

PCTORGANISATION MONDIALE I
Bureau

WO 9604387A1

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/57, 9/64, C07K 16/40, A61K 38/48, C12N 5/10	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/04387 (43) Date de publication internationale: 15 février 1996 (15.02.96)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01035</p> <p>(22) Date de dépôt international: 1er août 1995 (01.08.95)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 94/09567 2 août 1994 (02.08.94) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): ROUSSEL UCLAF [FR/FR]; 102, route de Noisy, F-93230 Romainville (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DIU, Anita [FR/FR]; 39, rue Gabriel, F-94220 Charenton-le-Pont (FR). FAUCHEU, Chi [FR/FR]; 7, avenue de la Convention, F-77184 Emervainville (FR). HERCEND, Thierry [FR/FR]; 39, rue Gabriel, F-94220 Charenton-le-Pont (FR). LALANNE, Jean-Louis [FR/FR]; 39, rue Maximilien-Robespierre, F-94120 Fontenay-sous-Bois (FR). LIVINGSTON, David, J. [US/US]; 20 Madison Avenue, Newton, MA 02160 (US). SU, Michael, S.-S. [-/US]; 15 Donna Road, Newton, MA 02159 (US).</p> <p>(74) Mandataire: VIEILLEFOSSE, Jean-Claude; Roussel Uclaf, 111, route de Noisy, F-93235 Romainville Cédex (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: AU, CA, CN, HU, JP, KR, RU, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>	
<p>(54) Title: DNA SEQUENCES CODING FOR THE HUMAN PROTEINS TX AND TY RELATED TO THE INTERLEUKIN-1BETA CONVERTING ENZYME</p>		
<p>(54) Titre: SEQUENCES D'ADN CODANT POUR LES PROTEINES HUMAINES TX ET TY APPARENTÉES A L'ENZYME DE CONVERSION DE L'INTERLEUKINE-1BETA</p>		
<p>(57) Abstract</p>		
<p>DNA sequences coding for human polypeptides with protease activity and capable of inducing apoptosis, related to the interleukin-1 beta converting enzyme are disclosed.</p>		
<p>(57) Abrégé</p>		
<p>L'invention a pour objet des séquences d'ADN codant pour des polypeptides humains ayant une activité protéase et capable d'induire l'apoptose, apparentés à l'enzyme de conversion de l'interleukine-1bêta.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo			SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kazakhstan	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CN	Chine	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TG	Togo
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MC	Monaco	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MD	République de Moldova	UA	Ukraine
ES	Espagne	MG	Madagascar	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	ML	Mali	UZ	Ouzbékistan
FR	France	MN	Mongolie	VN	Viet Nam
GA	Gabon				

DNA SEQUENCES CODING FOR THE HUMAN PROTEINS TX AND TY RELATED TO THE INTERLEUKIN-1BETA CONVERTING ENZYME

5

La présente invention concerne une séquence d'ADN codant pour une nouvelle protéine humaine Tx apparentée à l'enzyme de conversion de l'interleukine-1bêta, la protéine Tx, leur procédé de production, les compositions pharmaceutiques la
10 contenant et leurs applications comme médicaments.

L'interleukine-1bêta (IL-1 β) est une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans la pathogénie de multiples maladies inflammatoires aiguës ou chroniques telles que la polyarthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires des
15 intestins ou le choc septique (Dinarello et al., 1992, Immunological Reviews, 127, 119-146).

Les monocytes et les macrophages humains synthétisent l'IL-1 β sous forme d'un précurseur inactif de 31kDa (pIL-1 β). Le pIL-1 β ne possède pas de séquence signal conventionnelle
20 et ne peut être secrété efficacement par la cellule qu'après coupure entre l'acide aspartique 116 et l'alanine 117. Cette coupure, qui génère la forme IL-1 β active de 17kDa, est effectuée par une enzyme spécifique appelée interleukine-1bêta converting enzyme (ICE) (Thornberry et al., 1992,
25 Nature, 356, 768-774 ; Cerretti et al., 1992, Science, 256, 97-100). Cette enzyme a été caractérisée et clonée chez l'homme et chez la souris (Nett et al., 1992, Journal of Immunology, 149, 3254-3259 ; Molineaux et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 1809-1813). C'est une cystéine
30 protéase unique qui ne présente pas d'homologie avec les autres thiol-protéases connues. Elle possède également une spécificité particulière pour certaines liaisons peptidiques Asp-X de la pIL-1 β .

L'enzyme ICE est composée de deux sous-unités de 20kDa
35 (p20) et 10kDa (p10) dont l'association est nécessaire à l'activité enzymatique. Ces sous-unités proviennent du clivage protéolytique d'une forme pro-enzyme de 45kDa (p45). L'enzyme ICE elle-même est capable de cliver son précurseur

p45 ou la forme p30 de 30 kDa, qui ne possède pas les 119 acides-aminés de la partie N-terminale de la pro-enzyme, en forme p20 plus p10 active. La séquence complète de p45 a été caractérisée par son ADNc ainsi que la séquence en acides
5 aminés (Thornberry et al. déjà cité). La caractérisation du gène de l'ICE humain a été décrite (Cerretti et al., 1994, Genomics, 20, 468-473).

Des travaux récents ont mis en évidence un rôle possible de l'ICE dans la régulation de la mort cellulaire programmée
10 ou apoptose (Yuan et al., 1993, Cell, 75, 641-652). En effet, l'ICE présente une homologie de 28 % avec Ced-3, une protéine de *C. elegans* impliquée dans l'apoptose, et la surexpression de l'ICE murine dans des fibroblastes de rat déclenche
l'apoptose (Miura et al., 1993, Cell, 75, 653-660). De plus,
15 l'expression de la protéine crmA, une serpine virale inhibitrice de l'ICE, dans des neurones ganglionnaires de poulet transfectés protège ces cellules de la mort par apoptose induite par la suppression de facteur de croissance (nerve growth factor) (Gagliardini et al., 1994, Science, 263, 826-
20 828). Ces observations suggèrent que l'ICE ou des homologues de cette protéine pourraient être impliqués dans la régulation de la mort cellulaire programmée observée notamment dans les maladies neuronales dégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson ainsi que dans les
25 ischémies cérébrales (Barinaga, M, Science, 259, 762, 1993).

La mise en évidence de nouvelles protéines apparentées à l'ICE jouant un rôle soit dans la maturation de l'IL-1 β soit dans l'apoptose peut contribuer au développement de nouveaux agents thérapeutiques ou diagnostiques dans des situations
30 dans lesquelles l'IL-1 β ou l'apoptose sont impliquées.

La présente invention concerne une nouvelle protéine humaine Tx qui présente une homologie de 52 % environ avec le précurseur humain p45 de l'ICE et qui ne permet pas la maturation du précurseur de l'IL-1 β en cytokine active. La
35 protéine Tx possède deux fonctions inattendues : d'une part, c'est une protéase et elle est notamment capable de cliver le précurseur p30 de l'ICE en sous-unités p10 et p20 et d'autre part, elle est capable d'induire l'apoptose dans des

cellules, par exemple dans des cellules Cos transfectées.

Ces propriétés biologiques permettent de prévoir l'utilisation de la protéine Tx dans le traitement de situations pathologiques qui répondent à l'IL-1 β ou dans lesquelles 5 l'apoptose intervient.

La présente invention concerne aussi une nouvelle protéine humaine Ty qui présente une homologie supérieure à 70 % avec la protéine Tx. La protéine Ty est capable d'induire l'apoptose dans des cellules, par exemple des cellules Cos 10 transfectées. La protéine Ty est une protéase qui est capable de s'autoclivrer de façon intermoléculaire.

La présente invention a donc pour objet une séquence d'ADN comprenant une séquence d'ADN codant pour un polypeptide humain ayant une activité protéase et ayant la séquence 15 nucléotidique de la séquence SEQ ID N° 1 :

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

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

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

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

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

CTG CCT CCG AGG AAT GGA GCT GAC TTT GAC ATC ACA GGG ATG AAG GAG 533
 Leu Pro Pro Arg Asn Gly Ala Asp Phe Asp Ile Thr Gly Met Lys Glu
 150 155 160

20 CTA CTT GAG GGT CTG GAC TAT AGT GTA GAT GTA GAA GAG AAT CTG ACA 581
 Leu Leu Glu Gly Leu Asp Tyr Ser Val Asp Val Glu Glu Asn Leu Thr
 165 170 175 180

25 GCC AGG GAT ATG GAG TCA GCG CTG AGG GCA TTT GCT ACC AGA CCA GAG 629
 Ala Arg Asp Met Glu Ser Ala Leu Arg Ala Phe Ala Thr Arg Pro Glu
 185 190 195

CAC AAG TCC TCT GAC AGC ACA TTC TTG GTA CTC ATG TCT CAT GGC ATC 677
 30 His Lys Ser Ser Asp Ser Thr Phe Leu Val Leu Met Ser His Gly Ile
 200 205 210

CTG GAG GGA ATC TGC GGA ACT GTG CAT GAT GAG AAA AAA CCA GAT GTG 725
 Leu Glu Gly Ile Cys Gly Thr Val His Asp Glu Lys Lys Pro Asp Val
 35 215 220 225

CTG CTT TAT GAC ACC ATC TTC CAG ATA TTC AAC AAC CGC AAC TGC CTC 773
 Leu Leu Tyr Asp Thr Ile Phe Gln Ile Phe Asn Asn Arg Asn Cys Leu
 230 235 240

40 AGT CTG AAG GAC AAA CCC AAG GTC ATC ATT GTC CAG GCC TGC AGA GGT 821
 Ser Leu Lys Asp Lys Pro Lys Val Ile Ile Val Gln Ala Cys Arg Gly
 245 250 255 260

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

ainsi qu'une séquence d'ADN comprenant une séquence d'ADN
codant pour un polypeptide humain ayant la capacité d'induire
l'apoptose et ayant la séquence nucléotidique de la séquence
40 SEQ ID N° 1 ci-dessus.

L'invention a particulièrement pour objet une séquence
d'ADN codant pour un polypeptide humain ayant une activité
protéase et capable d'induire l'apoptose et ayant la séquence
nucléotidique de la séquence SEQ ID N° 1 ci-dessus.

La séquence d'ADN ci-dessus qui code pour une protéine ayant 377 acides aminés est une séquence d'ADNc qui peut être obtenue par amplification par PCR, à partir d'ARN de monocytes activés par le LPS ou de polynucléaires ou de placenta humains, grâce à des oligonucléotides dérivés de la séquence de l'ICE et de la séquence de gènes homologues préalablement identifiés, selon des conditions opératoires dont une description détaillée est donnée plus loin.

La mise en évidence de l'activité protéase ainsi que celle de la capacité à induire l'apoptose sont illustrées plus loin dans la partie expérimentale.

L'invention a plus particulièrement pour objet une séquence d'ADN codant pour un polypeptide humain ayant une activité protéase et capable d'induire l'apoptose ayant la séquence commençant au nucléotide 42 et se terminant au nucléotide 1172 de la séquence SEQ ID N° 1 ainsi que les séquences d'ADN qui hybrident avec celle-ci et ayant la même fonction.

Par séquences qui hybrident, on inclut les séquences d'ADN qui hybrident sous des conditions de forte stringence et qui codent pour un polypeptide ayant la même activité. Les conditions de stringence comprennent par exemple une hybridation à 65°C, pendant 18 heures dans une solution 5X SSPE ; 10X Denhardt ; 100 µg/ml DNase ; 1 % SDS suivie de 3 lavages pendant 5 minutes avec 2X SSC ; 0,05 % SDS, puis 3 lavages pendant 15 minutes à 65°C dans 1X SSC ; 0,1 % SDS, selon Maniatis et al., Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

L'invention a tout particulièrement pour objet la séquence d'ADN ayant la séquence commençant au nucléotide 42 et se terminant au nucléotide 1172 de la séquence SEQ ID N° 1.

La connaissance de la séquence SEQ ID N° 1 permet de reproduire la présente invention par exemple par les méthodes connues de synthèse chimique ou par criblage d'une banque génomique ou d'une banque d'ADNc à l'aide de sondes d'oligonucléotides de synthèse par les techniques connues d'hybridation.

L'invention concerne aussi un polypeptide humain ayant

une activité protéase et capable d'induire l'apoptose et
ayant la séquence en acides aminés de la séquence SEQ ID N° 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

45

expression dans une cellule hôte, celle-ci est réalisée selon les méthodes connues de génie génétique et de culture cellulaire.

L'expression peut être réalisée dans une cellule proca-
5 ryote, par exemple E. coli ou dans une cellule eucaryote, par exemple une cellule Cos contenant la séquence d'ADN codant pour le polypeptide de l'invention précédée d'une séquence promoteur convenable.

L'invention concerne notamment un polypeptide selon
10 l'invention tel qu'obtenu par l'expression dans une cellule hôte eucaryote.

L'invention concerne tout spécialement un polypeptide selon l'invention dont l'activité protéase correspond à la capacité de maturer l'enzyme de conversion de l'IL-1bêta.
15 Un exemple de détermination de cette activité protéase particulière est décrit plus loin.

L'invention a aussi pour objet un vecteur d'expression comprenant une séquence d'ADN codant pour un polypeptide humain ayant une activité protéase et capable d'induire
20 l'apoptose ainsi qu'une cellule hôte transformée par un vecteur ci-dessus.

Les vecteurs d'expression sont des vecteurs connus permettant l'expression de la protéine sous le contrôle d'un promoteur convenable. Pour les cellules procaryotes, le
25 promoteur peut être par exemple le promoteur lac, le promoteur trp, le promoteur tac, le promoteur β -lactamase ou le promoteur PL. Pour les cellules de levure, le promoteur peut être par exemple le promoteur PGK ou le promoteur AD. Pour les cellules de mammifères, le promoteur peut être par exem-
30 ple le promoteur SV40 ou les promoteurs de l'adénovirus. Des vecteurs type Baculovirus peuvent être aussi utilisés pour l'expression dans des cellules d'insectes.

Les cellules hôtes sont par exemple des cellules proca-
ryotes ou des cellules eucaryotes. Les cellules procaryotes
35 sont par exemple E. coli, Bacillus ou Streptomyces. Les cellules hôtes eucaryotes comprennent des levures ainsi que des cellules d'organismes supérieurs, par exemple des cellules de mammifères ou des cellules d'insectes. Les cellules de

mammifères sont par exemple des fibroblastes tels que des cellules CHO ou BHK de hamster et des cellules Cos de singe. Les cellules d'insectes sont par exemple des cellules SF9.

L'invention concerne un procédé qui comprend l'expression de la protéine Tx dans une cellule hôte transformée par un ADN codant pour la séquence en acides aminés de la séquence SEQ ID N° 2 et notamment un procédé dans lequel la cellule hôte est une cellule eucaryote.

L'invention a aussi pour objet des anticorps dirigés contre le polypeptide selon l'invention.

Les anticorps polyclonaux ou monoclonaux de l'invention peuvent être préparés selon les méthodes connues et peuvent être utilisés par exemple pour le dosage de la protéine Tx, par exemple dans un test ELISA et comme agents de diagnostic.

La nouvelle protéine Tx de l'invention a de remarquables propriétés biologiques, en particulier une activité protéase, notamment la capacité à maturer l'enzyme de conversion de l'IL-1 β ainsi que la capacité à induire l'apoptose, comme le montrent les résultats donnés plus loin.

Ces propriétés biologiques rendent la protéine Tx de l'invention utilisable par exemple dans le traitement des maladies autoimmunes, dans la cicatrisation des plaies ou dans la réduction des effets secondaires aux traitements par irradiation dans lesquels l'IL-1 β est impliquée ou par exemple dans le domaine des cancers et de l'infection dans lesquels l'apoptose intervient.

La présente invention a donc pour objet, à titre de médicament, le polypeptide selon l'invention.

L'invention s'étend aux compositions pharmaceutiques renfermant comme principe actif un médicament défini ci-dessus et concerne particulièrement les compositions pharmaceutiques pour moduler la production d'IL-1 β ou pour moduler l'apoptose.

Le principe actif peut être incorporé à des excipients usuels pour la préparation des compositions pharmaceutiques ci-dessus. Les compositions peuvent être administrées par voie parentérale, orale ou locale.

Les polypeptides de l'invention permettent aussi

d'envisager de nouveaux agents thérapeutiques constitués d'inhibiteurs de ces polypeptides et leur utilisation comme médicament, par exemple dans le traitement de l'inflammation associée à des maladies autoimmunes, le choc septique ou les 5 maladies neurodégénératives.

L'invention a aussi pour objet une séquence d'ADN hybridant avec la séquence d'ADN commençant au nucléotide 42 et se terminant au nucléotide 1172 de la séquence SEQ ID N° 1 et ayant la même fonction.

10 L'hybridation est obtenue par exemple dans un tampon 5xSSC, 10xDenhardt, 100 microg/ml ADN de sperme de saumon, 1 % SDS pendant une nuit à 65°C. Les lavages sont ensuite effectués par exemple dans un tampon 1xSSC, 0,1 % SDS, deux fois 30 mn à 60°C.

15 L'invention concerne particulièrement la séquence d'ADN codant pour un polypeptide ayant une activité protéase et capable d'induire l'apoptose et ayant la séquence nucléotidique de la séquence SEQ ID N° 22 et plus particulièrement la séquence commençant au nucléotide 104 et se terminant au 20 nucléotide 1195 de la séquence SEQ ID N° 22.

La séquence d'ADN SEQ ID N° 22 ci-dessus, qui code pour une protéine ayant 364 acides aminés, est une séquence d'ADNc qui peut être obtenue, par exemple, par amplification par PCR, à partir d'ADNc de rate ou de placenta humains, grâce à 25 des oligonucléotides dérivés de la séquence ADNc Tx (SEQ ID N° 1). Un exemple détaillé de préparation est donné plus loin dans la partie expérimentale. La connaissance de la séquence SEQ ID N° 22 permet de reproduire la présente invention par exemple par les méthodes connues de synthèse chimique ou de 30 criblage de banques génomiques ou de banques d'ADNc à l'aide de sondes d'oligonucléotides par les techniques d'hybridation.

L'invention a également pour objet un polypeptide humain ayant une activité protéase et capable d'induire l'apoptose 35 et ayant la séquence en acides aminés de la séquence SEQ ID N° 23 et désigné protéine Ty.

Un des aspect de l'invention concerne également un polypeptide selon l'invention tel qu'obtenu par l'expression dans

une cellule hôte d'un ADN codant pour la séquence en acides aminés de la séquence SEQ ID N° 23.

L'invention comprend aussi les cellules hôtes, les vecteurs d'expression qui permettent d'obtenir l'expression de la protéine Ty et dont des exemples ont été indiqués ci-dessus pour l'expression de la protéine Tx.

L'invention concerne aussi un procédé qui comprend l'expression de la protéine Ty dans une cellule hôte transformée par un ADN codant pour la séquence en acides aminés de la séquence SEQ ID N° 23.

L'invention comprend aussi les anticorps polyclonaux ou les anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine Ty.

L'invention concerne aussi les compositions pharmaceutiques renfermant la protéine Ty à titre de médicament.

Les figures ci-annexées illustrent certains aspects de l'invention :

La figure 1 représente la détection de séquences homologues à l'ICE par Southern Blot dans l'ADN génomique humain issu de PBMC digéré par les enzymes de restriction BglII (ligne A) ; PstI (ligne B) ; HindIII (ligne C) ; BamHI (ligne D). La détection est faite par hybridation avec une sonde ICE exon 6 marquée au ³²P.

La figure 2 représente la séquence nucléotidique de l'exon 6 du gène T2 (SEQ ID N° 5).

La figure 3 représente la séquence nucléotidique de l'ADNc Tx (SEQ ID N° 1) et la séquence en acides aminés correspondante (SEQ ID N° 2).

La figure 4 représente la détection d'ARNm Tx par Northern Blot dans les tissus de la rate (ligne A) ; du thymus (ligne B) ; de la prostate (ligne C) ; du testicule (ligne D) ; de l'ovaire (ligne E) ; de l'intestin grêle (ligne F) ; du colon (ligne G) ; des leucocytes périphériques (ligne H). La détection est faite par hybridation avec une sonde "Tx exon 6" marquée au ³²P.

La figure 5 représente la sécrétion de l'IL-1 β mature dans des cellules Cos-1 contenant constitutivement le pIL-1 β et transfectées avec le vecteur pcDL-SR α 296 contenant ICE p45 (ligne 2) ou Tx (ligne 3), le vecteur pcDL-SR α 296 seul (ligne

4), le vecteur pcDNAI/Amp seul (ligne 5), le vecteur pcDNAI/Amp contenant Tx (ligne 6) ou ICE p30 (ligne 7) comparativement à une culture contrôle sans ADN (ligne 1). L'IL-1 β mature est mesurée en pg/ml de surnageant cellulaire par ELISA (A : incubation 16 heures ; B : incubation 24 heures).

La figure 6 représente le clivage du précurseur ICE p30 dans des cellules Cos-1 transfectées par le vecteur pcDL-SR α 296 seul (ligne A) ou contenant le mutant marqué T7-ICEp30C285S (ligne B) ou cotransfectées avec le vecteur pcDL-SR α 296 contenant le mutant marqué T7-ICEp30C285S et le vecteur contenant ICE p30 (ligne C) ou ICE p45 (ligne D) ou Tx (ligne E). La détection est faite par Western Blot avec l'anticorps anti-T7 avec un contrôle correspondant à une transfection par le vecteur pcDL-SR α 296 contenant Tx seul (ligne F).

La figure 7 représente l'induction de l'apoptose par la protéine Tx dans des cellules Cos-1 transfectées par le vecteur pcDL-SR α 296 seul (7B) ou contenant Tx (7C) ou ICE p45 (7D) comparativement à une culture contrôle sans ADN (7A) après une culture de 22 heures (grossissement x 400).

La figure 8 représente l'ADN des cellules Cos-1 transfectées par le vecteur pcDL-SR α 296 contenant ICE p45 (ligne B) ou Tx (ligne C) ou par le vecteur seul (ligne D) comparativement à une culture contrôle sans ADN (ligne A). La détection est faite par coloration avec le BET après migration sur un gel d'agarose avec des marqueurs de taille ADN de phage lambda digéré par HindIII (M1) et ADN de phage ϕ X174 digéré par HindIII (M2).

La figure 9 représente le clivage de la protéine Ty mutée (T7TY Δ 67C245S) dans des cellules Cos-1, soit transfectées par le vecteur pcDL-SR α 296 seul (ligne B) ou le vecteur pcDNAI/Amp seul (ligne C) ou le vecteur pT7TY Δ 67C245S (ligne E), soit co-transfectées par le vecteur pT7TY et le vecteur pT7TY Δ 67C245S (ligne F ; 23 heures et ligne G ; 43 heures). La détection est faite par Western Blot comparativement à une culture contrôle sans ADN (ligne A) et des marqueurs de poids moléculaires (ligne D ; non détectables).

Les exemples suivants illustrent l'invention sans la

limiter.

Exemple 1 : Identification de la séquence Tx

A - Mise en évidence de gènes homologues à l'ICE humaine

Des gènes homologues à l'ICE ont été identifiés par
5 Southern Blot en utilisant une sonde d'ADN correspondant à
l'exon 6 du gène de l'ICE.

a) Préparation de la sonde ICE exon 6

Les limites de l'exon 6 de l'ICE humain ont été décrites
ainsi que l'organisation intron/exon complète du gène ICE
10 humain (Cerretti et al. déjà cité). L'exon 6 (235 pb) corres-
pond aux nucléotides 635 à 868 de la séquence ADNc p45 de
l'ICE décrite (Thornberry et al. déjà cité).

La sonde ICE exon 6 a été préparée par amplification par
PCR avec les oligonucléotides suivants :

15

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

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

qui ont été choisis en utilisant les données publiées
20 (Thornberry et al. déjà cité), synthétisés et utilisés pour
amplifier par RT-PCR l'ARN provenant de monocytes sanguins
humains, extrait et purifié à l'aide d'une trousse RNATM
(Bioprobe), en utilisant les conditions d'amplification
suivantes : Enzyme Biotaq (BioProbe) ; 30 cycles (94°C, 1mn ;
25 60°C, 1mn ; 72°C, 1mn) ; Appareil PCR : Perkin-Elmer (GeneAmp
PCRSytem 9600).

L'ADN exon 6 obtenu a été purifié par centrifugation sur
colonne Spin X (Costar) et marqué au ³²P par la technique
d'amorçage aléatoire ("random priming") au moyen de la
30 trousse Oligolabelling kit (Pharmacia Biotech).

b) Hybridation à l'ADN génomique : Southern Blot

La sonde ICE exon 6 radiomarquée obtenue a été utilisée
comme sonde d'hybridation sur un ADN génomique humain.

L'ADN génomique humain a été préparé à partir de
35 cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) avec la
trousse TurboGen (Invitrogen) puis coupé respectivement par
les enzymes de restriction BglII, PstI, HindIII ou BamHI
(Boehringer Mannheim), migré sur un gel d'agarose 0,9 % en 1x

TAE, transféré sur une membrane de nylon GeneScreen Plus (NEN Dupont) puis hybridé avec la sonde ICE exon 6.

Les conditions d'hybridation sont celles décrites par Maniatis et al. (déjà cité) réalisées dans 5x SSPE, 10x

5 Denhart, 100 µg/ml DNAss, 1 % SDS, une nuit à 65°C suivie de lavages réalisés successivement dans 2x SSC, 0,05 % SDS, 30 mn à température ambiante puis 1x SSC, 0,1 % SDS, 30 mn à 65°C, ce qui correspond à une forte stringence. Le tampon de lavage est préparé à partir des solutions stocks suivantes

10 . 20x SSC : solution aqueuse 3M Chlorure de Sodium, 0,3 M Citrate de Sodium

. 10 % SDS : solution aqueuse de Dodécyl Sulfate de Sodium,

Après lavage, la membrane est exposée avec un film Hyperfilm-MP (Amersham).

15 Comme le montre la figure 1, pour chacune des enzymes de restriction on observe trois à quatre bandes différentes correspondant à des fragments d'ADN de taille différente qui vraisemblablement, pour certains d'entre eux, correspondent à des gènes fortement homologues à l'ICE mais différents de ce

20 dernier puisqu'un gène unique ne peut donner qu'une ou au maximum deux bandes distinctes lors d'une hybridation avec une sonde correspondant à un seul exon.

B - Clonage de gènes homologues à l'ICE

a) Clonage de séquences génomiques homologues à l'ICE

25 Pour identifier les différents fragments d'ADN obtenus ci-dessus, les fragments de l'ADN génomique humain extrait de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) puis digéré par l'enzyme HindIII (Boehringer Mannheim) ont été séparés par électrophorèse préparative en gel d'agarose 1,5 %, 1x

30 TAE, selon les conditions décrites par Maniatis et al. (déjà cité). Le gel a été découpé en 20 fractions dans la zone correspondant aux poids moléculaires inférieurs à 2,3kb puis une amplification par PCR a été effectuée sur l'ADN élué de chacune des fractions à l'aide des oligonucléotides ICE 6.5

35 (SEQ ID N° 3) et ICE 6.3 (SEQ ID N° 4) décrits ci-dessus, en utilisant les conditions d'amplification suivantes : 94°C, 1 mn ; 55°C, 1 mn ; 72°C, 1 mn ; 30 cycles ; polymérase BioTaq.

Parmi les 20 fractions ci-dessus, huit fractions ayant donné la meilleure amplification par PCR ont été retenues. Le matériel amplifié a été cloné grâce à l'enzyme T4-DNA ligase dans le vecteur pCRII selon les instructions du fournisseur avec la trousse TA Cloning kit (Invitrogen) et séquencé par la technique de Sanger avec l'enzyme Sequenase en utilisant le matériel d'électrophorèse MacroPhor (Pharmacia System). Les séquences déterminées ont été analysées au moyen des logiciels GCG (Devereux et al. Nucleic Acids Research 12, 387-395 (1984)).

Parmi les séquences nucléotidiques obtenues, nous avons identifié une séquence appelée T2 qui présente 92 % d'identité en nucléotides avec la séquence de l'exon 6 de ICE.

La séquence nucléotidique T2 présente une phase de lecture ouverte sur l'ensemble de l'exon 6 (SEQ ID N° 5) représenté à la figure 2, qui conduit à chercher à identifier des ARN messagers codant pour une protéine T2 et à cloner l'ADNc correspondant à T2.

b) Clonage d'ADNc homologue à l'ICE

Les ARN totaux ont été extraits et purifiés à l'aide d'une trousse RNATM (Bioprobe) à partir, soit de monocytes activés par le LPS pendant 18 heures, soit de placenta, soit de polynucléaires isolés du sang périphérique. Chaque ADNc correspondant a été synthétisé à l'aide d'un oligonucléotide poly-dT et de l'enzyme transcriptase réverse en utilisant la trousse GeneAmp RNA PCR Kit (Perkin Elmer) selon les instructions du fournisseur puis amplifié par PCR en utilisant les deux oligonucléotides suivants :

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

choisi dans la séquence codante de l'exon 6 de T2, de façon à amplifier spécifiquement une séquence de type T2 mais non une séquence ICE, et

35

ICE45.3 TTAATGTCCTGGGAAGAGGTAGAA (SEQ ID N° 7)

choisi dans l'extrémité 3' de la région codante de l'ADNc de

l'ICE (brin complémentaire).

Un fragment de 600 paires de bases environ a été obtenu respectivement à partir de chacune des 3 préparations d'ARN en utilisant les conditions d'amplification suivantes : 94°C, 5 30 s ; 60°C, 30 s ; 72°C, 30 s ; 30 cycles avec la trousse GeneAmp RNA PCR Kit (Perkin Elmer). Le fragment a été cloné en utilisant la trousse TA Cloning kit (Invitrogen) et séquencé comme indiqué ci-dessus. La séquence nucléotidique ainsi déterminée ne correspond pas à un ADNc T2 attendu mais 10 à un nouvel ADNc que nous avons nommé Tx.

C - Identification de l'ADNc Tx

a) Détermination de la séquence consensus de l'ADNc Tx

Les séquences nucléotidiques des extrémités 5' et 3' de l'ADNc de Tx ont été obtenues par la technique de PCR ancrée 15 à partir d'un ADNc de placenta.

L'extrémité 5' de l'ADNc de Tx été amplifiée en utilisant la trousse 5'-Race-Ready cDNA (Human Quick-Clone cDNA) (Clontech) et les oligonucléotides d'amplification suivants :

20 TxPCR5A : GAGGCAGTTG CGTTGTGA A (SEQ ID N° 8)

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

L'extrémité 3' de l'ADNc Tx a été amplifiée en utilisant 25 le kit 3' RACE System (Gibco-BRL), et les oligonucléotides d'amplification suivants :

TxA : AACTGTGCAT GATGAGA (SEQ ID N° 10)

30 TxB : AGATGCTGTG TACAAGACC (SEQ ID N° 11)

Ces deux paires d'amorces respectives ont été définies à partir de la séquence partielle de Tx obtenue ci-dessus.

Les fragments d'amplification obtenus ont ensuite été 35 clonés en utilisant la trousse TA Cloning kit (Invitrogen) et séquencés comme indiqué ci-dessus.

Les séquences nucléotidiques ont été confirmées grâce à l'utilisation des oligonucléotides TxA (SEQ ID N° 10) et TxB

(SEQ ID N° 11) ci-dessus et les oligonucléotides suivants :

- TxC : GCCTGGACAA TGATGAC (SEQ ID N° 12)
- 5 TxD : TGATGAAGAT AGAGCCC (SEQ ID N° 13)
- Tx1 : CGGGTCATGG CAGACTC (SEQ ID N° 14)
- Tx2 : GTTTGAAGAA GCATTTG (SEQ ID N° 15)
- 10 Tx3 : CCTGAGTCAG GAGAATC (SEQ ID N° 16)
- Tx4 : AGTCTCAGGA ATTCTTC (SEQ ID N° 17)
- 15 Tx5 : AGCTGACTTT GACATCA (SEQ ID N° 18)
- Tx6 : GCGCTGACTC CATATCC (SEQ ID N° 19)

qui ont été choisis dans la séquence codante de Tx (brin
20 codant ou brin complémentaire).

La compilation de l'ensemble des séquences obtenues
donne la séquence nucléotidique consensus de l'ADNc Tx (SEQ
ID N° 1) représentée à la figure 3. La séquence ainsi déter-
minée comporte 1291 nucléotides se terminant par une séquence
25 de polyadénylation. Elle présente une phase de lecture
ouverte débutant par une méthionine initiatrice au nucléotide
42 et se terminant par un codon de terminaison au nucléotide
1172. Il en résulte une phase de lecture ouverte de 1131
nucléotides codant pour une protéine de 377 acides aminés.

30 **b - Clonage de la région codante de l'ADNc Tx :**

La région codante de l'ADNc Tx (SEQ ID N° 1) a été
amplifiée par RT-PCR à partir d'ARN total soit de monocytes,
soit de polynucléaires ou soit de placenta en utilisant les
oligonucléotides suivants :

35

- TxP5 : CGCGGATCCACCATGGCAGAAGGCAACCACAGA
(SEQ ID N° 20)

TxP3 : GGCTCTAGACTCGAGTTATCAATTGCCAGGAAAGAGGTA
(SEQ ID N° 21)

Ces amorces d'amplification ont été choisies d'après la
5 séquence consensus ADNc Tx précédemment déterminée (ou le
brin complémentaire) et synthétisées en ajoutant des sites de
clonage respectivement BamH1 et Nco1 pour l'oligonucléotide
TxP5 et Xba1 et Xho1 pour l'oligonucléotide TxP3.

Le produit amplifié obtenu ayant une longueur d'environ
10 1150 paires de bases a été digéré par les enzymes BamH1 et
Xba1 (Boehringer Mannheim) et cloné, en utilisant la trousse
de ligation Amersham, dans le vecteur pcDNAI/Amp (Invitrogen)
préalablement digéré par les mêmes enzymes de restriction
BamH1 et Xba1. Le produit cloné a été entièrement séquencé
15 sur les deux brins, au moyen des oligonucléotides TxA, TxB,
TxC, TxD, Tx1, Tx2, Tx3, Tx4, Tx5 et Tx6 ci-dessus.

Pour chaque ARN de départ utilisé, la séquence
nucléotidique obtenue est identique à la séquence codante de
la séquence consensus ADNc Tx (SEQ ID N° 1) ci-dessus. On
20 n'observe donc pas de différence à partir des différents
tissus utilisés provenant d'individus différents.

La région codante de l'ADNc Tx code pour la protéine Tx
dont la séquence déduite en acides aminés (SEQ ID N° 2) est
montrée à la figure 3. La séquence de la protéine Tx comprend
25 377 acides aminés ayant un poids moléculaire calculé de
43,26 kDa.

L'homologie de la séquence de la protéine Tx avec le précur-
seur ICE p45 est au maximum de 52 % d'identité en acides
aminés en introduisant des discontinuités dans l'alignement
30 des séquences.

Un échantillon de E. coli XL-1 blue contenant la région
codante de l'ADNc Tx (SEQ ID N° 1) dans le vecteur pcDNAI/Amp
(cDNA Tx/pcDNAI 13/07/94) a été déposé à la CNCM le
29 juillet 1994 sous le numéro I-1462.

35 c - Expression de l'ARNm de Tx dans différents tissus humains :

L'expression de l'ARNm codant pour la protéine Tx a été
étudiée dans huit tissus différents par Northern Blot en

utilisant une sonde d'ADN correspondant à la partie de Tx s'alignant avec l'exon 6 de l'ICE ("Tx exon 6"). Cette sonde correspond aux nucléotides 595 à 811 de la séquence SEQ ID N° 1.

5 La sonde "Tx exon 6" a été préparée en amplifiant cette séquence à partir du plasmide contenant l'ADNc Tx en utilisant comme amorces les oligonucléotides T2.A (SEQ ID N° 6) et TxC (SEQ ID N° 12) ci-dessus.

Cette sonde a été marquée au ^{32}P par la méthode
10 d'amorçage aléatoire "random priming" avec la trousse Oligo-labelling kit (Pharmacia BioTech) puis utilisée pour détecter par hybridation des ARNm Tx sur une membrane contenant 2 μg d'ARN polyA+ respectivement de différents tissus humains sur une membrane Multiple Tissue Northern Blot II (Clontech)
15 selon les conditions d'hybridation données par le fournisseur.

Comme le montre la figure 4, un signal d'ARNm est détecté dans la plupart des tissus testés avec des intensités variables. Les leucocytes du sang périphérique (H) donnent le
20 signal le plus fort. La rate (A), l'intestin grêle (F), le thymus (B) et l'ovaire (E) donnent des signaux intermédiaires. La prostate (C) et le colon (G) donnent un signal très faible et enfin aucun signal n'est détecté dans l'ARNm de testicule (D).

25 L'ARNm codant pour la protéine Tx est donc exprimé dans de nombreux tissus et tout particulièrement dans les cellules sanguines.

Exemple 2 : Etude de la fonction de la protéine Tx

A - Clivage de la pre-IL-1 β

30 La capacité de la protéine Tx à cliver éventuellement le précurseur de l'IL-1 β humaine a été testée dans un système de transfection en cellules eucaryotes avec l'un ou l'autre des vecteurs d'expression pcDNAI/Amp et pcDL-SR α 296.

La région codante de l'ADNc Tx (SEQ ID N° 1) a d'abord
35 été clonée aux sites BamH1 et Xba1 du vecteur d'expression eucaryote pcDNAI/Amp (Invitrogen). Après digestion avec les enzymes BamH1 et Xba1, un insert de 1150 paires de bases environ a été isolé puis purifié. Les sites de restriction

des extrémités ont été remplies à l'aide de la T4 DNA Polymé-
rase (Boehringer Mannheim). L'ADNc obtenu a été sous-cloné à
l'aide d'une trousse de ligation (Amersham) dans le vecteur
pcDL-SR α 296 (Takebe et al., Molecular and Cellular Biology,
5 Vol 8, 466, 1988) ouvert par l'enzyme Xba1 puis dont les
extrémités ont été remplies par la T4 DNA Polymérase. Après
purification en utilisant la trousse plasmid maxi kit
(QIAGEN), des préparations d'ADN plasmidique Tx dans les deux
vecteurs ont été obtenues.

10 Les cellules eucaryotes utilisées pour la transfection
sont une lignée cellulaire Cos-1 qui exprime constitutivement
la pIL-1 β et qui a été obtenue par transfection d'un plasmide
contenant le gène de la pIL-1 β humaine. La synthèse de pIL-1 β
est maintenue dans cette lignée en cultivant les cellules en
15 présence de 0,5 mg/ml de sulfate de G-418 dans le milieu de
culture DMEM, SVF 10 %, glutamine, P/S, pyruvate, HEPES.

3×10^6 cellules Cos-1 sont incubées à 37°C en atmosphère
humide à 5 % de CO₂ dans des boîtes de Pétri et transfectées
avec 15 μ g d'ADN plasmidique préalablement mélangé à 200 μ l
20 de DEAE-Dextran et dilué avec 4 ml de PBS avant d'être ajouté
dans les boîtes. Après incubation des cellules à 37°C pendant
30 minutes et addition de 8 ml d'une solution de chloroquine
80 μ M en DMEM sans sérum, les cellules sont incubées pendant
2,5 heures. La solution surnageante est ensuite aspirée et
25 les cellules sont traitées pendant deux minutes avec du DMSO
à 10 % dans du DMEM sans sérum. Après lavage avec le milieu
sans sérum, 10 ml de milieu de culture complet ci-dessus sont
ajoutés. Après incubation, le surnageant des cellules trans-
fectées est récolté à différents temps compris entre 16 et
30 45 heures.

L'IL-1 β mature présente dans les surnageants est mesurée
par un test ELISA IL1- β (R&D Systems) qui permet la détection
spécifique de l'IL-1 β mature.

La transfection a été réalisée avec la région codante de
35 l'ADNc Tx inséré dans l'un ou l'autre des deux vecteurs ci-
dessus en comparaison avec des transfections comprenant
respectivement la région codante de l'ADNc de ICE p45 ou de
ICE p30 ainsi qu'une transfection témoin avec le vecteur seul

correspondant ne contenant pas de plasmide.

Comme le montre la figure 5, la transfection de l'ADNc de l'ICE p45 (colonne 2) ou p30 (colonne 7) confère aux cellules la capacité à sécréter de l'IL-1 β mature. Par 5 contre, lorsque l'ADNc Tx est transfecté dans les mêmes conditions (colonnes 3 et 6), on n'observe pas d'IL-1 β sécrétée comme pour les transfusions contrôles (colonnes 1, 4, 5). Des résultats semblables sont obtenus avec les deux vecteurs d'expression quelque soit le temps d'incubation 10 (16 h : fig. 5A ; 24 h : fig. 5B ; 29 h et jusqu'à 44 h) après la transfection.

La protéine Tx ne possède pas la propriété de convertase de l'IL-1 β .

B - Activité protéase de la protéine Tx : Clivage du précur- 15 seur 30 kDa de ICE

La capacité de la protéine Tx à cliver éventuellement le précurseur 30 kDa de l'ICE (ICE p30) a été testée dans un système de co-transfection dans des cellules eucaryotes en introduisant simultanément dans des cellules Cos-1 un vecteur 20 contenant la région codante de l'ADNc Tx (SEQ ID N° 1) et un vecteur contenant un ADN codant pour une protéine ICE modifiée, chaque ADN étant respectivement inséré dans le vecteur d'expression pcDL-SR α 296 ci-dessus.

La protéine ICE a été doublement modifiée : D'une part, 25 pour permettre une détection spécifique de la protéine ICE en présence de la protéine Tx, un petit peptide T7 a été fusionné à l'extrémité N terminale de la protéine ICE p30. La protéine ainsi marquée ou ses produits de maturation est détectable par Western Blotting avec un anticorps monoclonal 30 spécifique du peptide T7 (Tsai et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 89, 8864, 1992). D'autre part pour exprimer l'enzyme sous une forme incapable d'induire sa propre maturation, un mutant de l'ICE p30, dont la cystéine Cys 285 du site actif a été remplacée par une sérine, a été utilisé (Wilson, K.P. et 35 al. Nature, 370, 28 July 1994, 270-275). Cette enzyme est alors inactive et incapable d'induire sa propre maturation ou de cliver la pIL-1 β . Le mutant a été préparé par mutagenèse dirigée à l'aide d'oligonucléotides appropriés et de la

trousse de mutagénèse TransformerTM site-directed mutagenesis kit (Clontech). La séquence obtenue a été entièrement vérifiée. On a ainsi obtenu l'ICE p30 marquée et mutée désignée T7-ICEp30C285S.

5 Les cellules Cos-1 ont été transfectées soit par le vecteur pcDL-SR α 296 contenant T7-ICEp30C285S, soit par le vecteur pcDL-SR α 296 contenant Tx ou co-transfectées par les deux vecteurs, en suivant les conditions opératoires ci-dessus. Après 22 heures de culture, les cellules ont été
10 récoltées, lavées et lysées dans un tampon NaCl 10mM, Hepes 10 mM, pH 7.4, EDTA 1 mM, NaF 50 mM, Triton X-100 0,2 %, leupeptine 1 μ g/ml, aprotinine 20 u/ μ l et PMSF 1 mM. Le lysat cellulaire a été centrifugé à 400 g et 4°C puis le surnageant a été soumis à une électrophorèse sur un gel à 16 % de poly-
15 acrylamide en SDS-PAGE. Les protéines du gel ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose et incubées avec l'anticorps monoclonal de souris anti-T7 (Novagen) pendant 2 heures à température ambiante. La membrane a été lavée puis incubée 1 heure à température ambiante avec un
20 anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de souris conjugué à la phosphatase alcaline. Les anticorps fixés à la membrane sont ensuite révélés par le substrat de la phosphatase alcaline (Promega).

Des co-transfections ont été réalisées de la même façon
25 avec le vecteur pcDL-SR α 296 contenant T7-ICEp30C285S et le vecteur pcDL-SR α 296 contenant soit ICE p30, soit ICE p45 à la place de Tx.

Comme le montre la figure 6, lorsque la protéine ICE p30 mutée (T7-ICEp30C285S) est exprimée seule dans les cellules
30 Cos transfectées, la forme T7-p30 de l'enzyme (PM apparent 35 kDa) peut être détectée (ligne B).

L'absence de bande correspondant à la forme p20 montre que l'enzyme mutée est incapable de se cliver. Lorsque les cellules sont co-transfectées avec le vecteur contenant l'enzyme
35 ICE p30 (ligne C) ou p45 (ligne D), on observe une bande à un PM apparent de 26 kDa correspondant au produit de clivage T7-p20 par l'enzyme active. Lorsque les cellules sont co-transfectées avec le vecteur contenant Tx (ligne E), on observe

également l'apparition d'une bande majoritaire à un PM apparent de 26 kDa accompagnée de deux bandes mineures à environ 31 kDa et 28 kDa. Les différentes bandes correspondent aux produits de clivage de la forme p30 de l'ICE par la protéine Tx exprimée dans les cellules.

Ces résultats montrent que la protéine Tx, d'une part est exprimée dans les cellules Cos transfectées, d'autre part possède une activité protéase. De plus, la protéine Tx est capable de cliver le précurseur 30 kDa de l'ICE et peut ainsi contribuer à la maturation in vivo du pro-enzyme de l'ICE et à la génération de l'enzyme sous forme active.

C - Induction de l'apoptose par la protéine Tx

La capacité de la protéine Tx à induire l'apoptose a été testée par transfection dans des cellules Cos et par examen morphologique des cellules cultivées.

La transfection de l'ICE dans différents types cellulaires entraînant la mort de ces cellules par apoptose a été décrite (Miura et al. déjà cité).

La transfection de cellules Cos-1 par le vecteur pcDL-SR α 296 contenant la région codante de l'ADNc Tx (SEQ ID N° 1) ainsi que la transfection avec le vecteur pcDL-SR α 296 contenant ICE p45 ont été réalisées comme décrit ci-dessus. La morphologie des cellules a été observée après une incubation de 22 heures.

Comme le montre la figure 7, on observe l'apparition de cellules rondes qui se détachent du support et dont l'aspect morphologique est caractéristique des cellules en apoptose dans les cultures de cellules Cos transfectées avec l'ADNc de l'ICE (7D). Le même changement de morphologie est observé dans les cultures de cellules Cos transfectées avec l'ADNc Tx (7C).

Des résultats morphologiques identiques ont été obtenus lorsqu'on utilise le vecteur pcDNAI/Amp ci-dessus pour exprimer ICE et Tx dans les cellules Cos-1 transfectées.

Ces résultats ont été confirmés par l'observation de l'ADN isolé à partir des cellules Cos-1 transfectées et incubées 40 heures après la transfection. L'ADN des cellules a été préparé avec la trousse microTurboGen (Invitrogen),

migré sur gel d'agarose 1,5 % et coloré par le BET.

Comme le montre la figure 8, l'ADN des cellules transfectées par ICE p45 (ligne B) et par Tx (ligne C) présente l'aspect caractéristique "en échelle" de cellules en 5 apoptose.

Des cellules transfectées sans ADN (7A et 8A) ou avec le vecteur ne contenant pas d'ADNc (7B et 8D) ne présentent ni la morphologie ni l'ADN de cellules en apoptose.

Ces résultats montrent que la protéine Tx est impliquée 10 dans l'induction de l'apoptose.

Exemple 3 : Identification de la séquence Ty

A - Clonage de gènes homologues à Tx

L'ADN génomique humain extrait de cellules mononuclées du sang périphérique a été digéré par l'enzyme Hind III 15 (Boehringer Mannheim), puis les fragments ont été séparés par électrophorèse préparative en gel d'agarose 1 %, TAE 1x, selon les conditions décrites par Maniatis et al., déjà cité. Le gel a été découpé en 24 fractions dans la zone du puits de dépôt correspondant aux poids moléculaires supérieurs à 20 1,9 kb puis une amplification par PCR a été effectuée sur l'ADN élué de chacune des fractions à l'aide des oligonucléotides T2A (SEQ ID N° 6) et TxC (SEQ ID N° 12) déjà décrits et en utilisant les conditions d'amplification suivantes : 94°C, 30 sec ; 55°C, 30 sec ; 72°C, 1 mn ; 30 cycles ; polymérase 25 BioTaq (BioProbe).

Parmi les 24 fractions ci-dessus, 10 fractions ayant donné la meilleure amplification par PCR ont été retenues. Le matériel amplifié a été purifié sur gel d'agarose et a été cloné dans le vecteur pCRII avec la trousse TA Cloning kit 30 (Invitrogen) et séquencé par la technique de Sanger avec l'enzyme Sequenase (Version 2.0 DNA Sequencing Kit) en utilisant le système d'électrophorèse MacroPhor (Pharmacia System). Les séquences déterminées ont été analysées au moyen des logiciels GCG comme indiqué à l'exemple 1.

35 Nous avons identifié une séquence nucléotidique appelée Ty qui présente 94,9 % d'identité en nucléotides avec la séquence ADNc Tx (SEQ ID N° 1) et qui conduit à chercher à cloner l'ADNc correspondant à Ty.

B - Clonage et identification de l'ADNc Ty**a) Détermination de la séquence consensus de l'ADNc Ty**

Les séquences nucléotidiques des extrémités 5' et 3' de l'ADNc de Ty ont été obtenues respectivement à partir d'ADNc 5 de rate et de placenta humains par la technique de PCR ancrée.

L'extrémité 3' de l'ADNc de Ty a été amplifiée en utilisant le kit 3'RACE System (Gibco-BRL), et les oligonucléotides d'amplification suivants :

10

Ty 3.2 : CATGTCTCATGGCATCCTA (SEQ ID N° 24) et
Ty 3.1 : CTGCGGAACTGCGCATAAAA (SEQ ID N° 25).

Ces deux amorces ont été définies à partir de la séquence partielle de l'exon 6 de la séquence Ty obtenue ci-dessus. Les fragments amplifiés ont été purifiés sur gel d'agarose, clonés dans le vecteur pCRII et séquencés comme indiqué ci-dessus. La compilation des séquences obtenues a permis de définir la partie 3' de la région codante de l'ADNc Ty ainsi que la région 3' non codante.

L'extrémité 5' de l'ADNc de Ty a été amplifiée en utilisant le kit Human Spleen 5'-RACE-Ready cDNA (Clontech) et les oligonucléotides d'amplification suivants :

25 Ty5A1 : GGCTCTAGACTCGAGGTGCTCTTTGATGTTGACAG (SEQ ID N° 26)
et
Ty5A4 : CTTCTCCTCGTGGATCTTGC (SEQ ID N° 27).

Ces deux amorces ont été définies à partir de la séquence de la région 3' de l'ADNc Ty obtenue ci-dessus en ajoutant des sites de restriction Xba1 et Xho1 pour Ty5A1. Les fragments d'amplification ont ensuite été clonés en utilisant la trousse TA Cloning kit (Invitrogen) et séquencés comme indiqué ci-dessus.

35 Les séquences nucléotidiques ont été confirmées en utilisant des oligonucléotides Ty5A1 (SEQ ID N° 26) et Ty 3.1 (SEQ ID N° 25) ci-dessus et les oligonucléotides suivants :

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

Ces oligonucléotides ont été choisis dans la séquence codante de Ty (brin codant ou brin complémentaire).

15 La compilation de l'ensemble des séquences obtenues donne la séquence nucléotidique consensus de l'ADNc Ty (SEQ ID N° 22).

b) Clonage de la région codante de l'ADNc Ty

20 La région codante de l'ADNc Ty (SEQ ID N° 22) a été amplifiée par PCR à partir de l'ADNc de rate ou de placenta humains en utilisant les kits correspondant 5'-RACE-Ready cDNA (Clontech), l'oligonucléotide Ty5A1 (SEQ ID N° 26) ci-dessus et l'oligonucléotide suivant :

25 TyP5 : CGCGGATCCAAGATGTTGGAATACCTGGGCAAA (SEQ ID N° 39).

Ces amorces d'amplification ont été choisies d'après la séquence consensus de l'ADNc Ty (SEQ ID N° 22) déterminée ci-dessus en ajoutant le site de clonage BamH1 pour TyP5.

30 Le produit amplifié et purifié sur gel d'agarose ayant une longueur d'environ 1100 paires de bases a été digéré par les enzymes de restriction BamH1 et Xba1 puis cloné dans le vecteur pcDNA1/Amp comme décrit à l'exemple 1 et séquencé comme indiqué ci-dessus. Le produit cloné a été entièrement
35 séquencé sur les deux brins à l'aide des oligonucléotides SEQ ID N° 28 à SEQ ID N° 38 définis ci-dessus.

Une séquence identique à la séquence codante de la séquence consensus ADNc Ty (SEQ ID N° 22) a été obtenue.

L'homologie de la séquence codante de l'ADNc Ty avec la séquence codante de l'ADNc Tx obtenu à l'exemple 1 est de 84 % d'identité en nucléotides.

La région codante de l'ADNc Ty code pour la protéine Ty 5 ayant la séquence déduite en acides aminés SEQ ID N° 23. La séquence de la protéine comprend 364 acides aminés ayant un poids moléculaire calculé de 41,8 kDa.

L'homologie de séquence de la protéine Ty avec la protéine Tx obtenue à l'exemple 1 est de 75 % d'identité en 10 acides aminés.

Un échantillon de E. coli XL-1 blue contenant la région codante de l'ADNc Ty (SEQ ID N° 22) dans le vecteur pcDNAI/Amp (cDNA Ty/pcDNAI/Amp 30/6/95) a été déposé à la 15 CNM le 5 juillet 1995 sous le n° I-1068.

Exemple 4 : Activités biologiques de la protéine Ty

A - Induction de l'apoptose :

La capacité de la protéine Ty à induire l'apoptose a été testée selon le mode opératoire indiqué à l'exemple 2, à 20 l'aide de cellules Cos-1 transfectées par le vecteur pcDL-SR α 296 contenant la région codante de l'ADNc Ty (SEQ ID N° 22) dénommé pcDL-TY, et dont la préparation a été réalisée en suivant les conditions décrites à l'exemple 2 pour le sous-clonage de l'ADNc Tx.

25 La morphologie des cellules a été observée après une incubation de 23 heures et de 43 heures et l'observation de l'ADN isolé a été effectuée après une incubation de 43 heures.

Les résultats, obtenus comparativement à des cellules 30 transfectées par le vecteur contenant la région codante de Tx ou de ICE p45, sont identiques à ceux montrés pour la protéine Tx à la figure 7 et à la figure 8 de l'exemple 2.

Ces résultats montrent que la protéine Ty comme la protéine Tx est impliquée dans l'induction de l'apoptose.

35 B - Activité protéase de la protéine Ty :

La capacité de la protéine Ty à s'autoclivrer de façon intermoléculaire a été testée dans un système de co-transfection dans des cellules eucaryotes, dans des conditions analo-

gues à celles décrites pour le clivage du précurseur de l'ICE par la protéine Tx à l'exemple 2, en introduisant simultanément dans des cellules Cos-1 un vecteur contenant la région codante de l'ADNc Ty (SEQ ID N° 22) et un vecteur contenant un ADN codant pour une protéine Ty modifiée, chaque ADN étant inséré respectivement dans le vecteur d'expression pcDL-SR α 296 et dans le vecteur pcDNAI/Amp décrits à l'exemple 2.

La protéine Ty a été doublement modifiée, d'une part le codon Cys 245 a été muté en un codon Serine par la méthode de PCR "chevauchante", d'autre part l'épitope tag T7 (MASMTGGQMG) a été introduit à l'extrémité N-terminale du fragment de Ty correspondant aux résidus 68 à 364 de la séquence SEQ ID N° 23.

Les paires d'amorces suivantes ont été utilisées pour amplifier la matrice ADNc Ty :

a) d'une part,

T7TY :

CGCGGATCCACCATGGCTTCTATGACAGGAGGTCAACAAATGGGACAAAAGATCACCAGTG
20 TAAAACC (SEQ ID N° 40)

choisie dans la séquence codante de Ty et synthétisée en ajoutant un site de restriction BamH1 suivi de la séquence nucléotidique codant pour le tag T7 et

25

TYC245SR :

ATGTTTTTCACCTCTGGAGGCCTGGACAATGATGAC (SEQ ID N° 41)

choisie dans la séquence codante de Ty (brin complémentaire) avec une mutation C -> G en position 17,

b) d'autre part,

TYC245S :

GTCATCATTGTCCAGGCCTCCAGAGGTGAAAAACAT (SEQ ID N° 42)

35

choisie dans la séquence codante de Ty avec une mutation G -> C en position 20 et

Ty5A1 (SEQ ID N° 26) ci-dessus,

et en utilisant les conditions d'amplification suivantes : 94°C, 1 mn ; 60°C, 1 mn ; 72°C, 1 mn ; 30 cycles ; Vent polymérase (Biolabs).

Les deux produits d'amplification obtenus respectivement ont été combinés et amplifiés par PCR en utilisant les amorces T7Ty et Ty5A1 et les conditions ci-dessus.

Le produit d'amplification a été digéré avec les enzymes de restriction BamH1 et Xba1 puis cloné dans le vecteur pcDNAI/Amp digéré au préalable par les mêmes enzymes de restriction. Le plasmide résultant est dénommé pT7TYΔ67C245S. La séquence obtenue a été entièrement vérifiée par séquençage d'ADN.

Le vecteur d'expression pcDL-SRα296 dans lequel a été sous-cloné la séquence d'ADNC Ty (SEQ ID N° 22), dénommé plasmide pcDL-TY, a été préparé comme indiqué ci-dessus.

Les cellules Cos-1 ont été soit transfectées par le vecteur pT7TYΔ67C245S, soit co-transfectées avec ce plasmide et le plasmide pcDL-TY puis cultivées pendant 23 heures ou 43 heures, lysées et analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et Western blot en utilisant l'anticorps monoclonal anti-T7 de souris, selon les conditions opératoires décrites à l'exemple 2, mais dans lesquelles l'anticorps de chèvre anti-immunoglobine de souris est conjugué à la peroxydase de raifort au lieu de la phosphatase alcaline. Les anticorps liés à la membrane sont ensuite révélés avec le système de détection Western ECL (Amersham) par autoradiographie.

Des co-transfections ont été réalisées de la même façon avec le vecteur pcDL-SRα296 seul et le vecteur pcDNAI/Amp seul et les cellules ont été cultivées pendant 23 heures.

Comme le montre la figure 9, lorsque la protéine Ty mutée est exprimée seule dans les cellules Cos transfectées, la forme T7Ty (PM apparent environ 30 kDa) peut être détectée (ligne E). L'absence de bande de PM inférieur montre que la protéine Ty mutée est incapable de s'autoclivrer. Lorsque les cellules sont co-transfectées avec le vecteur contenant Ty (lignes F et G), on observe l'apparition d'une bande majoritaire à un PM apparent de 20 kDa correspondant au produit de

clivage de la protéine Ty mutée par la protéine Ty.

Ces résultats montrent que la protéine Ty d'une part est exprimée dans les cellules Cos transfectées, d'autre part possède une activité protéase et qu'elle est en particulier capable de s'autocliver de façon intermoléculaire.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: ROUSSEL UCLAF
- (B) RUE: 102, Route de Noisy
- (C) VILLE: ROMAINVILLE
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 93230
- (G) TELEPHONE: 49.91.49.91
- (H) TELECOPIE: 49.91.46.10

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Sequence d'ADN codant pour une proteine humaine Tx apparentee a l'enzyme de conversion de l'interleukine-1beta, proteine Tx, procede de production, compositions pharmaceutiques et leurs applications.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 42

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)
+ Corrections sous WORDPERFECT 5.1 pour SEQ ID NO 22 (ix)

(vi) DONNEES DE LA DEMANDE ANTERIEURE:

- (A) NUMERO DE LA DEMANDE: FR 9409567
- (B) DATE DE DEPOT: 02-AUG-1994

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1291 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Homo sapiens

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS

(B) EMBLACEMENT:42..1172

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

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

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

CAA CTC ATC ACA TGC TTC CAG AAA TAT TCT TGG TGC TGC CAC CTA GAG 1061
 Gln Leu Ile Thr Cys Phe Gln Lys Tyr Ser Trp Cys Cys His Leu Glu
 325 330 335 340

GAA GTA TTT CGG AAG GTA CAG CAA TCA TTT GAA ACT CCA AGG GCC AAA 1109
 Glu Val Phe Arg Lys Val Gln Gln Ser Phe Glu Thr Pro Arg Ala Lys
 345 350 355

GCT CAA ATG CCC ACC ATA GAA CGA CTG TCC ATG ACA AGA TAT TTC TAC 1157
 Ala Gln Met Pro Thr Ile Glu Arg Leu Ser Met Thr Arg Tyr Phe Tyr
 360 365 370

CTC TTT CCT GGC AAT TGAAAATGGA AGCCACAAGC AGCCCAGCCC TCCTTAATCA 1212
 Leu Phe Pro Gly Asn
 375

ACTTCAAGGA GCACCTTCAT TAGTACAGCT TGCATATTTA ACATTTTGTA TTTCAATAAA 1272

AGTGAAGACA AAAAAAAAAA 1291

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 377 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Pro Asp Val Leu Leu Tyr Asp Thr Ile Phe Gln Ile Phe Asn Asn
 225 230 235 240

Arg Asn Cys Leu Ser Leu Lys Asp Lys Pro Lys Val Ile Ile Val Gln
 245 250 255

Ala Cys Arg Gly Ala Asn Arg Gly Glu Leu Trp Val Arg Asp Ser Pro
 260 265 270

Ala Ser Leu Glu Val Ala Ser Ser Gln Ser Ser Glu Asn Leu Glu Glu
 275 280 285

Asp Ala Val Tyr Lys Thr His Val Glu Lys Asp Phe Ile Ala Phe Cys
 290 295 300

Ser Ser Thr Pro His Asn Val Ser Trp Arg Asp Ser Thr Met Gly Ser
 305 310 315 320

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

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

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

Arg Tyr Phe Tyr Leu Phe Pro Gly Asn
370 375

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(x) INFORMATION DE LA PUBLICATION:

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

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

(C) REVUE: Nature

(D) VOLUME: 356

(F) PAGES: 768-774

(G) DATE: 30-APRIL-1992

(K) RESIDUES PERTINENTS DANS LA SEQ ID NO: 3: DE 1 JUSQU'AU 20

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

ACATGACTAC AGAGCTGGAG

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_feature
- (B) EMPLACEMENT: complement (1..20)

(x) INFORMATION DE LA PUBLICATION:

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

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

- (C) REVUE: Nature
- (D) VOLUME: 356
- (F) PAGES: 768-774
- (G) DATE: 30-APRIL-1992

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

CACCACGGCA GGCCTGGATG

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 235 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Homo sapiens

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

GAAATGACTA CAGAGCTGGA GGCATTTGCT CACCGCCCAG AGCACAAGAC CTCTGACAGC	60
ACCTTCCCGG TGTTCCTGTC TCATGGTGT CCGGAAGGCA TTTGTGGGAA GAAATACTCT	120
GAACAAGTCC CTGATATATT ACAATTCAAT GAAATATTTA AAATGTTGAA TAGCAAGAAC	180
TGCCCAAGTT TGAAGGACAA ACCCAAGGTG ATCATCTTCG AGGCCTGCTG TGGTG	235

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_feature
- (B) EMBLACEMENT: 1..23
- (D) AUTRES INFORMATIONS: /note= "SEQ ID NO 5 DE 8 A 30"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

CTACAGAGCT GGAGGCATTT GCT

23

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_feature
- (B) EMBLACEMENT: complement (1..24)

(x) INFORMATION DE LA PUBLICATION:

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

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

(C) REVUE: Nature

(D) VOLUME: 356

(F) PAGES: 768-774

(G) DATE: 30-APRIL-1992

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

TTAATGTCCT GGAAGAGGT AGAA

24

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 21 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_feature
- (B) EMBLACEMENT: complement (1..21)
- (D) AUTRES INFORMATIONS: /note= "SEQ ID NO 1 COMPLEMENTAIRE DE 753 A 773"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

GAGGCAGTTG CGGTTGTTGA A

21

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 21 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_feature
- (B) EMBLACEMENT: complement (1..21)
- (D) AUTRES INFORMATIONS: /note= "SEQ ID NO 1 COMPLEMENTAIRE DE 829 A 849"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

CTCTGACCCA CAGTCCCCA C

21

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 17 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: misc_feature

(B) EMBLACEMENT:1..17

(D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "SEQ ID NO 1 DE 695 A 711"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

AACTGTGCAT GATGAGA

17

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 19 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: misc_feature

(B) EMBLACEMENT:1..9

(D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "SEQ ID NO 1 DE 905 A 913"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: misc_feature

(B) EMBLACEMENT:11..19

(D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "SEQ ID NO 1 DE 915 A 923"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

AGATGCTGTG TACAAGACC

19

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 17 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: misc_feature

(B) EMPLACEMENT: complement (1..17)

(D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "SEQ ID NO 1 COMPLEMENTAIRE
DE 795 A 811"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

GCCTGGACAA TGATGAC

17

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 17 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: misc_feature

(B) EMPLACEMENT: complement (1..17)

(D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "SEQ ID NO 1 COMPLEMENTAIRE
DE 995 A 1011"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

TGATGAAGAT AGAGCCC

17

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 17 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: misc_feature

(B) EMPLACEMENT:1..17

(D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "SEQ ID NO 1 DE 204 A 220"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

CGGGTCATGG CAGACTC

17

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 17 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: misc_feature

(B) EMPLACEMENT:complement (1..17)

(D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "SEQ ID NO 1 COMPLEMENTAIRE
DE 249 A 265"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

GTTTGAAGAA GCATTTG

17

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 17 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
 - (A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: misc_feature
 - (B) EMBLACEMENT:1..17
 - (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "SEQ ID NO 1 DE 330 A 346"

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

CCTGAGTCAG GAGAATC

17

- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 17:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 17 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
 - (A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: misc_feature
 - (B) EMBLACEMENT:complement (1..17)
 - (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "SEQ ID NO 1 COMPLEMENTAIRE DE 375 A 391"

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

AGTCTCAGGA ATTCTTC

17

- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 18:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 17 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: misc_feature

(B) EMPLACEMENT:1..17

(D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "SEQ ID NO 1 DE 503 A 519"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

AGCTGACTTT GACATCA

17

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 17 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: misc_feature

(B) EMPLACEMENT:complement (1..17)

(D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "SEQ ID NO 1 COMPLEMENTAIRE
DE 587 A 603"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

GCGCTGACTC CATATCC

17

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 20:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 33 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_feature
- (B) EMPLACEMENT:13..33
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "SEQ ID NO 1 DE 42 A 62"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

CGCGGATCCA CCATGGCAGA AGGCAACCAC AGA

33

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 21:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 39 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_feature
- (B) EMPLACEMENT:complement (19..39)
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "SEQ ID NO 1 COMPLEMENTAIRE DE 1155 A 1175"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 21:

GGCTCTAGAC TCGAGTTATC AATTGCCAGG AAAGAGGTA

39

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 22:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1310 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS

(B) EMBLEMMENT:104..1195

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 22:

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

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

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

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

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

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

CCTCTGTCAA CATCAAAGAG CACATTTACC AGTATAGCTT GCATAGTCAA TATTTGGTAT 1285

TTCAATAAAA GTAAAGACTG TATCT 1310

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 23:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 364 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 23:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 24:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 19 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_feature
- (B) EMPLACEMENT:1..19
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "SEQ ID NO 22 DE 685 A 703"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 24:

CATGTCTCAT GGCATCCTA

19

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 25:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_feature
- (B) EMPLACEMENT:1..20

(D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "SEQ ID NO 22 DE 712 A 731"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 25:

CTGCGGAACT GCGCATAAAA

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 26:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 35 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_feature
- (B) EMPLACEMENT: complement (16..35)
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "SEQ ID NO 22 COMPLEMENTAIRE DE 1229 A 1248"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 26:

GGCTCTAGAC TCGAGGTGCT CTTTGATGTT GACAG

35

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 27:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_feature
- (B) EMPLACEMENT: complement (1..20)

(D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "SEQ ID NO 22 COMPLEMENTAIRE
DE 939 A 958"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 27:

CTTCTCCTCG TGGATCTTGC

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 28:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 16 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_feature
- (B) EMBLACEMENT:1..16
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "SEQ ID NO 22 DE 124 A 139"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 28:

AGATGTTCTT CATGGT

16

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 29:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 17 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_feature
- (B) EMBLACEMENT:1..17
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "SEQ ID NO 22 DE 290 A 306"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 29:

CTTCTCAATA TGGACCA

17

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 30:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 17 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: misc_feature

(B) EMPLACEMENT:1..17

(D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "SEQ ID NO 22 DE 472 A 488"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 30:

CCTGGCTCTC ATCATAT

17

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 31:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 18 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: misc_feature

(B) EMPLACEMENT:1..18

(D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "SEQ ID NO 22 DE 634 A 651"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 31:

ATTGCTGCC AGACCAGA

18

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 32:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 19 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_feature
- (B) EMBLACEMENT:1..19
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "SEQ ID NO 22 DE 833 A 851"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 32:

GCCTGCAGAG GTGAAAAAC

19

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 33:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 19 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_feature
- (B) EMBLACEMENT:1..19
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "SEQ ID NO 22 DE 1020 A 1038"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 33:

GCTCCATCTT CATTACGGA

19

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 34:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 17 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_feature
- (B) EMBLACEMENT: complement (1..17)
- (D) AUTRES INFORMATIONS: /note= "SEQ ID NO 22 COMPLEMENTAIRE DE 1094 A 1110"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 34:

GATTTCTGTA CCTTCCG

17

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 35:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 16 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_feature
- (B) EMBLACEMENT: complement (1..16)
- (D) AUTRES INFORMATIONS: /note= "SEQ ID NO 22 COMPLEMENTAIRE DE 715 A 730"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 35:

TTTATGCGCA GTTCCG

16

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 36:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 18 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_feature
- (B) EMBLACEMENT: complement (1..18)
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "SEQ ID NO 22 COMPLEMENTAIRE DE 521 A 538"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 36:

GTCATAGTGA GCCCCATT

18

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 37:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 17 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_feature
- (B) EMBLACEMENT: complement (1..17)
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "SEQ ID NO 22 COMPLEMENTAIRE DE 385 A 401"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 37:

CTTCACGAGG ACAAAGT

17

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 38:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 17 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_feature
- (B) EMBLACEMENT: complement (1..17)
- (D) AUTRES INFORMATIONS: /note= "SEQ ID NO 22 COMPLEMENTAIRE DE 237 A 253"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 38:

TCGCAAAGAG TCTACCA

17

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 39:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_feature
- (B) EMBLACEMENT: 10..33
- (D) AUTRES INFORMATIONS: /note= "SEQ ID NO 22 DE 101 A 124"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 39:

CGCGGATCCA AGATGTTGGA ATACCTGGGC AAA

33

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 40:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 68 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_feature
- (B) EMPLACEMENT:46..68
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "SEQ ID NO 22 DE 305 A 327"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 40:

CGCGGATCCA CCATGGCTTC TATGACAGGA GGTCACAAA TGGGACAAAA GATCACCAGT 60

GTAAAACC 68

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 41:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 36 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_feature
- (B) EMPLACEMENT:complement (1..16)
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "SEQ ID NO 22 COMPLEMENTAIRE DE 838 A 853"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_feature
- (B) EMPLACEMENT:complement (18..36)
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "SEQ ID NO 22 COMPLEMENTAIRE DE 818 A 836"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 41:

ATGTTTTTCA CCTCTGGAGG CCTGGACAAT GATGAC

36

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 42:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 36 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "OLIGONUCLEOTIDE"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_feature
- (B) EMBLEMMENT:1..19
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "SEQ ID NO 22 DE 818 A 836"

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: misc_feature
- (B) EMBLEMMENT:21..36
- (D) AUTRES INFORMATIONS:/note= "SEQ ID NO 22 DE 838 A 853"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 42:

GTCATCATTG TCCAGGCCTC CAGAGGTGAA AAACAT

36

REVENDICATIONS

1) Séquence d'ADN comprenant une séquence d'ADN codant pour un polypeptide humain ayant une activité protéase et ayant la séquence nucléotidique de la séquence SEQ ID N° 1 :

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

CTG CCT CCG AGG AAT GGA GCT GAC TTT GAC ATC ACA GGG ATG AAG GAG 533
 Leu Pro Pro Arg Asn Gly Ala Asp Phe Asp Ile Thr Gly Met Lys Glu
 150 155 160

5 CTA CTT GAG GGT CTG GAC TAT AGT GTA GAT GTA GAA GAG AAT CTG ACA 581
 Leu Leu Glu Gly Leu Asp Tyr Ser Val Asp Val Glu Glu Asn Leu Thr
 165 170 175 180

GCC AGG GAT ATG GAG TCA GCG CTG AGG GCA TTT GCT ACC AGA CCA GAG 629
 10 Ala Arg Asp Met Glu Ser Ala Leu Arg Ala Phe Ala Thr Arg Pro Glu
 185 190 195

CAC AAG TCC TCT GAC AGC ACA TTC TTG GTA CTC ATG TCT CAT GGC ATC 677
 His Lys Ser Ser Asp Ser Thr Phe Leu Val Leu Met Ser His Gly Ile
 15 200 205 210

CTG GAG GGA ATC TGC GGA ACT GTG CAT GAT GAG AAA AAA CCA GAT GTG 725
 Leu Glu Gly Ile Cys Gly Thr Val His Asp Glu Lys Lys Pro Asp Val
 215 220 225

20 CTG CTT TAT GAC ACC ATC TTC CAG ATA TTC AAC AAC CGC AAC TGC CTC 773
 Leu Leu Tyr Asp Thr Ile Phe Gln Ile Phe Asn Asn Arg Asn Cys Leu
 230 235 240

25 AGT CTG AAG GAC AAA CCC AAG GTC ATC ATT GTC CAG GCC TGC AGA GGT 821
 Ser Leu Lys Asp Lys Pro Lys Val Ile Ile Val Gln Ala Cys Arg Gly
 245 250 255 260

GCA AAC CGT GGG GAA CTG TGG GTC AGA GAC TCT CCA GCA TCC TTG GAA 869
 30 Ala Asn Arg Gly Glu Leu Trp Val Arg Asp Ser Pro Ala Ser Leu Glu
 265 270 275

GTG GCC TCT TCA CAG TCA TCT GAG AAC CTG GAG GAA GAT GCT GTT TAC 917
 Val Ala Ser Ser Gln Ser Ser Glu Asn Leu Glu Glu Asp Ala Val Tyr
 35 280 285 290

AAG ACC CAC GTG GAG AAG GAC TTC ATT GCT TTC TGC TCT TCA ACG CCA 965
 Lys Thr His Val Glu Lys Asp Phe Ile Ala Phe Cys Ser Ser Thr Pro
 295 300 305

40 CAC AAC GTG TCC TGG AGA GAC AGC ACA ATG GGC TCT ATC TTC ATC ACA 1013
 His Asn Val Ser Trp Arg Asp Ser Thr Met Gly Ser Ile Phe Ile Thr
 310 315 320

	GGA CAA ATG CTT CTT CAA ACC TTT TTT AAC ATA GAC CAA ATA TCC CCC	293
	Gly Gln Met Leu Leu Gln Thr Phe Phe Asn Ile Asp Gln Ile Ser Pro	
	70 75 80	
5	AAT AAA AAA GCT CAT CCG AAT ATG GAG GCT GGA CCA CCT GAG TCA GGA	341
	Asn Lys Lys Ala His Pro Asn Met Glu Ala Gly Pro Pro Glu Ser Gly	
	85 90 95 100	
	GAA TCT ACA GAT GCC CTC AAG CTT TGT CCT CAT GAA GAA TTC CTG AGA	389
10	Glu Ser Thr Asp Ala Leu Lys Leu Cys Pro His Glu Glu Phe Leu Arg	
	105 110 115	
	CTA TGT AAA GAA AGA GCT GAA GAG ATC TAT CCA ATA AAG GAG AGA AAC	437
	Leu Cys Lys Glu Arg Ala Glu Glu Ile Tyr Pro Ile Lys Glu Arg Asn	
15	120 125 130	
	AAC CGC ACA CGC CTG GCT CTC ATC ATA TGC AAT ACA GAG TTT GAC CAT	485
	Asn Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ile Ile Cys Asn Thr Glu Phe Asp His	
	135 140 145	
20	CTG CCT CCG AGG AAT GGA GCT GAC TTT GAC ATC ACA GGG ATG AAG GAG	533
	Leu Pro Pro Arg Asn Gly Ala Asp Phe Asp Ile Thr Gly Met Lys Glu	
	150 155 160	
25	CTA CTT GAG GGT CTG GAC TAT AGT GTA GAT GTA GAA GAG AAT CTG ACA	581
	Leu Leu Glu Gly Leu Asp Tyr Ser Val Asp Val Glu Glu Asn Leu Thr	
	165 170 175 180	
	GCC AGG GAT ATG GAG TCA GCG CTG AGG GCA TTT GCT ACC AGA CCA GAG	629
30	Ala Arg Asp Met Glu Ser Ala Leu Arg Ala Phe Ala Thr Arg Pro Glu	
	185 190 195	
	CAC AAG TCC TCT GAC AGC ACA TTC TTG GTA CTC ATG TCT CAT GGC ATC	677
	His Lys Ser Ser Asp Ser Thr Phe Leu Val Leu Met Ser His Gly Ile	
35	200 205 210	
	CTG GAG GGA ATC TGC GGA ACT GTG CAT GAT GAG AAA AAA CCA GAT GTG	725
	Leu Glu Gly Ile Cys Gly Thr Val His Asp Glu Lys Lys Pro Asp Val	
	215 220 225	
40	CTG CTT TAT GAC ACC ATC TTC CAG ATA TTC AAC AAC CGC AAC TGC CTC	773
	Leu Leu Tyr Asp Thr Ile Phe Gln Ile Phe Asn Asn Arg Asn Cys Leu	
	230 235 240	

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

GAA GTA TTT CGG AAG GTA CAG CAA TCA TTT GAA ACT CCA AGG GCC AAA 1109
 Glu Val Phe Arg Lys Val Gln Gln Ser Phe Glu Thr Pro Arg Ala Lys
 345 350 355

5 GCT CAA ATG CCC ACC ATA GAA CGA CTG TCC ATG ACA AGA TAT TTC TAC 1157
 Ala Gln Met Pro Thr Ile Glu Arg Leu Ser Met Thr Arg Tyr Phe Tyr
 360 365 370

CTC TTT CCT GGC AAT TGAAAATGGA AGCCACAAGC AGCCCAGCCC TCCTTAATCA 1212
 10 Leu Phe Pro Gly Asn
 375

ACTTCAAGGA GCACCTTCAT TAGTACAGCT TGCATATTTA ACATTTTGTA TTTCAATAAA 1272

15 AGTGAAGACA AAAAAAAAAA 1291

4) Séquence d'ADN codant pour un polypeptide humain ayant une activité protéase et capable d'induire l'apoptose ayant la séquence commençant au nucléotide 42 et se terminant au nucléotide 1172 de la séquence SEQ ID N° 1 ainsi que les séquences d'ADN qui hybrident avec celle-ci et ayant la même fonction.

5) Séquence d'ADN selon la revendication 4 ayant la séquence commençant au nucléotide 42 et se terminant au nucléotide 1172 de la séquence SEQ ID N° 1.

6) Polypeptide humain ayant une activité protéase et capable d'induire l'apoptose et ayant la séquence en acides aminés de la séquence SEQ ID N° 2 :

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

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

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

Lys Thr Glu Asp Lys Val Arg Val Met Ala Asp Ser Met Gln Glu Lys
 40 50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Pro Asp Val Leu Leu Tyr Asp Thr Ile Phe Gln Ile Phe Asn Asn
 225 230 235 240

30 Arg Asn Cys Leu Ser Leu Lys Asp Lys Pro Lys Val Ile Ile Val Gln
 245 250 255

Ala Cys Arg Gly Ala Asn Arg Gly Glu Leu Trp Val Arg Asp Ser Pro
 260 265 270

35 Ala Ser Leu Glu Val Ala Ser Ser Gln Ser Ser Glu Asn Leu Glu Glu
 275 280 285

40 Asp Ala Val Tyr Lys Thr His Val Glu Lys Asp Phe Ile Ala Phe Cys
 290 295 300

Ser Ser Thr Pro His Asn Val Ser Trp Arg Asp Ser Thr Met Gly Ser
 305 310 315 320

45

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

Cys His Leu Glu Glu Val Phe Arg Lys Val Gln Gln Ser Phe Glu Thr
 5 340 345 350

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

10 Arg Tyr Phe Tyr Leu Phe Pro Gly Asn
 370 375

ainsi que les allèles et les analogues de cette séquence.

7) Polypeptide selon la revendication 6 ayant la séquence en 15 acides aminés de la séquence SEQ ID N° 2 et désigné protéine Tx.

8) Polypeptide humain ayant une activité protéase et capable d'induire l'apoptose tel qu'obtenu par l'expression dans une cellule hôte d'un ADN codant pour la séquence en acides 20 aminés de la séquence SEQ ID N° 2.

9) Polypeptide selon la revendication 8 tel qu'obtenu par l'expression dans une cellule hôte eucaryote.

10) Polypeptide selon l'une quelconque des revendications 6 à 9 dont l'activité protéase correspond à la capacité de matura- 25 rer l'enzyme de conversion de l'IL-1bêta.

11) Vecteur d'expression comprenant une séquence d'ADN selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

12) Cellule hôte transformée avec un vecteur selon la revendication 11.

13) Procédé qui comprend l'expression de la protéine Tx dans 30 une cellule hôte transformée par un ADN codant pour la séquence en acides aminés de la séquence SEQ ID N° 2.

14) Procédé selon la revendication 13 dans lequel la cellule hôte est une cellule eucaryote.

15) Anticorps dirigés contre le polypeptide selon l'une 35 quelconque des revendications 6 à 10.

16) A titre de médicament, le polypeptide selon l'une quelconque des revendications 6 à 10.

17) Compositions pharmaceutiques renfermant comme principe 40 actif un médicament selon la revendication 16.

- 18) Compositions pharmaceutiques selon la revendication 17 pour moduler la production d'IL-1 bêta.
- 19) Compositions pharmaceutiques selon la revendication 17 pour moduler l'apoptose.
- 5 20) Séquence d'ADN selon la revendication 4, hybridant avec la séquence d'ADN commençant au nucléotide 42 et se terminant au nucléotide 1172 de la séquence SEQ ID N° 1 et ayant la même fonction.
- 21) Séquence d'ADN codant pour un polypeptide ayant une acti-
10 vité protéase et capable d'induire l'apoptose et ayant la séquence nucléotidique de la séquence SEQ ID N° 22.
- 22) Séquence d'ADN selon la revendication 21 commençant au nucléotide 104 et se terminant au nucléotide 1195 de la séquence SEQ ID N° 22.
- 15 23) Polypeptide humain ayant une activité protéase et capable d'induire l'apoptose et ayant la séquence en acides aminés de la séquence SEQ ID N° 23 et désigné protéine Ty.
- 24) Polypeptide humain tel qu'obtenu par l'expression dans une cellule hôte d'un ADN codant pour la séquence en acides
20 aminés de la séquence SEQ ID N° 23.
- 25) Procédé qui comprend l'expression de la protéine Ty dans une cellule hôte transformée par un ADN codant pour la séquence en acides aminés de la séquence SEQ ID N° 23.

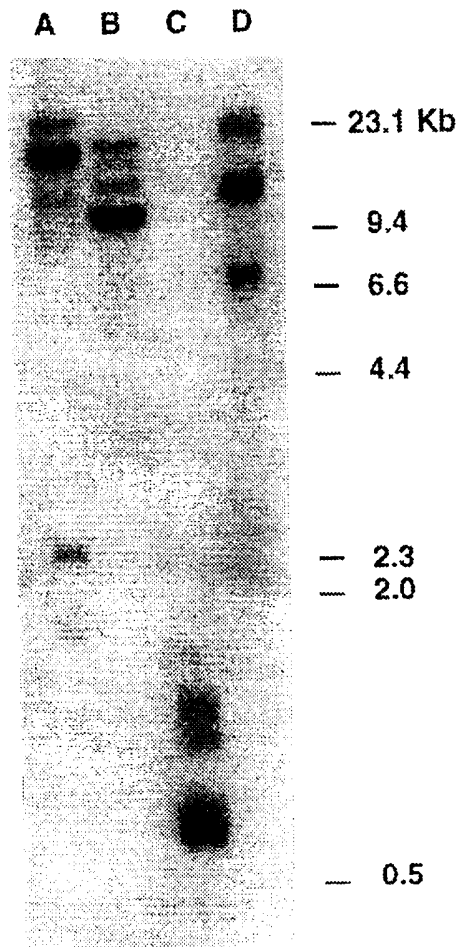


FIGURE 1

1
1 GAAATGACTACAGAGCTGGAGGCATTGCTCACCGCCCAGAGCACAAAGACCTCTGACAGC 60

61
61 ACCTTCCCGGTGTTCTTGTCTCATGGTGTTCGGGAAGGCATTGTTGGGAAGAAATACTCT 120

121
121 GAACAAGTCCCTGATATATTACAATTCAATGAAATATTTAAAATGTTGAATAGCAAGAAC 180

181
181 TGCCCAAGTTTGAAGGACAAACCCAAGGTGATCATCTTCGAGGCCTGCTGTGGTG 235

FIGURE 2

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

FIGURE 3

WO 96/04387

5/11

PCT/FR95/01035

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

FIGURE 3

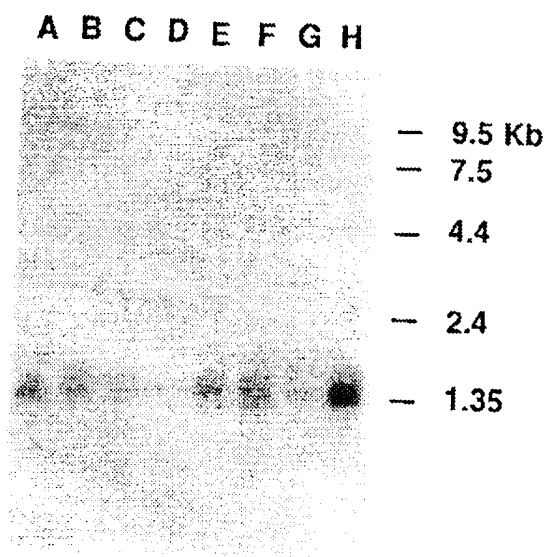


FIGURE 4

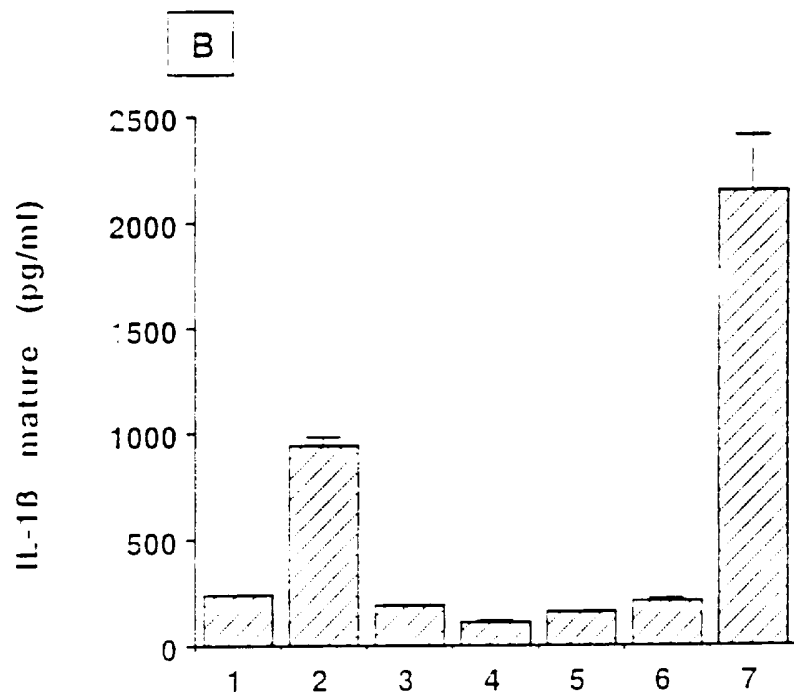
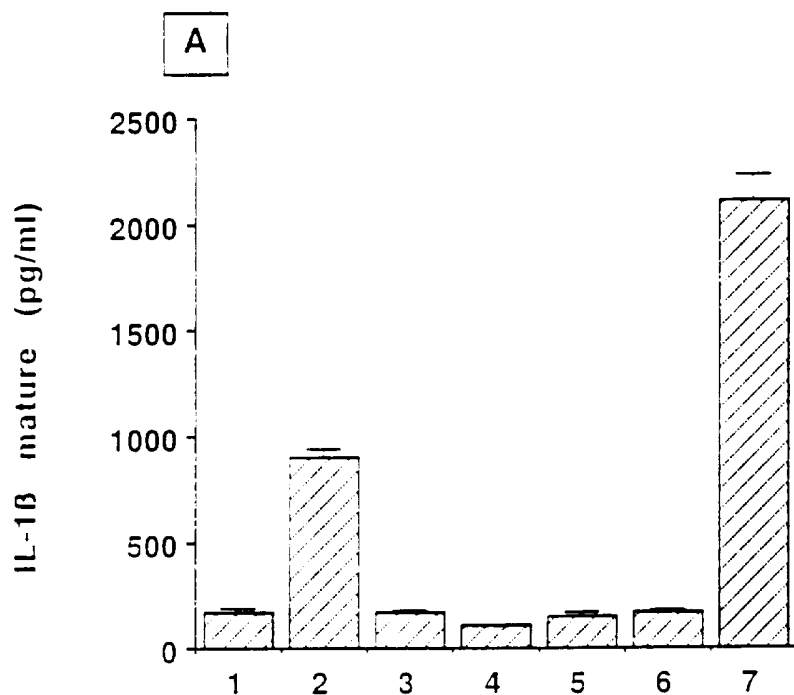


FIGURE 5

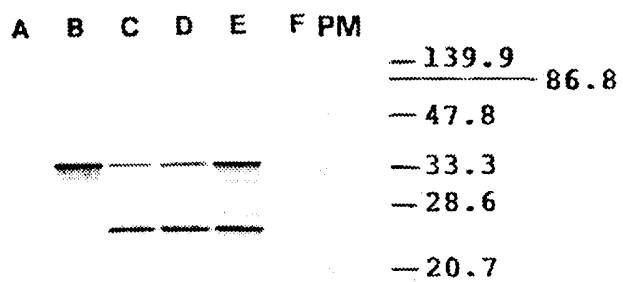
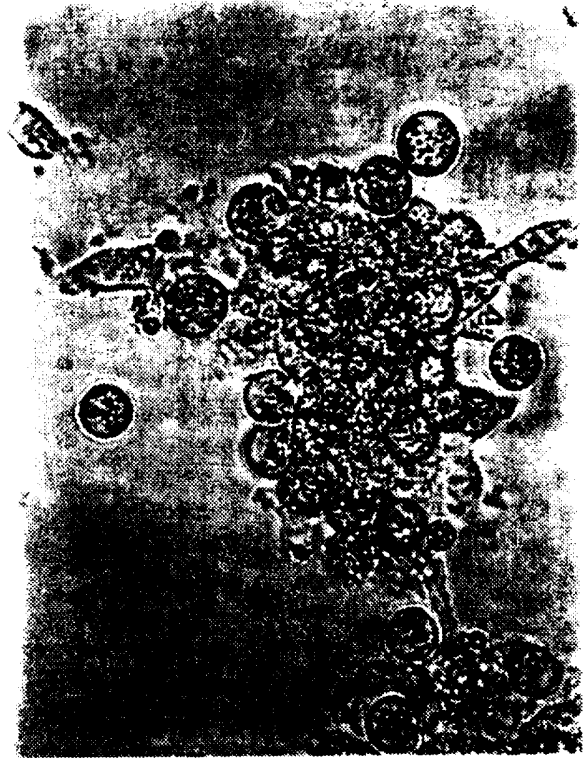


FIGURE 6



B



D



A



C

FIGURE 7

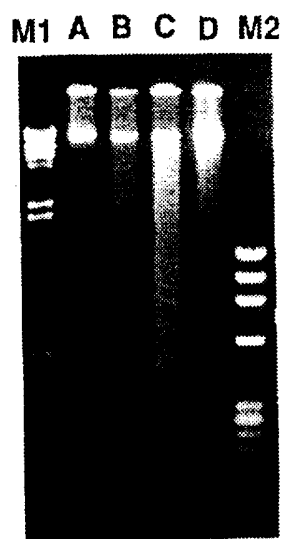


FIGURE 8

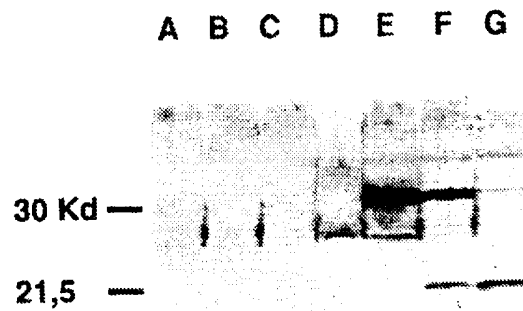


FIGURE 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/01035

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12N15/57 C12N9/64 C07K16/40 A61K38/48 C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 6 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CELL, vol. 75, 19 November 1993 pages 641-652, J. YUAN ET AL 'The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1beta converting enzyme' cited in the application see the whole document --- -/--	1-14, 21-25

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 December 1995

Date of mailing of the international search report

21.12.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Van der Schaal, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/FR 95/01035

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GENES DEV. (1994), 8(14), 1613-26 CODEN: GEDEEP;ISSN: 0890-9369, KUMAR, SHARAD ET AL 'Induction of apoptosis by the mouse Nedd2 gene, which encodes a protein similar to the product of the Caenorhabditis elegans cell death gene ced-3 and the mammalian IL-1.beta.- converting enzyme' see the whole document ---	1-14, 21-25
P,A	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, no. 49, 9 December 1994 MD US, pages 30761-30764, T. FERNANDES-ALNEMRI ET AL 'CCP32, a novel human apoptotic protein with homology to Caenorhabditis elegans cell death protein Ced-3 and mammalian Interleukin-1-beta-converting enzyme' see the whole document ---	1-14, 21-25
P,X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 270 (26). 1995. 15870-15876. ISSN: 0021-9258, 30 June 1995 MUNDAY N A ET AL 'Molecular Cloning and Pro-apoptotic Activity of ICE-relII and ICE-relIII, Members of the ICE-CED-3 Family of Cysteine Proteases.' see the whole document ---	1-25
P,X	EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL 14 (9). 1995. 1914-1922. ISSN: 0261-4189, 1 May 1995 FAUCHEU C ET AL 'A novel human protease similar to the interleukin-1-beta converting enzyme induces apoptosis in transfected cells.' see the whole document -----	1-20

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De: le Internationale No
PCT/FR 95/01035

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/57 C12N9/64 C07K16/40 A61K38/48 C12N5/10

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>CELL, vol. 75, 19 Novembre 1993 pages 641-652, J. YUAN ET AL 'The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1beta converting enzyme' cité dans la demande voir le document en entier --- -/--</p>	<p>1-14, 21-25</p>

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

5 Décembre 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

21. 12. 95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Van der Schaal, C

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>GENES DEV. (1994), 8(14), 1613-26 CODEN: GEDEEP;ISSN: 0890-9369, KUMAR, SHARAD ET AL 'Induction of apoptosis by the mouse Nedd2 gene, which encodes a protein similar to the product of the Caenorhabditis elegans cell death gene ced-3 and the mammalian IL-1.beta.-converting enzyme' voir le document en entier ---</p>	1-14, 21-25
P,A	<p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, no. 49, 9 Décembre 1994 MD US, pages 30761-30764, T. FERNANDES-ALNEMRI ET AL 'CCP32, a novel human apoptotic protein with homology to Caenorhabditis elegans cell death protein Ced-3 and mammalian Interleukin-1-beta-converting enzyme' voir le document en entier ---</p>	1-14, 21-25
P,X	<p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 270 (26). 1995. 15870-15876. ISSN: 0021-9258, 30 Juin 1995 MUNDAY N A ET AL 'Molecular Cloning and Pro-apoptotic Activity of ICE-relII and ICE-relIII, Members of the ICE-CED-3 Family of Cysteine Proteases.' voir le document en entier ---</p>	1-25
P,X	<p>EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL 14 (9). 1995. 1914-1922. ISSN: 0261-4189, 1 Mai 1995 FAUCHEU C ET AL 'A novel human protease similar to the interleukin-1-beta converting enzyme induces apoptosis in transfected cells.' voir le document en entier -----</p>	1-20