG CAGCCACTGG TAATTGATTT
1201 AGAGGAGTTA GTCTTGAAAT CATGCGCCGG TTAAGGCTAA ACTGAAAGGA CAAGTTTTGG
1261 TGACTGCGCT CCTCCAAACC AGTTACCTCG GTTCAAGAG TTGGTAGCTC AGAGAACCTT
1321 CGAAAAACCG CCTGCAAGG CGTTTTTTTC GTTTTCAGAG CAAGAGATTA CCGCGAGACC
1381 AAAACGATCT CAAGAAGATC ATCTTATTAA TCAGATAAAA TATTCTAGA TTTCAGTGCA
1441 ATTTATCTCT TCAAAATGAG CACCTGAAGT CAGCCCCATA CGATATAAGT TGTAAATCTC
1501 ATGTTTGACA GCTTATCATC GATAAGCTTT AATGCGGTAG TTTATCACAG TTAAATTGCT
1561 AACGCAGTCA GGCACCGTGT CATATGGATC CCGGGTACCG TCGAGCTCGA GCTCGGTGGC
1621 CCTGGTGGCC CCGGATGGGA GGAGTTGGTA TGGCGATTTT TGAGTTGAAG CTGCCGGCCG
1681 GCGTCGGCCT GCAGGTCTGG GGCAGCGCCG CCGAGCAGGC CCGCGGCCCT GCCGCCGAGG
1741 TCGCCGGCCG GTTGCCTCG GCGCTGCGCG AGCAGGGCCA GCGCTGCTG GTGTGTCCG
1801 GTGGGCGCAG TCCGGTGGCC TTCTCGAAG CCTTGAGCGA GGAGCCGCTG GACTGGTCCG
1861 GGATCACCGT CAGCCTGGCC GACGAGCGCT GGGTGCCGGA GTCGCATGCC GATAGCAACG
1921 CCGGCCTGGT TCGCCGCCAC CTGCTCCGTG GCGAGGCGGC GAAGGCGCGC TTCATCGGCC
1981 TCTACCAGCC GCGGCGGAGC CTGGAGGAAG CGGCCGAGCT GGCCGACCAT CACCTGCACG
2041 AGCTGCCATT GCCGATCGAC GTGCTGGTCC TCGGCATGGG CGACGACGGC CATACCGCCT
2101 CGCTGTTCCC GAACAGCCCT GGCTGGGACC TGGCGATGGA TCCCCAGGGG ACGCGCCGTT
2161 GCCTGCCGAT GTGGGCGCCG AGCGTGCGGC ACCAGCGCCT GACCTGCGG CGCGCGGTGC
2221 TGCGGCGGCG GAAGGTGCAG CTGCTGGCGA TCCAAGGCCA GTCCAAGCTG GCCACCTGA
2281 ACGCCGCGCT GCGGTCGAG GACGAACGGC GATGCGCGT TCGCGCCTTC CTCCGCGCGC
```

135

3/14

2341 CGCTGACGAT CCATTGGTAC CCCTGAGTGG CGGACTCGAC TAGTCAACGC CATGAGCGGC
2401 CTCATTTCTT ATTCTGAGTT ACAACAGTCC GCACCGCTGT CCGGTAGCTC CTTCCGGTGG
2461 GCGCGGGGCA TGACTATCGT CGCCGCACTT ATGACTGTCT TCTTTATCAT GCAACTCGTA
2521 GGACAGGTGC CGGCAGCGCC CAACAGTCCC CCGGCCACGG GGCCTGCCAC CATACCCACG
2581 CCGAAACAG CGCCCTGCAC CATTATGTTT CGGATCTGCA TCGCAGGATG CTGCTGGCTA
2641 CCCTGTGGAA CACCTACATC TGTATTAACG AAGCGCTAAC CGTTTTTATC AGGCTCTGGG
2701 AGGCAGAATA AATGATCATA TGTCAATTA TTACCTCCAC GGGGAGAGCC TGAACAACT
2761 GGCCTCAGGC ATTTGAGAAG CACACGGTCA CACTGCTTCC GGTAGTCAAT AAACCGGTAA
2821 ACCAGCAATA GACATAAGCG GCTATTTAAC GACCCTGCCC TGAACCGAGC ACCGGGTGGA
2881 ATTTGCTTTC GAATTTCTGC CATTCAATCG CTTATTATCA CTTATTGAGG CGTAGCACCA
2941 GGCCTTTAAG GGCACCAATA ACTGCCTTAA AAAAATTAGG CCCC GCCCTG CCACTCATCG
3001 CAGTACTGTT GTAATTCATT AAGCATTCTG CCGACATGGA AGCCATCACA GACGGCATGA
3061 TGAACCTGAA TCGCCAGCGG CATCAGCACC TTGTGCGCTT GCGTATAATA TTTGCCCCATG
3121 GTGAAAACGG GGGCGAAGAA GTTGTCCATA TTGGCCACGT TTAAATCAAA ACTGGTGAAA
3181 CTCACCCAGG GATTGGCTGA GACGAAAAAC ATATTCTCAA TAAACCCPTT AGGGAAATAG
3241 GCCAGGTTTT CACCGTAACA CGCCACATCT TGCGAATATA TGTGTAGAAA CTGCCGGAAG
3301 TCGTCTGTGT ATTCACTCCA GAGCGATGAA AACGTTTCAG TTTGCTCATG GAAAACGGTG
3361 TAACAAGGGT GAACACTATC CCATATCACC AGCTCACCGT CTTTCATTGC CATACG

Figure 2

136

4/14

pET28ProL18Casp5

5

Figura 3

SEQ ID NO:13

DNA

pET28ProIL18Casp5

1 TGGCGAATGG GACGCGCCCT GTAGCGGCGC ATTAAGCGCG GCGGGTGTGG TGGTTACGCG
61 CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT CCTTCGCTT TCTTCCCTTC
121 CTTTCTCGCC ACGTTCGCCG GCTTTCGCCG TCAAGCTCTA AATCGGGGGC TCCCTTTAGG
181 GTTCCGATTT AGTGCTTTAC GGCACCTCGA CCCCCAAAAA CTTGATTAGG GTGATGGTTC
241 ACGTAGTGGG CCATCGCCCT GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTTGG AGTCCACGTT
301 CTTTAATAGT GGACTCTTGT TCCAAACTGG AACAACTC AACCTATCT CGGTCTATTC
361 TTTTGATTTA TAAGGGATT TGCCEATTTC GGCCTATTGG TTAATAAATG AGCTGATTTA
421 ACAAAAATTT AACGCGAATT TTAACAAAT ATTAACGTTT ACAATTTTCAG GTGGCACTTT
481 TCGGGGAAAT GTGCGCGGAA CCGCTATTTC TTATTTTTC TAAATACATT CAAATATGTA
541 TCCGCTCATG AATTAAATCT TAGAAAACT CATCGAGCAT CAAATGAAAC TGCAATTTAT
601 TCATATCAGG ATTATCAATA CCATATTTTT GAAAAAGCCG TTTCTGTAAT GAAGGAGAAA
661 ACTCACCGAG GCAATTCCAT AGGATGGCAA GATCCTGGTA TCGGTCTGCG ATTCCGACTC
721 GTCCAACATC AATACAACCT ATTAATTTCC CCTCGTCAAA AATAAGGTTA TCAAGTGAGA
781 AATCACCATG AGTGACGACT GAATCCGGTG AGAATGGCAA AAGTTTATGC ATTTCTTTCC
841 AGACTTGTTT AACAGGCCAG CCAATACGCT CGTCATCAAA ATCACTCGCA TCAACCAAAC
901 CGTTATTTCAT TCGTGATTGC GCCTGAGCGA GACGAAATAC GCGATCGCTG TTAAGGAC
961 AATTACAAAC AGGAATCGAA TGCAACCGGC GCAGGAACAC TGCCAGCGCA TCAACAATAT
1021 TTTCACCTGA ATCAGGATAT TCTTCTAATA CCTGGAATGC TGTTTTCCCG GGGATCGCAG
1081 TGGTGAGTAA CCAATGCATCA TCAGGAGTAC GGATAAATG CTTGATGOTC GGAAGAGGCA
1141 TAAATTCGCT CAGCCAGTTT AGTCTGACCA TCTCATCTGT AACATCATG GCAACGCTAC
1201 CTTTGCCATG TTTCAGAAAC AACTCTGGCG CATCGGGCTT CCCATACAAAT CGATAGATTG
1261 TCGCACCTGA TTGCCCCGCA TTATCGCGAG CCCATTTATA CCCATATAAA TCAGCATCCA
1321 TGTTGGAATT TAATCGCGGC CTAGAGCAAG ACGTTTCCCG TTGAATATG CTCATAACAC
1381 CCCTTGATTT ACTGTTTATG TAAGCAGACA GTTTTATTGT TCATGACCAA AATCCCTTAA
1441 CGTGAGTTT CGTTCACAG AGCGTCAGAC CCGTAGAAA AGATCAAAGG ATCTTCTTGA
1501 GATCCTTTTT TTCTGCGCGT AATCTGCTGC TTGCAACAA AAAAAACCAC GCTACCGCG
1561 GTGGTTTGT TTGCGGATCA AGAGCTACCA ACTCTPTTTC CGAAGGTAAC TGGCTTCAGC
1621 AGAGCGCAGA TACCAATAC TGTCTTCTA GTGTAGCCGT AGTTAGGCCA CCACTTCAAG
1681 AACTCTGTAG CACCGCTTAC ATACCTCGCT CTGCTAATCC TGTTACCAAT GGCTGCTGCC
1741 AGTGGCGATA AGTCGTGTCT TACCGGTTG GACTCAAGAC GATAGTTACC GGATAAGGCG
1801 CAGCGGTCCG GCTGAACGGG GGGTTCGTGC ACACAGCCCA GCTTGGAGCG AACGACCTAC
1861 ACCGAACTGA GATACCTACA GCGTGAGCTA TGAGAAAGCG CCACGCTTCC CGAAGGGAGA
1921 AAGGCGGACA GGTATCCGCT AAGCGGCAGG GTCGGAACAG GAGAGCGCAC GAGGGAGCTT
1981 CCAGGGGAA ACGCCTGGTA TCTTTATAAT CCTGTGGGT TCGCCACCT CTGACTTGAG
2041 CGTCGATTTT TGTGATGCTC GTCAGGGGGG CGGAGCCTAT GGAAAAACGC CAGCAACGGG
2101 GCCTTTTTAC GGTTCCTGGC CTTTGTCTGG CCTTTTCTC ACATGTTCTT TCCTGCGTTA
2161 TCCCTGATTT CTGTGGATAA CCGTATTACC GCCTTTGAGT GAGCTGATAC CGCTCGCCGC
2221 AGCCGAACGA CCGAGCGCAG CGAGTCACTG AGCGAGGAAG CGGAAGAAGC CCTGATCGCG
2281 TATTTCTTCC TTACGCATCT GTGCGGTATT TCACACCGCA TATATGGTGC ACTCTCAGTA

130

6/14

2341 CAATCTGCTC TGATGCCGCA TAGTTAAGCC AGTATACACT CCGCTATCGC TACGTGACTG
2401 GGTCAATGGCT GCGCCCCGAC ACCCGCCAAC ACCCGCTGAC GCGCCCTGAC GGGCTTGTCT
2461 GCTCCCCGCA TCCGCTTACA GACAAGCTGT GACCGTCTCC GGGAGCTGCA TGTGTCAAG
2521 GTTTTCACCG TCATCACCBA AACGCGCGAG GCAGCTGCGG TAAAGCTCAT CAGCGTGGTC
2581 GTGAAGCGAT TCACAGATGT CTGCTGTTC ATCCGCGTCC AGCTCGTTGA GTTTCTCCAG
2641 AAGCGTTAAT GTCTGGCTTC TGATAAAGCG GGCCATGTTA AGGGCGGTTT TTTCTGTTT
2701 GGTCACTGAT GCCTCCGTGT AAGGGGATT TCTGTTCATG GGGGTAATGA TACCGATGAA
2761 ACGAGAGAGG ATGCTCACGA TACGGGTAC TGATGATGAA CATGCCCCGT TACTGGAACG
2821 TTGTGAGGGT AAACAACTGG CGGTATGGAT GCGGCGGGAC CAGAGAAAAA TCACTCAGGG
2881 TCAATGCCAG CGCTTCGTTA ATACAGATGT AGGTGTTCGA CAGGGTAGCC AGCAGCATCC
2941 TCGATGCGAG ATCCGGAACA TAATGTGCA GGGCGCTGAC TTCCGCGTTT CCAGACTTTA
3001 CGAAACACGG AAACCGAAGA CATTTCATGT TGTGCTCAG GTGCGAGACG TTTTGCAGCA
3061 GCAGTGCGTT CACGTTGCT CCGGTATCGG TGATTCAATC TGCTAACCG TAAGGCAACC
3121 CCGCCAGCCT AGCCGGGTCC TCAACGACAG GAGCAGATC ATGCGCACCC GTGGGGCCGC
3181 CATGCCGGCG ATAATGGCT GCTTCTGCGG GAAACGTTTG GTGGCGGGAC CAGTGACGAA
3241 GGCTTGAGCG AGGGCGTGCA AGATTCCGAA TACCGCAAGC GACAGGCCGA TCATCGTCGC
3301 GCTCCAGCGA AAGCGGTCTT CCGCGAAAAT GACCCAGAGC GCTGCGCGCA CCTGTCTTAC
3361 GAGTTGCATG ATAAAGAAGA CAGTCATAAG TGCGGCGAGG ATAGTCATGC CCCGCGCCCA
3421 CCGGAAGGAG CTGACTGGGT TGAAGGCTCT CAAGGGCATC GGTGAGATC CCGGTGCCTA
3481 ATGAGTGAGC TAACTTACAT TAATTGCTT GCGCTCACTG CCCGCTTTCC AGTCGGGAAA
3541 CCTGTGCTGC CAGCTGCATT AATGAATCGG CCAACGCGCG GGGAGAGGCG GTTTGCGTAT
3601 TGGGCGCCAG GGTGGTTTTT CTTTTCACCA GTGAGACGGG CAACAGCTGA TTGCCCTTCA
3661 CCGCTGCGC CTGAGAGAGT TGCAGCAAGC GGTCCACGCT GGTTTGCCCC AGCAGGCGAA
3721 AATCCTGTTT GATGGTGGTT AACGGCGGGA TATAACATGA GCTGTCTTCG GTATCGTCT
3781 ATCCCACTAC CGAGATATCC GCACCAACGC GCAGCCCGGA CTCGGTAATG GCGCGCATTC
3841 CCGCCAGCGC CATCTGATCG TTGGCAACCA GCATCGCAGT GGGAACGATG CCTCATTTCA
3901 GCATTTGCAT GGTTTGTGGA AAACCGGACA TGGCACTCCA GTGCGCTTCC CGTTCCGCTA
3961 TCGGTGAAT TTGATTGCGA GTGAGATATT TATGCCAGCC AGCCAGACGC AGACGCGCG
4021 AGACAGAACT TAATGGGCCC GCTAACAGCG CGATTTGCTG GTGACCCAAT GCGACCAGAT
4081 GCTCCAGGCC CAGTCCGCTA CCGTCTTCAT GGGAGAAAAT AATACTGTTG ATGGGTGTCT
4141 GGTCAAGAGC ATCAAGAAAT AACGCCGGA CATTAGTGCA GGCAGCTTCC ACAGCAATGG
4201 CATCTGGTC ATCCAGCGGA TAGTTAATGA TCAGCCCACT GACCGCTTC GCGAGAAGAT
4261 TGTGCACCGC CGCTTTACAG GCTTCGACGC CGCTTCGTTT TACCATCGAC ACCACCAGC
4321 TGGCACCCAG TTGATCGGCG CAGATTAA TCGCCGCGAC AATTTCCGAC GCGCGGTGCA
4381 GGGCCAGACT GAGGTGGCA AGCCCAATCA GCAACGACTG TTTGCCCGCC AGTTGTGTG
4441 CCACGCGGTT GGAATGTAA TTCAGCTCCG CCATCGCCGC TTCCACTTTT TCCCGGTTT
4501 TCGCAGAAAC GTGCTGGCC TGGTTACCA CGCGGGAAC GGTCTGATAA GAGACACCGG
4561 CATACTCTGC GACATCGTAT AACGTTACTG GTTTCACATT CACCACCTG AATTGACTCT
4621 CTTCCGGGCG CTATCATGCC ATACCGCGAA AGGTTTTGCG CCATTCGATG GTGTCCGGA
4681 TCTCGACGCT CTCCTTATG CCACTCTGC ATTAGGAAGC AGCCAGTAG TAGGTTGAGG
4741 CCGTTGAGCA CCGCCCGCGC AAGGAATGTT GCATGCAAGG AGATGGCGCC CAACAGTCCC
4801 CCGGCCACGG GGCCTGCCAC CATACCACAG CCGAAACAAG CGCTCATGAG CCCGAAGTGG

131

4861 CGAGCCCGAT CTTCCCCATC GGTGATGTCG GCGATATAAG CGCCAGCAAC CGCACCTGTG
4921 GCGCCGGTGA TGCCGGCCAC GATGCGTCCG GCGTAGAGGA TCGAGATCTC GATCCCGCGA
4981 AATTAATACG ACTCACTATA GGGGAATTGT GAGCGGATAA CAATTCCCCT CTAGACCACA
5041 CCTTAAGGAG GATATAACAT ATGGCTGCTG AACCAGTAGA AGACAATTGC ATCAACTTTG
5101 TGGCAATGAA ATTTATTGAC AATACGCTTT ACTTTATAGC TGAAGATGAT GAAAACCTGG
5161 AATCAGATTA CTTTGCCAAG CTTGAGAGCA AACTATCGGT CATTCGTAAT TTAAATGACC
5221 AGGTCCTATT TATCGACCAA GGAATCGTC CACTATTGGA GGACATGACA GACAGTGAAT
5281 GCGGAGACAA TGCGCCGCGA ACCATTTTCA TTATATCTAT GTACAAGGAT TCTCAGCCGC
5341 GCGGAATGGC CGTAACTATT TCTGTCAAAT GTGAAAAGAT ATCCACGCTG TCGTGTGAGA
5401 ACAAGATTAT TAGTTTCAAA GAGATGAATC CGCCGGATAA TATCAAGGAC ACGAAGTCTG
5461 ATATCATATT TTTCCAGCGC AGCGTGCCGG GGCACGATAA CAAGATGCAA TTTGAATCAT
5521 CCAGCTATGA AGGCTACTTT CTTGATGCG AGAAGGAACG CGATCTCTTT AAACCTATTT
5581 TAAAGAAAGA GGACGAGCTA GCGGATCGCA GCATTATGTT CACTGTCCAA AATGAAGACT
5641 AGTGAAGGAT ATANTACCAG GAATAAATAA AATCCATGGG CCATCATCAT CATCATCATG
5701 GCATACTCAA ACTTTGTCTT CGTGAAGAAT TCCTGAGACT GTGTAAAAAA AATCATGATG
5761 AGATCTATCC AATAAAAAAG AGAGAGGACC GCAGACGCCT GGCTCTCATC ATATGCAATA
5821 CAAAGTTTGA TCACCTGCTT GCAAGGAATG GGGCTCACTA TGACATCGTG GGGATGAAAA
5881 GGCTGCTTCA AGGCCTGGGC TACACTGTGG TTGACGAAAA GAATCTCACA GCCAGGGATA
5941 TGGAGTCAGT GCTGAGGACA TTTGCTGCCA GACCAGAGCA CAAGTCTCTT GACAGCACGT
6001 TCTTGGTACT CATGTCTCAT GGCATCCTAG AGGGAATCTG CGGAAGTGGG CATAAAAAGA
6061 AAAAACCGGA TGTGCTGCTT TATGACACCA TCTTCCAGAT ATTCAACAAC CGCAACTGCC
6121 TCAGTCTAAA GGACAAACCC AAGGTCTATCA TTGTCCAGGC CTGCAGAGGT GAAAAACATG
6181 GGGAACTCTG GFTCAGAGAC TCTCCAGCAT CCTTGGCAGT CATCTCTTCA CAGTCATCTG
6241 AGAACCTGGA GGCAGATTCT GTTTGCAAGA TCCACGAGGA GAAGGACTTC ATTGCTTTCT
6301 GTTCTTCAAC ACCACATAAC GTGTCTCTGA GAGACCGCAC AAGGGGCTCC ATCTTCATTA
6361 CGGAAGTCAT CACATGCTTC CAGAAATATT CTTGCTGCTG CCACCTAATG GAAATATTTT
6421 GGAAGGTACA GAAATCATTT GAAGTTCCAC AGGCTAAAGC CCAGATGCCC ACCATAGAAC
6481 GAGCAACCTT GACAAGAGAT TTCTACCTCT TTCTGGCAA TTGACTCGAG CACCACCACC
6541 ACCACCCTG AGATCGGCT GCTAACAAAG CCCGAAAGGA AGCTGAGTTG GCTGCTGCCA
6601 CCGCTGAGCA ATAACTAGCA TAACCCCTTG GGGCTCTAA ACGGGTCTTG AGGGGTTTTT
6661 TGCTGAAAGG AGGAAGTATA TCCGGGT

Figura 4

~~140~~
140

8/14

pET28proIL18casp5+pgl

5

Figura 5

X
141

SEQ ID NO:14

DNA

pET28proIL18casp3+pgl

1 TGGCGAATGG GACGCGCCCT GTAGCGGCGC ATTAAGCGCG GCGGGTGTGG TGGTTACGGG
61 CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT CCTTTCGCTT TCTTCCCTTC
121 CTTTCTCGCC ACGTTCGCGG GCTTTCGCCG TCAAGCTCTA AATCGGGGGC TCCCTTTAGG
181 GTTCCGATTT AGTGCTTTAC GGCACCTCGA CCCCCAAAAA CTTGATTAGG GTGATGGTTC
241 ACGTAGTGGG CCATCGCCCT GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTGGG AGTCCACGTT
301 CTTTAATAGT GGA CTCTTGT TCCAAACTGG AACAACTC AACCTTATCT CGGTCTATTCT
361 TTTTGATTTA TAAGGGATTT TGCCGATTTT GGCCTATTGG TTA AAAAATG AGCTGATTTA
421 AAAAAATTT AACGCGAATT TTAACAAAT ATTAACGTTT ACAATTTTCA GGTGGCACTTT
481 TCGGGGAAAT GTGCGCGGAA CCCCATTTTG TTTATTTTTC TAAATACATT CAAATATGTA
541 TCCGCTCATG AATTAATCT TAGAAAACT CATCGAGCAT CAAATGAAAC TGCAATTTAT
601 TCATATCAGG ATTATCAATA CCATATTTTT GAAAAAGCGG TTTCTGTAAAT GAAGGAGAAA
661 ACTCACCAGG GCAGTTCCAT AGGATGGCAA GATCCTGGTA TCGGTCTGCG ATTCCGACTC
721 GTCCAACATC AATACAACCT ATTAATTTCC CCTCGTCAA AATAAGGTTA TCAAGTGAGA
781 AATCACCATG AGTGACGACT GAATCCGGTG AGAATGGCAA AAGTTTATGC ATTTCTTTCC
841 AGACTTGTTC AACAGGCCAG CCATTACGCT CGTCATCAA ATCACTCGCA TCAACCAAAC
901 CGTTATTCTAT TCGTGATTGC GCCTGAGCGA GACGAAATAC GCGATCGCTG TTAAGAGGAC
961 AATTACAAAC AGGAATCGAA TGCAACCGGC GCAGGAACAC TGCCAGCGCA TCAACAATAT
1021 TTTCACCTGA ATCAGGATAT TCTTCTAATA CCTGGAATGC TGTTTTCCCG GCGATCGCAG
1081 TGGTGAGTAA CCATGCATCA TCAGGAGTAC GGATAAAATG CTTGATGGTC GGAAGAGGCA
1141 TAAATCCGT CAGCCAGTTT AGTCTGACCA TCTCATCTGT AACATCATG GCACCGCTAC
1201 CTTTGCCATG TTTCAGAAAC AACTCTGGCG CATCGGGCTT CCCATACAAT CGATAGATTG
1261 TCACACCTGA TTGCCCGACA TTATCGCGAG CCCATTTATA CCCATATAAA TCAGCATCCA
1321 TGTGGAATT TAATCGCGGC CTAGAGCAAG ACGTTTCCCG TTGAATATGG CTCATAACAC
1381 CCCTTGATTT ACTGTTTATG TAAGCAGACA GTTTTATTGT TCATGACCAA AATCCCTTAA
1441 CGTGAGTTTT CTTTCCACTG AGCGTCAGAC CCCGTAGAAA AGATCAAAGG ATCTTCTTGA
1501 GATCCTTTTT TTCTGCGCGT AATCTGCTGC TTGCAACAA AAAAACCACC GCTACCAGCG
1561 GTGCTTTGTT TCCCGGATCA AGAGCTACCA ACTCTTTTTC CGAAGGTAACT TGGCTTCAGC
1621 AGAGCGCAGA TACCAAATAC TGTCTTCTA GTGTAGCCGT AGTTAGGCCA CCACTTCAAG
1681 AACTCTGTAG CACCGCCTAC ATACCTCGCT CTGCTAATCC TGTTACCAOT GCGTCTGCC
1741 AGTGGCGATA AGTCGTGTCT TACCGGTTG GACTCAAGAC GATAGTTACC GGATAAGGCG
1801 CAGCGGTCCG GCTGAACGGG GGGTTCGTGC ACACAGCCCA GCTTGGAGCG AACGACCTAC
1861 ACCGAACTGA GATACCTACA GCGTGAGCTA TGAGAAAGCG CCACGCTTCC CGAAGGGAGA
1921 AAGGCGGACA GGTATCCGGT AAGCGGCAGG GTCGGAACAG GAGAGCGCAC GAGGAGCTT
1981 CCAGGGGGAA ACGCTTGGTA TCTTTATAGT CCTGTCTGGT TCGCCACCT CTGACTTGAG
2041 CGTCGATTTT TGTGATGCTC GTCAGGGGGG CGGAGCTTAT GGAAAAACGC CAGCAACGCG
2101 GCCTTTTAC GGTTCCTGGC CTTTGTCTGG CCTTTTGCTC ACATGTTCTT TCCTGCGTTA
2161 TCCCCTGATT CTGTGGATAA CCGTATTACC GCCTTTGAGT GAGCTGATAC CGCTCGCCGC
2221 AGCCGAACGA CCGAGCGCAG CGAGTCAGTG AGCGAGGAAG CGGAAGAGCG CCTGATGCGG
2281 TATTTCTCC TTACGCATCT GTGCGGTATT TCACACCGCA TATATGGTGC ACTCTCAGTA

142

10/14

2341 CAATCTGCTC TGATGCCGCA TAGTTAAGCC AGTATACACT CCGCTATCGC TACGTGACTG
2401 GGTCAATGGCT GCGCCCCGAC ACCCGCCAAC ACCCGCTGAC GCGCCCTGAC GGGCTTGTCT
2461 GCTCCCGGCA TCCGCTTACA GACAAGCTGT GACCGTCTCC GGGAGCTGCA TGTGTCAGAG
2521 GTTTTCACCG TCATCACCGA AACGCGCGAG GCAGCTGCGG TAAAGCTCAT CAGCGTGGTC
2581 GTGAAGCGAT TCACAGATGT CTGCTGTTTC ATCCGCGTCC AGCTCGTTGA GTTCTCCAG
2641 AAGCGTTAAT GTCTGGCTTC TGATAAAGCG GGCCATGTTA AGGCGGGTTT TTTCTGTTT
2701 GGTCACTGAT GCCTCCGTGT AAGGGGGATT TCTGTTTCATG GGGGTAATGA TACCGATGAA
2761 ACGAGAGAGG ATGCTCACGA TACGGGTTAC TGATGATGAA CATGCCCGGT TACTGGAACG
2821 TTGTGAGGGT AAACAACGAG CGGTATGGAT GCGGCGGGAC CAGAGAAAAA TCACTCAAGG
2881 TCAATGCCAG CGCTTCGTTA ATACAGATGT AGGTGTTCCA CAGGCTAGCC AGCAGCATCC
2941 TCGGATGCAg ATCCGGAACA TAATGGTGCA GGGCGCTGAC TTCCGCGTTT CCAGACTTTA
3001 CGAAACACGG AAACCGAAGA CCATTTCATGT TGTGCTCAG GTGCGAGAGG TTTGTCAGCA
3061 GCAGTCGCTT CACGTTGCTT CCGGTATCGG TGATTTCATC TGCTAACCAg TAAGGCAACC
3121 CCGCCAGCCT AGCCGGGTCC TCAACGACAG GAGCACGATC ATGCGCACCC GTGGGGCCGC
3181 CATGCCGGCG ATAATGGCCT GCTTCTCGCC GAAACGTTTG GTGGCGGGAC CAGTGACGAA
3241 GGCTTGAGCG AGGGCGTGCA AGATTCCGAA TACCGCAAGC GACAGGCCGA TCATCGTCCG
3301 GCTCCAGCGA AAGCGGTCTT CCGCGAAAAA GACCCAGAGC GCTGCCGGCA CCTGTCTTAC
3361 GAGTTGCATG ATAAAGAAGA CAGTCATAAG TGCGGCGAGG ATAGTCATGC CCCGCGCCCA
3421 CCGGAAGGAG CTGACTGGGT TGAAGGCTCT CAAGGGCATC GGTGAGATC CCGTGCCTA
3481 ATGAGTGAGC TAACTTACAT TAATTGCGTT GCGCTCACTG CCGCTTTCC AGTCGGGAAA
3541 CCTGTGCTGC CAGCTGCATT AATGAATCGG CCAACGCGCG GGGAGAGGCG GTTTGCGTAT
3601 TGGGCGCCAG GGTGGTTTTT CTTTTACCA GTGAGACGGG CAACAGCTGA TTGCCCTTCA
3661 CCGCTGGCC CTGAGAGAGT TGCAGCAAGC GGTCCACGCT GGTTTGCCCC AGCAGGCGAA
3721 AATCCTGTTT GATGGTGTTT AACGGCGGGA TATAACATGA GCTGTCTTCG GTATCGTCTG
3781 ATCCCACTAC CGAGATATCC GCACCAACGC GCAGCCCGGA CTCGTAATG GCGGCAATG
3841 CGCCAGCGC CATCTGATCG TTGGCAACCA GCATCGCATG GGGACGATG CCTCATTTCA
3901 GCATTTGCAT GTTTTGTGA AAACCGGACA TGGCACTCCA GTCGCTTCC CGTTCCGCTA
3961 TCGGCTGAAT TTGATTGCGA GTGAGATATT TATGCCAGCC AGCCAGACGC AGACGCGCCG
4021 AGACAGAACT TAATGGGCCC GCTAACAGCG CGATTGTCTG GTGACCCAAT GCGACCAGAT
4081 GCTCCACGCC CAGTCGCGTA CCGTCTTCAT GGGAGAAAAA AATACTGTTG ATGGGTGTCT
4141 GGTCAAGAGC ATCAAGAAAT AACGCCGGA CATTAGTGCA GGCAGCTTCC ACAGCAATGG
4201 CATCCTGGTC ATCCAGCGGA TAGTTAATGA TCAGCCCACT GACGCGTTGC GCGAGAAGAT
4261 TGTGCACCGC CGCTTTACAG GCTTCGACGC CGCTTCGTTT TACCATCGAC ACCACCAGC
4321 TGGCACCCAG TTGATCGGCG CGAGATTTAA TCGCCGCGAC AATTGTGCGAC GGCUCGTGCA
4381 GGGCCAGACT GGAGGTGGCA ACGCCAATCA GCAACGACTG TTTGCCCGCC AGTTGTTGTG
4441 CCACGCGGTT GGGAAATGTAA TTCAGCTCCG CCATGCGCGC TTCCACTTTT TCCCGGTTT
4501 TCGCAGAAAC GTGGCTGGCC TGGTTACCA CCGGGGAAAC GGTCTGATAA GAGACACCGG
4561 CATACTCTGC GACATCGTAT AACGTTACTG GTTTCACATT CACCACCCTG AATTGACTCT
4621 CTTCGCGGCG CTATCATGCC ATACCGGAAA AGGTTTTGCG CCATTCGATG GTGTCCGGGA
4681 TCTCGACGCT CTCCCTTATG CGACTCCTGC ATTAGGAAGC AGCCCACTAG TAGGTTGAGG
4741 CCGTTGAGCA CCGCCGCGC AAGGAATGTT GCATGCAAGG AGATGGCGCC CAACAGTCCC
4801 CCGCCACGG GGCTGCCAC CATACCCACG CCGAAACAAG CGCTCATGAG CCCGAAGTGG

143

11/14

4861 CGAGCCCGAT CTTCCCCATC GGTGATGTCT GCGATATAGT CGCCAGCAAC CGCACCTGTG
4921 GCGCCGGTGA TGCCGGCCAC GATGCGTCCG GCGTAGAGGA TCGAGATCTC GATCCCGCGA
4981 AATTAAATACG ACTCACTATA GGGGAATTGT GAGCGGATAA CAATTCCCTT CTAGACCACA
5041 CCTTAAGGAG GATATAACAT ATGCTGCTG AACCAATAGA AGACAATTGC ATCAACTTTG
5101 TGGCAATGAA ATTTATTGAC AATACGCTTT ACTTTATAGC TGAAGATGAT GAAAACCTGG
5161 AATCAGATTA CTTTGCCAAG CTTGAGAGCA AACTATCGGT CATTCTGTAAT TTAAATGACC
5221 AGGTCTTATT TATCGACCAA GGGAAATCGTC CACTATTCTA GACATGACA GACAGTGAAT
5281 GCCGAGACAA TGCGCCGCGA ACCATTTTCA TTATATCTAT GTACAAGGAT TCTCAGCCGC
5341 GCGGAATGGC CGTAACTATT TCTGTCAAAAT GTGAAAAGAT ATCCACGCTG TCGTGTGAGA
5401 ACAAGATTAT TAGTTTCAAA GAGATGAATC CGCCGGATAA TATCAAGGAC ACGAAGTCTG
5461 ATATCATATT TTTCCAGCGC AGCGTGCCGG GGCACGATAA CAAGATGCAA TTTGAATCAT
5521 CCAGCTATGA AGGGTACTTT CTTGCATGCG AGAAGGAACG CGATCTCTTT AAACCTTATT
5581 TAAAGAAAGA GGACGAGCTA GCGATCGCA GCATTATGTT CACTGTCCAA AATGAAGACT
5641 AGTGGAGGAT ATAATACCAG GAATAAATAA AATCCATGGG CCATCATCAT CATCATCATG
5701 GCATACTCAA ACTTTGTCTT CGTGAAGAAT TCCTGAGACT GTGTAAAAAA AATCATGATG
5761 AGATCTATCC AATAAAAAAG AGAGAGGACC GCAGACGCTT GGCTCTCATC ATATGCAATA
5821 CAAAGTTTGA TCACCTGCCT GCAAGGAATG GGGCTCACTA TGACATCTG GGGATGAAAA
5881 GGCTGCTTCA AGGCCTGGGC TACACTGTGG TTGACGAAAA GAATCTCACA GCCAGGGATA
5941 TGGAGTCAGT GCTGAGGGCA TTTGCTGCCA GACCAGAGCA CAAGTCTCTT GACAGCACGT
6001 TCTTGGTACT CATGTCTCAT GGCATCTTAG AGGGAATCTG CGGAAGTCTG CATAAAAGA
6061 AAAAACCAGA TGTGCTGCTT TATGACACCA TCTTCCAGAT ATTCAACAAC CGCAACTGCC
6121 TCAGTCTAAA GGACAAACCC AAGGTATCA TTTCCAGGC CTGCAGAGGT GAAAAACATG
6181 GGGAACTCTG GGTGAGAGAC TCTCCAGCAT CTTGGGCAAT CATCTCTTCA CAGTCATCTG
6241 AGAACCTGGA GGCAGATTCT GTTTGCAAGA TCCACGAGGA GAAGGACTTC ATTGCTTTCT
6301 GTTCTTCAAC ACCACATAAC GTGTCTCTGA GAGACCGCAC AAGGCGCTCC ATCTTCATTA
6361 CGGAAGTCAT CACATGCTTC CAGAAATATT CTTGCTGCTG CCACCTAATG GAAATATTTT
6421 GGAAGGTACA GAAATCATTT GAAGTTCCAC AGGCTAAAGC CCAGATGCCC ACCATAGAAC
6481 GAGCAACCTT GACAAGAGAT TTCTACCTCT TTCTTGGCAA TTGACTCGAG CTCGGTGGCC
6541 CTGGTGGCCC GCGATGGAG GAGTTGGTAT GCGGATTTCT GAGTTGAAGC TGCCGCGCCG
6601 CGTCGGCCTG CAGGTCTGGG GCAGCGCCGC CAGCAGGCC CGCGGCTGG CGCGCGAGGT
6661 CGCCGGCCGG TTGCGCTCGG CGCTGGCCGA GCMGGGCCAG GCGCTGCTGG TGGTGTCCGG
6721 TGGGCGCAGT CCGGTGGCCT TCCTCGAAGC CTTGAGCGAG GAGCCGCTGG ACTGGTCCGG
6781 GATCACAGTC AGCCTGGCCG ACGAGCGCTG GGTGCCGGAG TCGCATGCCG ATAGCAACGC
6841 CGGCCTGGTT CGCCGCCACC TGCTCCGTGG CGAGGCGGCG AAGGCGCGCT TCATCGGCCCT
6901 CTACCAGCCG GCGGCGAGCC TGGAGGAAGC GGCCGAGCTG GCCGACCATC ACCTGCACGA
6961 GCTGCCATTG CCGATCGACG TGCTGGTCCT CGGCATGGGC GACGACGCCC ATACCGCCTC
7021 GCTGTTCCCG AACAGCCCTG GCCTGGACCT GGCATGAT CCACAGGGGA CGCGCGGTG
7081 CCTGCCGATG TGGGCGCCGA GCGTGCCGCA CCAGCGCTG ACCCTGCCGC GCGCGTGTCT
7141 GCGGCGGGCG AAGGTGCAGC TGCTGGCGAT CCAGGGCCAG TCCAAGCTGG CCACCTGAA
7201 CGCCGCGCTG GCGGTGAGG ACGAACGCG GATGCCGGTT CGCGCCTTCC TCCGCGCGCC
7261 GCTGACGATC CATTGGTACC CCTGAGTGGC GGAATCGAGC ACCACCACCA CCACCACTGA
7321 GATCCGGCTG CTAACAAAGC CGGAAGGAA GCTGAGTTGG CTGCTGCCAC CGCTGAGCAA

~~118~~
144

12/14

7381 TAACTAGCAT AACCCCTTGG GGCCTCTAAA CGGCTCTTGA GGGTTTTTTT GCTGAAAGGA
7441 GGAACATAT CCGG

Figura 6

145

SEQ ID NO:7

DNA

PGL de *Pseudomonas aeruginosa*

ATG GGA GGA GTT GGT ATG GCG ATT TCT GAG TTG AAG CTG CCG GCC GGC
GTC GGC CTG CAG GTC TGG GGC AGC GCC GCC GAG CAG GCC CGC GGC CTG
GCC GCC GAG GTC GCC GGC CCG TTG CGC TCG GCG CTG GCC GAG CAG GGC
CAG GCG CTG CTG GTG GTG TCC GGT GGG CGC AGT CCG GTG GCC TTC CTC
GAA GCC TTG AGC GAG GAG CCG CTG GAC TGG TCG CCG ATC ACC GTC AGC
CTG GCC GAC GAG CGC TGG GTG CCG GAG TCG CAT GCC GAT AGC AAC GCC
GGC CTG GTT CCG CGC CAC CTG CTC COT GGC GAG GCG GCG AAG GCG CGC
TTC ATC GGC CTC TAC CAG CCG GCG GCG AGC CTG GAG GAA GCG GCC GAG
CTG GCC GAC CAT CAC CTG CAC GAG CTG CCA TTG CCG ATC GAC GTG CTG
GTC CTC GGC ATG GGC GAC GAC GGC CAT ACC GCC TCG CTG TTC CCG AAC
AGC CCT GGC CTG GAC CTG GCG ATG GAT CCC CAG GGG ACG CGC COT TGC
CTG CCG ATG TGG GCG CCG AGC GTG CCG CAC CAG CGC CTG ACC CTG CCG
CGC GCC GTG CTG GCG GCG GCG AAG GTG CAG CTG CTG GCG ATC CAG GGC
CAG TCC AAG CTG GCC ACC CTG AAC GCC GCG CTG GCG GTC GAG GAC GAA
CGG CGG ATG CCG GTT CCG GCC TTC CTC CGC GCG CCG CTG ACG ATC CAT
TGG TAC CCC TGA

Figura 7

146
146

14/14

SEQ ID NO:8
aminoácidos
PGL de *Pseudomonas aeruginosa*

MGGVGMAISELKLPAQVGLQVWGSAAEQARGLAEEVAGRLRSALAEQQALLVVSQGRSPVAFLEA
LSEEFLDWSRITVSLADERWVPESHADSNAGLVRRHLLRGEAAKARFIGLYQPAASLEEAELADH
HLHELPLPIDVLVLQMGDDGHTASLFPNSPGLDLAMDPOGTRCCLPMQAPSVPHQRLTLPRAVLAA
AKVQLLAIQGQSKLATLNAALAVEDERRMPVRAFLRAFLTIHWYP

Figura 8

147

SEQUENCE LISTING

<110> GARDNER, Alan R.
SWEITZER, Thomas D.
TAYLOR, Alexander H.
PATEL, Pramatesh

<120> METHODS FOR PREVENTING GLYCOXYLATION OF
PROTEINS

<130> PU60116

<140> To Be Assigned

<141> 2004-03-04

<150> 60/451,686

<151> 2003-03-04

<160> 14

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> ESCHERIACHIA COLI

<400> 1

agctggccat tgctcaggtc gaag

24

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> ESCHERICHIA COLI

<400> 2

gtactgtccg gaatacacga cgatg

25

<210> 3

110
145

<211> 413
<212> DNA
<213> ESCHERICHIA COLI

<400> 3
agctggccat tgctcaggtc gaagagatgc aggcagtttc tgccgtgctt aagggcaaat 60
acaccatgac cggatgaagcc ttcatccggg ttgaggtgga tatgggccc agtgaggaga 120
ataacatcac gcagtccggc ggcacggagt ggagcaagcg tgacaagtcc acgtatgacc 180
cgaccgacga tatcgaagcc tacgcgctga acgccagcgg tgtggtgaat atcatcgtgt 240
tcgatccgaa aggcctgggcg ctgttccgtt ccttcaaagc cgtcaaggag aagctggata 300
ccgctcgtgg ctctaattcc gagctggaga cagcggtgaa agacctgggc aaagcgggtgt 360
cctataaggg gatgtatggc gatgtggcca tcgtcgtgta ttccggacag tac 413

<210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> HOMO SAPIENS

<400> 4
Asn Ile Gln Ser Val Lys Val Lys
1 5

<210> 5
<211> 29
<212> DNA
<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 5
ggcctcgagc tcggtggccc tggtagccc 29

<210> 6
<211> 31
<212> DNA
<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 6
ggcctcgagt ccgcactca ggggtaccaa t 31

<210> 7

HP
149

<211> 732

<212> DNA

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 7

```

atgggaggag ttggtatggc gatttctgag ttgaagctgc cggccggcgt cggcctgcag 60
gtctggggca ggcgcgcga gcaggccgc ggcctggcgc ccgaggtcgc cggccggttg 120
cgctcggcgc tggccgagca gggccaggcg ctgctggtgg tgtccggtgg gcgcagtcgc 180
gtggccttcc tcgaagcctt gagcgaggag ccgctggact ggtcgcggat caccgtcagc 240
ctggccgacg agcgtgggt gccggagtcg catgccgata gcaacgccgg cctggttcgc 300
cgccacctgc tccgtggcga ggcggcgaag gcgcgcttca tcggcctcta ccagccggcg 360
gcgagcctgg aggaagcggc cgagctggcc gaccatcacc tgcacgagct gccattgccg 420
atcgacgtgc tggtcctcgg catgggcgac gacggccata ccgcctcgct gtteccgaac 480
agccctggcc tggacctggc gatggatccc caggggacgc gccgttgctt gccgatgtgg 540
gcgccgagcg tgccgcacca gcgcctgacc ctgccgcgcg ccgtgctggc ggcggcgaag 600
gtgcagctgc tggcgatcca gggccagtec aagctggcca ccctgaacgc cgcgctggcg 660
gtcgaggacg aacggcggat gccggttcgc gccttctccc gcgcgccgct gacgatccat 720
tggtacccct ga                                     732

```

<210> 8

<211> 243

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 8

```

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

```

150
151

115	120	125
Leu Ala Asp His His Leu His Glu Leu Pro Leu Pro Ile Asp Val Leu		
130	135	140
Val Leu Gly Met Gly Asp Asp Gly His Thr Ala Ser Leu Phe Pro Asn		
145	150	155
Ser Pro Gly Leu Asp Leu Ala Met Asp Pro Gln Gly Thr Arg Arg Cys		
165	170	175
Leu Pro Met Trp Ala Pro Ser Val Pro His Gln Arg Leu Thr Leu Pro		
180	185	190
Arg Ala Val Leu Ala Ala Ala Lys Val Gln Leu Leu Ala Ile Gln Gly		
195	200	205
Gln Ser Lys Leu Ala Thr Leu Asn Ala Ala Leu Ala Val Glu Asp Glu		
210	215	220
Arg Arg Met Pro Val Arg Ala Phe Leu Arg Ala Pro Leu Thr Ile His		
225	230	235
Trp Tyr Pro		240

<210> 9

<211> 3416

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Comprised of PECO-1 Expression & Pseudomonas aeruginosa

<400> 9

```

gaattccgga tgagcattca tcaggcgggc aagaatgtga ataaaggccg gataaaactt 60
gtgcttattt ttctttacgg tctttaaaaa ggcggtanta tccagctgaa cggctctggt 120
ataggtatct tgagcaattg actgaatgc ttcadaatgt tctttacgat gdcattggga 180
tatatcaacg gtggtatatc cagtgatctt tttctccatt ttagcttctt tagctcctga 240
aatctcgat aactcaaaaa atacgcccgg tagtgatctt atttcattat ggtgaagtt 300
ggaacctctt acgtgccgat caacgtctca ttttcgcca aagttggccc agggcttccc 360
ggtatcaaca gggacaccag gatttattta ttctgcgaag tgatcttccg tcacaggtat 420
ttattcggcg caaagtgcgt cgggtgatgc tgccaactta ctgatttagt gtatgatggt 480
gtttttgagg tgctccagtg gcttctgttt ctatcagctg tccctcctgt tcagctactg 540
acggggtggt gcgtaacggc aaaagcaccg ccggacatca gcgctagcgg agtgtatact 600
ggcttactat gttggcactg atgaggggtg cagtgaagtg cttcatgtgg caggagaaaa 660
aaggctgcac cgggtgcgtca gcagaatatg tgatacagga tatattccgc ttcctcgtc 720
actgactcgc tacgctcggc cgttcgactg cggcgagcgg aatgggctta cgaacggggc 780
ggagatttcc tgggaagatg caggaagata cttaacaggg aagtgaaggg gccgcggcaa 840
agccgttttt ccataggctc cgtccccctg acaagcatca cgaatctga cgctcaaatc 900

```

151

agtgggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggccggctccc 960
tcgtgcgctc tcctgttccct gccttttcggg ttaccgggtgt cattccgctg ttatggccgc 1020
gtttgtctca ttccacgcct gacactcagt tccgggtagg cagttcgctc caagctggac 1080
tgtatgcacg aaacccccct tcagtccgac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt 1140
gagtccaacc cggaaagaca tgcaaaagca ccactggcag cagccactgg taattgattt 1200
agaggagtta gtcttgaagt catgcgccgg ttaaggctaa actgaaggga caagttttgg 1260
tgactgcgct cctccaagcc agttacctcg gttcaaaagag ttggtagctc agagaacctt 1320
cgaaaaaccg ccctgcaagg cggttttttt gttttcagag caagagatta cgcgcagacc 1380
aaaacgatct caagaagatc atcttattaa tcagataaaa tatttctaga tttcagtgc 1440
atztatctct tcaaatgtag cacctgaagt cagccccata cgatataagt tgaattctc 1500
atgtttgaca gcttatcacc gataagcttt aatgcggtag tttatcacag ttaaattgct 1560
aacgcagtcg ggcaccgtgt catatggatc ccgggtaccg tcgagctcga gctcgggtgg 1620
cctgggtggcc cgcgatggga ggagttggta tggcgatttc tgagttgaag ctgccgggcc 1680
gcgtccggcct gcaggtctgg ggcagcgccg ccgagcaggg ccggggcctg gccggccagg 1740
tcgccggccg gttgcgctcg gcgctggccg agcagggcca ggcgctgctg gtggtgtccg 1800
gtggggcgag tccggtggcc ttcccgaa gcttgagcga ggagccgctg gactggtcgc 1860
ggatcacctg cagcctggcc gacgagcgct ggggtccgga gtcgcatgcc gatagcaacg 1920
ccggcctggg tcgccgccac ctgctccgtg gcgagggcgg gaaggcgccg ttcacgggcc 1980
tctaccagcc ggccggcgag ctggaggaa ggcggagctt ggccgacctt cacctgcacg 2040
agctgccatt gccgatcgac gtgctggtcc tcggcatggg cgacgacggc cataccgcct 2100
cgctgttccc gaacagccct ggccctggac tggcgatgga tccccagggg acgcgccgtt 2160
gcctgccgat gtggggcgcc agcgtgccgc accagcgccg gacctgccg ccgcgccgtg 2220
tggcgggggc gaagggtcag ctgctggcga tccagggcca gtccaagctg gccaccctga 2280
acgcgcgctt ggccgtcgag gacgaacggc ggtatgcggg tcgcgccttc ctccgcgcgc 2340
cgctgacgat ccattggtac cctgagtggt cggactcgac tagtcaacgc catgagcggc 2400
ctcatttctt attctgagtt acaacagtc gcaccgctgt ccggtagctc cttccgggtg 2460
gcgcggggca tgactatcgt cgcgcactt atgactgtct tctttatcat gcaactcgta 2520
ggacaggtgc cggcagcgcc caacagtcct ccggccacgg ggcctgccac cataccacg 2580
ccgaacaacg cgcctgcac cattatgttc cggatctgca tcgcaggatg ctgctggcta 2640
ccctgtggaa cacctacac tgtattaacg aagcgctaac cgtttttatc aggtctctgg 2700
agpcagaata aatgatcata tcgtcaatta ttacctccac ggggagagcc tgagcaaaact 2760
ggcctcaggg atttgagaag cacacggta cactgcttcc ggtagtcaat aaaccggtaa 2820
accagcaata gacataagcg gctatttaac gacctgccc tgaaccgacg accgggtcga 2880
atgtgttttc gaatttctgc cattcatccg cttattatca cttattcagg cgtagacca 2940
ggcgttttaag ggcaccaata actgccttaa aaaaattacg cccgcgcctg cactcatcg 3000
cagtactgtt gtaattcatt aagcattctg ccgacatgga agccatcaca gacggcatga 3060
tgaacctgaa tcgccagcgg catcagcacc ttgtcgctt gcgtataata tttgcccatg 3120
gtgaaaacgg gggcgaagaa gttgtccata ttggccacgt ttaaatcaaa actgggtgaa 3180
ctcaccacgg gattggctga gacgaanaac atattctcaa taaaccttt agggaaatag 3240
gccaggtttt caccgtaaca cgcacatct tgogaatata tgtgtagaaa ctgccggaaa 3300

152

tcgtcgtggt attcactcca gagcgatgaa aacgttttcag tttgctcatg gaaaacggtg 3360
taacaagggt gaacactatc ccatatcacc agctcaccgt ctttcattgc catatg 3416

<210> 10

<211> 157

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 10

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

<210> 11

<211> 582

<212> DNA

<213> HOMO SAPIENS

<400> 11

atggctgctg aaccagtaga agacaattgc atcaactttg tggcaatgaa atttattgac 60
aatacgtttt actttatagc tgaagatgat gaaaacctgg aatcagatta ctttggcaag 120
cttgagagca aactatcggt ctttcgtaat ttaaatgacc aggtcctatt tatcgaccaa 180

157
753

```

gggaatcgtc cactattcga ggacatgaca gacagtgaat gccgagacaa tgcgcgcgca 240
accattttca ttatatctat gtacaaggat tctcagccgc gcggaatggc cgttaactatt 300
tctgtcaaat gtgaaaagat atccacgctg tcgtgtgaga acaagattat tagtttcaaa 360
gagatgaatc cgccggataa tatcaaggac acgaagtctg atatcatatt ttccagcgc 420
agcgtgccgg ggcacgataa caagatgcaa tttgaatcat ccagctatga agggtaacttt 480
cttgcatgcg agaaggaacg cgatctcttt aaacttattt taagaaaga ggacgagcta 540
ggcgatcgca gcattatgtt cactgtccaa aatgaagact ag 582

```

<210> 12

<211> 849

<212> DNA

<213> HOMO SAPIENS

<400> 12

```

atggggccatc atcatcatca tcatggcata ctcaaatctt gtctctgtga agaattcctg 60
agactgtgta aaaaaaatca tgatgagatc tatccaataa aaagagaga ggaccgcaga 120
cgcttggtc tcatcatatg caatacaag tttgatcacc tgcctgcaag gaatggggct 180
cactatgaca tegtggggat gaaaaggctg cttcaaggcc tgggtacac tgtggttgac 240
gaaaagaatc tcacagccag ggtatggag tcagtgtga gggcatttgc tgccagacca 300
gagcacaagt cctctgacag caogttcttg gtactcatgt ctcatggcat cctagaggga 360
atctgcgga ctgcgcataa aaagaaaaaa ccggatgtgc tgctttatga caccatcttc 420
cagatattca acaaccgcaa ctgcctcagt ctaaggaca aaccaagggt catcattgtc 480
caggcctgca gaggtgaaaa acatgggga ctctgggtca gagactctcc agcatccttg 540
gcagtcactt cttcacagtc atctgagaac ctggaggcag attctgtttg caagatccac 600
gaggagaagg acttcattgc tttctgttct tcaacaccac ataactgtc ctggagagac 660
cgcaacaagg gctccatctt cattacggaa ctcatcacat gcttcagaa atattcttgc 720
tgctgccacc taatggaaat atttcggaag gtacagaat catttgaagt tccacaggct 780
aaagcccaga tgccaccat agaacgagca accttgaca gagatttcta cctctttcct 840
ggcaattga 849

```

<210> 13

<211> 6687

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Comprised of pET Vector and Homo Sapien

<400> 13

```

tggcgaatgg gacgcgccct gttagggcgc attaagcgc ggggtgtgg tggttacgcg 60
cagcgtgacc gctacaattg ccagcgccct agcgcgcgt cctttcgtt tcttcccttc 120
ctttctcgcc acgttcgccc gctttccccc tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg 180

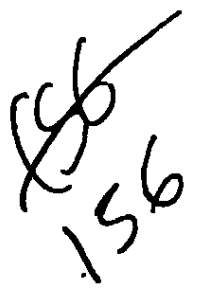
```

154

gttccgattt agtgetttac ggcacctcga cccccaaaaa cttgattagg gtgatgggtc 240
acgtagtggg ccatacgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt 300
ctttaantagtg ggaactctgt tccaaactgg aacaacactc aaccttatct cggtctattc 360
ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta 420
acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acnatttcag gtggcacttt 480
tcggggaaat gtgcgggaa cccctatttg tttatttttc taatatcatt caaatatgta 540
tccgctcatg aattaattct tagaaaaact catcgagcat caaatgaac tgcaatttat 600
tcataatcagg attatcaata ccataattttt gaaaaagcgg tttctgtaat gaaggagaaa 660
actcacogag gcagttccat aggatggcaa gatcctggta tcgggtctgag attccgactc 720
gtccaacatc aatacaacct attaatctct cctcgtcaa aataagggtt tcaagtga 780
aatcaccatg agtgacgact gaatccgttg agaattggaa aagtttatgc atttctttcc 840
agacttggtc aacaggccag ccattacgct cgtcatcaa atcactcgca tcaaccaaac 900
cgttattcat tcgtgattgc gcctgagcga gcgaatac gcgatcgctg ttaaaaggac 960
aattacaac aggaatcgaa tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgca tcaacaatat 1020
ttcacctga atcaggatat tcttctaata cctggaatgc tgttttcccg gggatcgag 1080
tgytgagtaa ccatacatca tcaggagtag gataaaatg cttgatggtc ggaaggagca 1140
taaatccgt cagccagttt agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac 1200
ctttgccatg tttcagaac aactctggcg catcgggctt cccatacaat cgatagattg 1260
tcgcacctga ttgcccgaca ttatcgcgag ccattttata cccatatana tcagcatcca 1320
tggtggaatt taatcgggc ctagagcaag acgtttcccg ttgaatatgg ctcataaac 1380
cccttgatt actgtttatg taagcagaca gttttattgt tcatgacca aatcccttaa 1440
cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga 1500
gatccctttt ttctgcgct aatctgctgc ttgcaacaa aaaaaccacc gctaccagcg 1560
gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actcttttc cgaaggtaac tggcttcagc 1620
agagcgaga tacaataac tgctcttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag 1680
aactctgtag caccgcctac atacctcgt ctgctaatec tgttaccagt ggtgctgcc 1740
agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 1800
cagcgggtcgg gctgaacggg ggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgaactac 1860
acogaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga 1920
aaggcggaca ggtatccggg aagcggcagg gtccgaacag gagagcgac gagggagctt 1980
ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttccccaact ctgacttgag 2040
cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg 2100
gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tctgctgta 2160
tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc 2220
agccgaacga ccgagcgag ccggtcagtg agcgaggag cggagagcg cctgatcgcg 2280
tattttctcc ttacgatct gtgcggtatt tcacaccgca tatatgggtc actctcagta 2340
caatctgctc tgatgcgca tagttaagcc agtatacact ccgtatcgc tacgtgactg 2400
ggtcatggct gcgcccgac acccgccaac acccgctgac gcgccctgac gggcttgtct 2460
gtccccggca tccgcttaca gacnagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 2520
gttttcaccc tcataccga aacgcgcgag gcagctgcgg taagctcat cagcgtggtc 2580

~~SP~~
155

gtgaagcgat tcacagatgt ctgactgttc atccgcgtcc agctcgttga gtttctccag 2640
aagcgttaat gtctggcttc tgataaagcg ggccatgtta agggcggttt tttctgttt 2700
ggtaactgat gcctccgtgt aagggggatt tctgttcatg ggggtaatga taccgatgaa 2760
acgagagagg atgtcacgga tacgggttac tgatgatgaa catgcccggt tactggaacg 2820
ttgtgagggg aaacaactgg cggtatggat gggcgggac cagagaaaaa tactcaggg 2880
tcaatgccag cgcttcgtta atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc 2940
tgcatgacag atccggaaca taatgggtga gggcgctgac ttccgcgttt ccagacttta 3000
cgaaacacgg aaaccgaaga ccattcatgt tgttgctcag gtccgagacg ttttgacgca 3060
gcagtcgctt caggttcgct cgcgatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc 3120
ccgccagcct agccgggtcc tcaacgacag gagcagatc atgcgcaccc gtggggccgc 3180
catgccggcg ataattggct gcttctcgcc gaaacgtttg gtggcgggac cagtgcgaa 3240
ggcttgagcg agggcggtga agattccgaa taccgcaagc gacaggccga tcatcgtcgc 3300
gtccagcga aagcggtcct cgccgaaat gaccagagc gctgcggca cctgtcctac 3360
gagttgcatg ataaagaaga cagtcataag tggggcgacg atagtcatgc ccgcgcacca 3420
ccggaaggag ctgactgggt tgaaggctct caagggcacg ggtcgagatc ccggtgccta 3480
atgagtgagc taacttacat taattgcgtt gcgctcactg ccgcctttcc agtcgggaaa 3540
cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgat 3600
tgggcgccag ggtggttttt cttttcacca gtgagacggg caacagctga ttgcccttca 3660
ccgcctggcc ctgagagagt tgcagcaagc ggtccacgct ggtttgcccc agcaggcgaa 3720
aatcctgttt gatggtggtt aacggcgga tataacatga gctgtcttgc gtatogtcgt 3780
atccactac cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccgga ctcggtaatg gcgcgcattg 3840
cgccagcgc catctgatog ttggcaacca gcacgcagc gggaaagatg ccttcattca 3900
gcatttgcat ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca gtgccttcc cgttcgccta 3960
tcggctgaat ttgattgcga gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacgcgcg 4020
agacagaact taatgggccc gctaacagcg cgaatttgcg gtgacccaat gcgaccagat 4080
gtccacgcc cagtcgcgta ccgtcttcat gggagaaaaa aatactgttg atgggtgtct 4140
ggtcagagac atcaagaat aacgcggaa cattagtga ggcagcttcc acagcaatgg 4200
cctcctgttc atccagcgga tagttaatga tcagccact gacgcgttgc gcgagaagat 4260
tgtgcaccgc cgctttacag gcttcgacgc cgcttcgttc taccatcgac accaccacgc 4320
tggcaccag ttgatcggcg cgagatttaa togcgcgcac aatttgcgac ggcgcgtgca 4380
gggccagact ggaggtggca acgccaatca gcaacgactg tttgcccgcc agttgttbtg 4440
ccacgcpggtt gggaaatgtaa ttcagctccg ccacgcgcgc ttccactttt tccgcgctt 4500
tcgcagaaac gtggctggcc tggttcacca cgcgggaaac ggtctgataa gagacaccgg 4560
catactctgc gacatcgtat aacgttactg gtttcacatt caccaccctg aattgactct 4620
cttcggggcg ctatcatgcc ataccgcgaa aggttttgcg ccattcgatg gtgtccggga 4680
tctcgacgct ctcccttatg cgactcctgc attaggaagc agccagtag taggttgagg 4740
ccgttgagca ccgcgcgcgc aaggaaatggt gcatgcaagg agatggcgcc caacagtcct 4800
ccggccacgg ggctgcccac catacccacg ccgaaacaag cgctcatgag ccggaagtgg 4860
cgagcccgat cttccccatc ggtgatgtcg gcgatatagg cgccagcaac cgcacctgtg 4920
gcgcgggtga tgccggccac gatgcgtccg gcgtagagga tcgagatctc gatcccgca 4980



```

aatttaatacg actcactata' ggggaattgt gagcggataa caattccct ctagaccaca 5040
ccttaaggag gatataacat atggctgctg aaccagtaga agacaattgc atcaactttg 5100
tggcaatgaa atttattgac aatacgtttt actttatagc tgaagatgat gaaaacctgg 5160
aatcagatta ctttggcaag cttgagagca aactatcggc cattcgtaat ttaaatgacc 5220
aggtcctatt tatcgacca gggatcgtc cactattcga ggacatgaca gacagtgaat 5280
gccgagacaa tgcgcgcga accattttca ttatatctat gtacaaggat tctcagcttc 5340
ggggaatggc cgttaactatt tctgtcaaat gtgaaaagat atccacgctg tctgttgaga 5400
acaagattat tagtttcaa gagatgaatc cgccggataa tatcaaggac acgaagtctg 5460
atatcatatt tttccagcgc agcgtgccg ggcacgataa caagatgcaa tttgaatcat 5520
ccagctatga aggttacttt cttgcatgcg agaaggaaag cgatctcttt aaacttattt 5580
taagaaga ggcagagcta ggcgacgca gcattatgtt cactgtccaa aatgaagact 5640
agtggaggat ataataccag gaataaataa aatccatggc ccatcatcat catcatcatg 5700
gcatactcaa actttgtcct cgtgaagaat tcttgagact gtgtaaaaa aatcatgatg 5760
agatctatcc aataaaaaag agagaggacc gcagacgcct ggcctctatc atatgcaata 5820
caaagtttga tcacctgcct gcaaggaaatg gggctcacta tgacatcgtg gggatgaaa 5880
ggctgttca aggcctgggc tacactgtgg ttgacgaaa gaatctcaca gccagggata 5940
tggagtcatg gctgagggca tttgctgcca gaccagagca caagtctct gacagcacgt 6000
tcttggtagt catgtctcat ggcctcctag agggatctg cggaactcgc cataaaaaa 6060
aaaaaccgga tgtgtgctt tatgacacca tcttcagat attcaaacac cgcaactgcc 6120
tcagtctaaa ggacaaaccc aaggtcatca ttgtccaggc ctgcagaggt gaaaaacatg 6180
gggaactctg ggtcagagac tctccagcat ccttggcagt catctcttca cagtcatctg 6240
agaacctgga ggcagattct gtttgcaaga tccacgagga gaaggacttc attgctttct 6300
gttcttcaac accacataac gtgtcctgga gagaccgac aaggggctcc atcttcatta 6360
cggaactcat cacatgcttc cagaatatt cttgctgctg ccacctaatg gaaatatttc 6420
ggaaggtaaa gaatcattt gaagttccac aggttaagc ccagatgcc accatagaac 6480
gagcaacctt gacaagagat ttctacctt ttcctggca ttgactcgag caccaccacc 6540
accaccactg agatccggct gctaacaaag cccgaagga agctgagttg gctgtgcaa 6600
ccgctgagca ataactagca taacctctg ggcctctaa acgggtctt aggggttttt 6660
tgctgaagg aggaactata tccggt 6687

```

<210> 14

<211> 7454

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<214> Comprised of pET Vector & Homo Sapien, Pseudomonas Aeruginosa

<400> 14

```

tggcgaatgg gacgcgcct gtagcggcgc attagcgcg ggggtgtgg tggtaacgc 60
cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcct agcgcgcct cctttcgtt tcttccttc 120
ctttctcgcc acgttcggcg gctttcccg tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg 180

```

157
157

gttccgattt agtgcctttac ggcacotcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatgggtc 240
acgtagtggg ccacgcacct gatagacggg ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt 300
ctttaantagtg ggaactcttg tccaaactgg aacaacactc aacctatct cggctctattc 360
ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta 420
acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt 480
tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taatatacatt caaatatgta 540
tcgcctcatg aattaattct tagaaaaact catcgagcat caaatgaac tgcattttat 600
tcatatcagg attatcaata ccataatttt gaaaaagccg tttctgtaat gaaggagaaa 660
actcaccgag gcagttccat aggatggcaa gatcctggta tcggctctgcg attccgactc 720
gtccaacatc aatacaacct attaatcttc cctcgtcaaa aataagggtt tcaagtgaga 780
aatcaccatg agtgacgact gaatccggtg agaattggcaa aagtttatgc atttcttttc 840
agacttggtc aacaggccag ccattacgct cgtcatcaaa atcactcgca tcaaccaaac 900
cgttattcat tcgtgattgc gcctgagcga gacgaatac gcgacgctg ttaaaaggac 960
aattacaamc aggaatcgaa tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgca tcaacaatat 1020
tttcaectga atcaggatat tcttctaata cctggaaatg tgttttcccg gggatcgag 1080
tggtagtaa ccacgcatca tcaggagtac ggataaaatg cttgatggtc ggaaggaggca 1140
taaatccgt cagccagttt agtctgacca tctcatctgt aacatcattg gcaacgctac 1200
ctttgocatg tttcagaamc aactctggcg catcgggctt cccatacaat cgatagattg 1260
tcgcacctga ttgcccga ca ttatcgagag cccatttata cccatataaa tcagcatcca 1320
tgttggaatt taatgcggc ctagagcaag acgtttcccg ttgaatatgg ctcataaacac 1380
cccttgatt actgtttatg taagcagaca gttttattgt tcatgacca aatcccttaa 1440
cgtgagttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaggg atcttcttga 1500
gatccttttt tctcgccgt aatctgctgc ttgcamaaa aaaaaccacc gctaccagcg 1560
gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc 1620
agagcgaga taccanatac tgctcttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag 1680
aactctgtag caccgcctac atacctcgt ctgctaactc tgttaccagt ggcctgctgc 1740
agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 1800
cagcggtcgg gctgaacggg gggttogtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac 1860
accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaagcg ccacgcttcc cgaagggaga 1920
aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtccgaacag gagagcgac gagggagctt 1980
ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag 2040
cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaanaacgc cagcaacgcg 2100
gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgta 2160
tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc 2220
agccgaacga ccgagcgag cgagtcagtg agcgaggaa cgggaagagc cctgatgcgg 2280
tattttcttc ttacgcactc gtgcggtatt tcacaccgca tatatgggtc actctcagta 2340
caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agtatacact ccgctatcgc tacgtgactg 2400
ggtcatggct gcgccccgac acccgccaac acccgctgac gcgccctgac gggcttgtct 2460
gctcccgga tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 2520
gttttcacog tcatcaccga aacggcgag gcagctgcgg taagctcat cagcgtggct 2580

158

gtgaagcgat tcacagatgt ctgcctgttc atccgcgtcc agctcgttga gtttctccag 2640
aagcgttaat gtctggcttc tgataaagcg ggccatgtta agggcggttt ttctctgttt 2700
ggtcactgat gccttcgtgt aagggggatt tctgttcatt ggggtaatga taccgatgaa 2760
acgagagagg atgctcacga tacgggttac tgatgatgaa catgcccgtt tactggaacg 2820
ttgtgagggc aaacaactgg cgggtatggat gcggcgggac cagagaaaaa tcaactcagg 2880
tcaatgccag cgcttcgtta atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc 2940
tgcatgcag atccggaaca taatgggtga gggcgctgac ttccgcgttt ccagacttta 3000
cgaaacacgg aaaccgaaga ccattcatgt tgttgcctag gtcgcagacg ttttgacgca 3060
gcagtcgctt caggttcgct cgggtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc 3120
ccgccagcct agccgggtcc tcaacgacag gagcacgata atgcgcaccc gtggggccgc 3180
catgcccggc ataatggcct gcttctcgcc gaacagtttg gtggcgggac cagtgaacga 3240
ggcttgagcg agggcggtga agattccgaa taccgcaagc gacagggcga tcatcgtcgc 3300
gctccagcga aagcggctct cgccgaaat gaccagagc gctgcgggca cctgtcctac 3360
gagttgcatg ataaagaaga cagtcataag tgcggcgacg atagtcattg cccgcgcca 3420
ccggaaggag ctgactgggt tgaaggctct caagggcata ggtcgagatc ccggtgccta 3480
atgagtgagc taacttacat taattgcgtt gcgtcactg cccgctttcc agtcgggaaa 3540
cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgat 3600
tgggcgccag ggtggttttt cttttcacca gtgagacggg caacagctga ttgcccttca 3660
ccgcctggcc ctgagagagt tgcagcaagc ggtccacgct ggtttgccc agcagggcga 3720
aatcctgttt gatggtggtt aacggcggga tataacatga gctgtcttcg gtatcgtcgt 3780
atccactac cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccgga ctcggtaatg gcgcgattg 3840
cgcccagcgc catctgatcg ttggcaacca gcctgcaggt gggaaagatg cctcattca 3900
gcatttgcat ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca gtgccttcc cgttcgcta 3960
tcggctgaat ttgattgcga gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacgcgcg 4020
agacagaact taatgggccc gctaacagcg cgtttgctg gtgacccaat gcgaccagat 4080
gctccacgcc cagtcgcgta ccgtcttcat gggagaaaat aatactgttg atgggtgtct 4140
ggtcagagac atcaagaat aacgccggaa cattagtga ggcagcttc acagcaatgg 4200
cactctggtc atccagcgga tagttaatga tcagcccact gacgcgttgc gcgagaagat 4260
tgtgcaccgc cgttttacag gcttcgacgc cgttcgttc taccatcgac accaccaagc 4320
tggaaccag ttgatcgcg cgagatttaa tcgcgcgac aatttgcgac ggcgcgtgca 4380
gggccagact ggagggtgca acgccaatca gcaacgactg tttgcccgcc agttgttgtg 4440
ccacgcggtt gggaatgtaa ttcagctccg ccctgcgcgc ttccactttt tcccgcgttt 4500
tcgcagaac gtggctggcc tggttcacca cgcgggaaac ggtctgataa gagacaccgg 4560
catactctgc gacatcgtat aacgttactg gtttcacatt caccaccctg aattgactct 4620
cttcggggcg ctatcatgcc ataccgcga aggttttgcg ccattcgatg gtgtccggga 4680
tctcgacgct ctcccttatg cgaactcctg attaggaagc agccagtag taggttgagg 4740
ccgttgagca ccgcgcgcgc aaggaaatgg gcatgcaagg agatggcgcc caacagtcct 4800
ctggccacgg ggcctgccac catacccag ccgaaacaag cgtcatgag cccgaagtgg 4860
cgagcccgat cttcccatc ggtgatgtcg gcgatatagg cgcagcaac cgcacctgtg 4920
gcgcgggtga tgccggccac gatgcgtccg ggttagagga tcgagatctc gatcccgcga 4980

159

aattaatacag actcaactata ggggaattgt gagcggataa caattcccct ctagaccaca 5040
ccttaaggag gatataacat atggctgctg aaccagtaga agacaattgc atcaactttg 5100
tggcaatgaa atttattgac aatacgtttt actttatagc tgaagatgat gaaaacctgg 5160
aatcagatta ctttggcaag cttgagagca aactatcggc cattcgtaat ttaaatgacc 5220
aggtcctatt tatcgaccas gggaaatcgt cactattcga ggacatgaca gacagtgaet 5280
gccgagacaa tgcgcgcgga accattttca ttatatctat gtacnaggat tctcagccgc 5340
gcggaatggc cgtaactatt tctgtcaaat gtgaaaagat atccacgctg tctgttgaga 5400
acaagattat tagttttcaa gagatgaac cgccggataa tatcaaggac acgaagtctg 5460
atatcatatt tttccagcgc agcgtgccgg ggcacgataa caagatgcaa tttgaatcat 5520
ccagctatga agggtaacttt cttgcatgog agaaggaaag cgatctcttt aaacttattt 5580
taaagaaga ggcagagcta ggcgttcgca gcattatgtt cactgtccaa aatgaagact 5640
agtggaggat ataataccag gaataaataa aatccatggg ccatacatcat catcatcatg 5700
gcatactcaa actttgtcct cgtgaagaat tcttgagact gtgtaaaaa aatcatgatg 5760
agatctatcc aataaaaaag agagaggacc gcagacgcct ggtctctcat atatgcaata 5820
caaagtttga tcacctgcct gcaaggaaag gggctcacta tgacatcgtg gggatgaaa 5880
ggctgcttca aggcctgggc tacactgtgg ttgacgaaaa gaatctcaca gccagggata 5940
tggagtcaat gctgagggca tttgctgcca gaccagagca caagtccctt gacagcacgt 6000
tcttggtaact catgtctcat ggcacccatg agggaaatctg cggaaactgcg cataaaaaga 6060
aaaaaccgga tgtgctgctt tatgacacca tcttccagat attcaaacac cgcaactgcc 6120
tcagtctaaa ggcacaaacc aaggtcatca ttgtccaggg ctgcagaggt gaaaaacatg 6180
gggaactctg ggtcagagac tctccagcat ccttggcagt catctcttca cagtcatctg 6240
agaacctgga ggcagattct gtttgcaaga tccacgagga gaaggacttc attgctttct 6300
gttcttcaac accacataac gtgtccctga gagaccgcac aaggggctcc atcttcatta 6360
cggaaactcat cacatgcttc cagaatatt cttgctgctg ccacctaatg gaatatattc 6420
ggaaggtaca gaatacattt gaagttccac aggtctaaag ccagatgcc accatagaa 6480
gagcaacctt gacaagagat ttctacctct ttccctggca ttgactcgag ctgggtggcc 6540
ctggtggccc gcgatgggag gagttggtat ggcgatttct gatttgaaag tgccggccgg 6600
cgtccggcctg caggtctggt gcaagcgcgc cgagcagggc cgcggcctg ccgccgaggt 6660
cgccggccgg ttgcgctcgg cgtgggcga gcagggccag gcgctgctg tgggtgtccg 6720
tgggcccagt ccggtggcct tctcgaagc cttgagcgag gagccgctgg actggctcgc 6780
gatcacagtc agcctggccg acgagcgcgt ggtgcccggag tgcagtgcg atagcaacgc 6840
cggcctgggt cgccgccacc tgcctcgtgg cgagggcgcg aaggcgcgct tcatcgccct 6900
ctaccagcgg gcggcgagcc tggagggaag ggcgagctg gccgaccatc acctgcaaga 6960
gctgccattg ccgatcgag tgcgtgctct cggcatgggc gacgacggcc ataccgcctc 7020
gctgttcccg aacagccctg gcctggacct ggcgatggat ccccagggga cgcgccgttg 7080
cctgccgatg tgggcgcga gogtgccga ccagcgccctg accctgccgc gcgccgtgct 7140
ggcgccggcg aaggtgcagc tgcgtgggat ccagggccag tccaagctgg ccacctgaa 7200
cgccgcgctg gcggtcgagg acgaacggcg gatgccggtt cgcgccttcc tccgcgcgcc 7260
gctgacgac cattggtaac cctgagtggc ggactcgagc accaccacca ccacctga 7320
gatccggctg ctaacaaagc ccgaaggaa gctgagttgg ctgctgccac cgctgagcaa 7380

160

taactagcat aadcccttgg ggcctctaaa cgggtcttga ggggtttttt gctgaaagga 7440
ggaactatat ccgg 7454

162
161

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 05087348 00000000 Folios: 159
Fecha (MM): 2005-09-01 10:09:24
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION 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 o 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
[Signature]
Fecha: 01 de 2005

162

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION

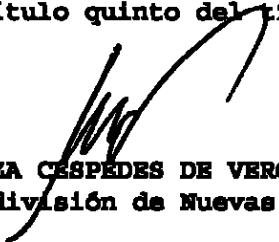
REFERENCIA	Radicación No.	5 87348
	Solicitud internacional	US2004/006507
	Fecha inicio fase nacional	04/10/2005
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	9497

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:

1. Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT.
2. 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. 26-k) Decisión 486.

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 Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior, requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 14. OCT. 2005
adpa1