

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2002 - 1034

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **29.09.2000**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **01.10.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/411329**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **18.06.2003**

(Věstník č. 6/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/US00/27029**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/025445**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/57

C 12 N 9/64

C 07 K 16/40

C 12 N 5/10

(71) Přihlašovatel:

AMGEN INC., Thousand Oaks, CA, US;

(72) Původce:

Boone Thomas Charles, Newbury Park, CA, US;

Li Huimin, Newbury Park, CA, US;

Mann Michael Benjamin, Thousand Oaks, CA, US;

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní třída 32, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Fibrinolyticky aktivní polypeptid

(57) Anotace:

Fibrinolyticky aktivní metaloproteinázový peptid (nazývaný "nový aktivní trombolýtický peptid" NAT), který je účinný při in vivo lýze krevních sraženin, jsou zde popsány metody a materiály potřebné k jeho výrobě pomocí rekombinantní exprese.

CZ 2002 - 1034 A3

03.04.03

P/2002-1634

24328

FIBRINOLYTICKY AKTIVNÍ POLYPEPTID

Oblast techniky

Tento vynález se vztahuje k fibrinolytický aktivní metaloproteináze, která má v přírodě se nevyskytující sekvenci, k metodám její výroby a k jejímu použití v léčbě trombóz *in vivo*.

Dosavadní stav techniky

Fibroláza je enzymaticky aktivní polypeptid (konkrétně metaloproteináza), tvořený 203 aminokyselinami, který byl poprvé izolován purifikací z jedu hada Southern Copperhead (Patent USA č. 4, 610,879, vydaný 9. září 1986 (Markland et al.); a Guan et. Al., Archives of Biochemistry and Biophysics, svazek 289, číslo 2, strany 197-207 (1991). Enzym vykazuje přímou fibrinolytickou aktivitu se slabou nebo žádnou hemoragickou aktivitou. Rozpouští krevní sraženiny tvořené z fibrinogenu nebo z plné krve.

Aminokyselinová sekvence fibrolázy byla určena a také byly popsány metody pro rekombinantní produkci v kvasinkách a použití pro úpravu tromboembolických podmínek *in vivo*. Randolph et al., Protein Science, Cambridge University Press (1992), strany 590-600 a Evropská patentová žádost č. 0 323 722 (Valenzuela et al.), publikovaná 12. července 1989.

Podstata vynálezu

Tento vynález poskytuje fibrinolytickou metaloproteinázu o aminokyselinové sekvenci, která se běžně v přírodě nevyskytuje (popsaná viz. SEQ ID NO:1 a také popisována zde jako "novel acting thrombolytic" (NAT). Také jsou poskytnuty sekvence nukleové kyseliny jako např. SEQ ID NO: 2 a její varianty, které kódují NAT.

Termín „zralý“ je používán v jeho konvenčním smyslu-označuje biologicky aktivní polypeptid, který byl enzymaticky zpracován *in situ* v hostitelské buňce, vyštěpením z „prepro“ oblasti.

Vzhledem k fibrinolytické aktivitě je NAT použitelný *in vivo* jako lyzační činidlo krevních sraženin při léčení trombóz u savců (včetně krysy, prasat a člověka).

NAT polypeptid v tomto vynálezu jako léčebné činidlo poskytuje výhody oproti v přírodě se vyskytující fibroláze (např. fibrinolytický polypeptid nalezený v hadím jedu). U nativní fibrolázy je popsáno několik alternativních N-konců: QQRFP, EQRFP a ERFP (kde E značí cyklický glutamín nebo kyselinu pyroglutamovou). Přesněji, molekula fibrolázy, která začíná na N-konci sekvencí QQRFP, je degradována na 2 izoformy, které mají N-konce EQRFP a ERFP. Rekombinantní fibroláza vyráběná v kvasinkách je směs všech těchto 3 forem a tudíž není homogenní. Viz. Loayza et al, Journal of Chromatography, B 662, strany 227-243 (1994).

A navíc cyklický glutamín blokuje N-konec a znemožňuje tak sekvenování.

Ve srovnání s tím rekombinantní NAT (popisovaný v tomto vynálezu) poskytuje jednu formu: pouze jeden N-konec je typicky vyráběn. Výsledkem je větší homogenita koncového produktu ve srovnání s rekombinantní fibrolázou, což je výhodné, když jako konečné upotřebení jsou zamýšleny lékařské aplikace.

Stručný přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1 zobrazuje v lineárním tvaru celou aminokyselinovou sekvenci NATu (Seq ID NO:3), skládající se z „prepro“ oblasti (podtržená), která obsahuje „signální“ peptid, a zralý polypeptid (nepodtržený).

Podrobný přehled obrázků na výkresech

NAT může být vyráběn rekombinantní expresí molekuly nukleové kyseliny o SEQ ID NO:4, která kóduje kompletní aminokyselinovou

sekvenci NATu (SEQ ID NO:3), včetně „prepo“ oblasti (nukleotidy 1-173) a zralého polypeptidu (nukleotidy 784-1386), ve vhodném hostiteli. Následně po expresi, je prepo oblast v hostitelské buňce enzymaticky odštěpena a poskytuje zralý aktivní polypeptid (SEQ ID NO:1).

NAT je vyráběn v kvasinkách, jak bude vysvětleno detailněji níže.

Zralý polypeptid (SEQ ID NO: 1), který je takto vyráběn může mít a také nemusí jako koncovou aminokyselinu- methionin a to v závislosti na způsobu přípravy. Typicky je methionin, jako koncová aminokyselina přítomen, když je polypeptid vyráběn rekombinantně v neseekretujícím bakteriálním druhu (např. *E.coli*) jako hostiteli.

Kromě toho, molekula nukleové kyseliny o SEQ ID NO: 2, je také použitelná, protože je to degenerovaná sekvence a kóduje stejný polypeptid. Tento vynález zahrnuje také molekuly nukleové kyseliny, které mohou kódovat další aminokyseliny hraničící na 5'nebo 3'konci s oblastí která kóduje zralý polypeptid, stejně jako sekvence kódující alternativní pre/pro oblasti (např. sekvence zodpovědné za sekreci polypeptidu přes buněčné membrány) v místě nativní pre/pro oblasti. (např. nalezené v přírodě vyskytující se fibroláze). Další sekvence mohou také být nekódující sekvence, včetně regulačních oblastí jako promotor transkripce nebo translace, v závislosti na hostitelské buňce.

NAT může být připraven pomocí dobře známých rekombinantních technik, které jsou popsány blíže v Sambrook et al., *Molecular cloning: Laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989) a/nebo v Ausubel et al., editors, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishers Inc. and Wiley and Sons, New York (1994).

DNA molekula kódující polypeptid nebo jeho zkrácená verze, může být získána například pomocí metody: „screening“ genomové nebo cDNA knihovny, nebo pomocí PCR amplifikace. Následuje nahrazení kodónu, který kóduje N-koncové aminokyseliny QQR, kodónem pro serin (S).

Alternativně, může být molekula kódující NAT připravena chemickou syntézou, pomocí metod, které jsou dobře známy zkušeným chemikům. Popsány byly Engelsem et al. v *Angew. Chem. Intl. Ed.*, Volume 28, strany 716-734 (1989). DNA je několik stovek nukleotidů

dlouhá. Nukleové kyseliny delší než jedno sto nukleotidů mohou být syntetizovány stejnými metodami jako několik fragmentů a následně tyto fragmenty mohou být ligovány k sobě, tak aby vytvořily nukleotidovou sekvenci o žádané délce.

DNA molekula je vložena do příslušného expresního vektoru pro expresi ve vhodné hostitelské buňce.

Vektor je vybrán, tak aby fungoval v dané hostitelské buňce (např. vektor je kompatibilní s hostitelským buněčným aparátem, tak že dochází k expresi DNA).

Třebaže polyprotein může být exprimován v prokaryotické, kvasinkové, hmyzí (bakulovirový systém) nebo eukaryotické hostitelské buňce, kvasinka je upřednostněna, jak bude dále podrobněji vysvětleno.

Vektory používané k expresi NAT v jakékoliv hostitelské buňce mohou také obsahovat 5' hraničící oblast (zmiňovaná jako „promoter“) a další regulační prvky prakticky připojené k DNA tak, aby byly exprimovány. Jsou to enhancery, začátek replikačního elementu, celá sekvence intronu, obsahující donorové a akceptorové vystřihovací místo, signální peptidová sekvence, sekvence pro vazbu ribozomu a polyadenylační sekvence, polylinkerová oblast pro inzerci nukleové kyseliny kódující NAT a selekční marker.

Každý z těchto elementů je diskutován dále.

Ne nutně, může vektor také obsahovat „tag“ sekvenci, např. oligonukleotidovou sekvenci lokalizovanou na 5' nebo 3' konci polypeptid-kódující sekvence, která kóduje poly His (jako hexaHis) nebo krátké imunogenní sekvence (jako c-myc nebo hemagglutininový epiptop, pro které jsou protilátky, včetně monoklonálních protilátek, komerčně dostupné. Tento tag je exprimován společně s NAT a může sloužit jako afinitní tag pro purifikaci tohoto polypeptidu z hostitelské buňky. Následně může být tag odstraněn z purifikovaného polypeptidu různými způsoby, například použitím selektivní peptidázy.

5' hraniční sekvence může být v přírodě se vyskytující sekvence, nebo může být homologní (např. ze stejného druhu nebo rodu jako hostitelská buňka), heterogenní (např. z jiného druhu nebo rodu, než je hostitelská buňka), hybridní (např. kombinace 5' hraniční sekvence z více než jednoho druhu) nebo syntetická.

Zdrojem může být jakýkoliv prokaryotický nebo eukaryotický organismus, nebo jakákoliv rostlina, za předpokladu, že 5' hraniční sekvence je funkční, a může být aktivován systémem hostitelské buňky.

Začátek replikace je většinou součástí prokaryotických expresních vektorů, které jsou komerčně dostupné, a napomáhá replikaci vektoru v hostitelské buňce. Amplifikace vektoru v určitém počtu kopií, může být v některých případech důležitá pro optimální expresi „NATu“. Jestliže vybraný vektor neobsahuje začátek replikace, může být na základě známé sekvence chemicky syntetizován a následně vložen do vektoru.

Prvek konce transkripce je typicky lokalizován na 3' konci polypeptidové kódující sekvence a slouží k ukončení transkripce mRNA. Terminační prvek v prokaryotických buňkách je většinou G-C bohatý fragment následovaný polyT sekvencí. Tento prvek je snadno klonovatelný z knihovny nebo komerčně dostupný jako součást vektoru, a také může být připraven metodami syntézy nukleových kyselin.

Gen pro selekční marker kóduje protein nezbytný pro přežití a růst hostitelské buňky na selektivním kultivačním médiu. Typický selekční markerový gen kóduje proteiny, které (a) propůjčují resistenci na antibiotika nebo na jiné toxiny, například, ampicilin, tetracyklin nebo kanamycin v prokaryotických hostitelských buňkách, zeocin v kvasinkách a neomycin v savčích hostitelských buňkách; (b) doplněk auxotrofické deficiencie buněk; nebo (c) doplněk kritických živin nedostupných z komplexního média. Preferované selekční markery používané při prokaryotické expresi jsou geny pro rezistenci na kanamycin, ampicilin a tetracyklin.

Ribozomální vazebný prvek, běžně nazývaný „Shine-Dalgarno“ sekvence (u prokaryotů) nebo „Kozak“ sekvence (pro eukaryoty), je nezbytný pro iniciaci translace mRNA. Tento prvek je typicky lokalizován na 3' konci od promotoru a na 5' konci od kódující sekvence polypeptidu, který je syntetizován.

„Shine-Dalgarno“ sekvence je variabilní, ale typicky obsahuje polypurin (např. vysoký obsah A-G). Mnoho „Shine-Dalgarno“ sekvencí bylo identifikováno, každá může být snadno syntetizována pomocí metod, které byly popsány a použita v prokaryotickém vektoru.

„Kozak“ sekvence zahrnuje sekvence bezprostředně před a za iniciačním kodónem.

Preferovaná „Kozak“ sekvence je ta, která je asociovaná s vysokou účinností s iniciací translace v AUG start kodónu.

V těch případech, kdy je žádoucí aby NAT polypeptid byl sekretován z hostitelské buňky, může být signální sekvence použita k nasměrování polypeptidu ven z buňky, ve které byl syntetizován.

Signální sekvence je umístěna v kódující oblasti sekvence nukleové kyseliny, nebo přímo na 5' konci kódující oblasti. Mnoho signálních sekvencí bylo identifikováno a jakýkoli z nich funguje ve vybrané hostitelské buňce a může zde být použit. Tudiž, signální sekvence může být homologní nebo heterologní s polypeptidem.

Navíc signální sekvence může být chemicky syntetizována za použití metod popsaných výše.

Když je vektor zkonstruován a nukleová kyselina byla vložena do správného místa ve vektoru, celý vektor může být vložen do vhodné hostitelské buňky a dále amplifikován a/nebo polypeptid exprimován.

Jak již bylo zmíněno, hostitelské buňky mohou být prokaryotické (jako *E.coli*) nebo eukaryotické (jako kvasinkové buňky, nebo hmyzí nebo buňky obratlovců). Hostitelská buňka, ať již je to kvasinka nebo jiný hostitel, za vhodných podmínek může syntetizovat NAT, který může být později sbírán z kultivačního média (jestliže je hostitelskou buňkou sekretován do média), nebo přímo z hostitelských buněk, které ho produkují (jestliže není sekretován). Po sběru NAT polypeptidu může být purifikován použitím metod, jako je molekulární síťová chromatografie, afinitní chromatografie a podobné.

Výběr hostitelské buňky bude z velké míry záviset na způsobu, jakým je buňka schopna sbalit NAT do jeho nativní sekundární a terciální struktury (např. správná orientace di-sulfidických můstků, apod.), tak aby byl biologicky aktivní. Přesto, dokonce když hostitelská buňka nesyntetizuje biologicky aktivní materiál, může být „sbalen“ po syntéze za použití vhodných chemických podmínek, takových, které jsou známy zkušeným chemikům. V tomto případě, může být správné „sbalení“ odvozeno z faktu, že materiál je biologicky aktivní.

Vhodné hostitelské buňky, nebo tkáňové kultury mohou být savčí buňky, jako například buňky z vaječníku čínského křečka (CHO-Chinese

hamster ovary cells) nebo 3T3 buňky. Vhodné savčí hostitelské buňky a metody transformace, kultivace, množení, screeningu, a výroby produktu a jeho purifikace jsou obecně známy.

Další vhodné savčí buněčné kultury jsou opičí COS-1 a COS-7 buněčné linie a CV-1 buněčná linie. Další případné savčí hostitelské buňky jsou buněčné linie primátů a hlodavců, včetně transformovaných buněčných linií. Vhodné jsou také normální diploidní buňky, buněčné druhy odvozené od in vitro kultivovaných primárních tkáňových linií, stejně jako primární explantáty. Kandidátní buňky by měly být genotypově deficitní v selekčním genu, nebo by měly obsahovat dominantně působící selekční gen.

Avšak i další savčí buněčné linie je možné použít, HeLa, myší L-929 buňky, 3T3 buňky odvozené od Swiss, Balb-c nebo NIH myších, BHK nebo HaK buněčné linie z křečka.

Užitečné jsou také bakterie jako hostitelské buňky. Například různé druhy *E. coli* (např. HB101, DH5a, DH10 a MC1061) jsou dobře známy jako hostitelské buňky používané v biotechnologii.

Různé druhy *B. subtilis*, *Pseudomonas* druhy, jiné druhy *Bacillus*, *Streptomyces* a jim podobné mohou být také použity. Navíc mnoho druhů kvasinkových buněk je také použitelných jako hostitelské buňky pro expresi polypeptidu prezentovaného v tomto vynálezu. Také hmyzí buňky mohou být použity jako hostitelské buňky. Popsáno například v „ Miller et al., Genetic Engineering, Volume 8, strany 277-298 (1986).

Inzerce (také nazývaná jako transformace nebo transfekce) vektoru do vybrané hostitelské buňky může být provedena pomocí kalcium fosfátu, elektroporací, mikroinjekcí, lipofekcí nebo DEAE-dextranem.

Vybraná metoda musí funkčně korelovat s použitou hostitelskou buňkou. Tyto a jiné vhodné metody jsou známy zkušeným chemikům a popsány leckde (např. v Sambrook et al.)

Hostitelské buňky obsahující vektor mohou být kultivovány ve standardním médiu. Médium většinou obsahuje všechny nezbytné živiny pro růst a přežití buněk.

Vhodná média pro kultivaci *E. coli* jsou například Luria Broth (LB) a/nebo Terrific Broth (TB). Vhodná média pro kultivaci eukaryotických buněk jsou RPMI 1640, MEM, DMEM a všechny které mohou

být doplněny sérem a/nebo růstovými faktory, které jsou nezbytné pro kultivaci dané buněčné linie. Vhodné médium pro kultivaci hmyzích buněk je Graceovo médium doplněné, je-li to nezbytné, yestolatem, hydrolyzátem laktoalbuminu a/nebo fetálním telecím sérem.

Antibiotika nebo jiné sloučeniny používané pro selektivní růst transformovaných buněk mohou být přidána jako doplněk do média. Sloučenina, která je použita pro selekci, je vybrána podle selekčního markeru, který je přítomen v plasmidu, kterým byla hostitelská buňka transformována. Například, když je selekční marker rezistence na kanamycin, tak se kanamycin přidává do kultivačního média.

Množství NATu vyprodukovaného hostitelskou buňkou se vyhodnocuje metodami běžně známými.

Jsou to metody jako Western blot , SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza, nedenaturující gelová elektroforéza, HPLC, imunoprecipitace, a/nebo stanovení aktivity jako stanovení gelového vazebného DNA posunu.

Je-li NAT sekretován z hostitelských buněk (vyjma gram negativních bakterií), většina proteinu se nachází v médiu. Je-li NAT sekretován z gram-negativních bakterií, určitá část se nalezne v periplasmě.

Není-li NAT sekretován nachází se v cytoplasmě.

V případě intracelulárního NATu se buňky mechanicky rozbijí. Je-li NAT lokalizován v periplasmě, mechanické rozbití nebo osmotická úprava mohou být použity k uvolnění periplasmatického obsahu do pufrovaného roztoku. NAT je potom izolován přímo z roztoku. Vlastní izolace z roztoku může být provedena různými technikami. Je-li NAT syntetizován, tak obsahuje tzn. TAG , např. hexa-histidin, nebo jiný malý peptid buď karboxyl nebo amino konec, v podstatě může být purifikován v jednom kroku přes afinitní kolonovou chromatografii, kde náplň kolony je vysoce afinitní k „TAGu“ nebo přímo k polypeptidu (např. monoklonální protilátka).

Například poly-histidin se váže s vysokou afinitou a specificky k niklové afinitní koloně (např. Qiagen niklová kolona), která může být použita k purifikaci. (například v Ausubel et al., editors, current Protocols in Molecular Biology).

Na druhé straně, i když polypeptid nemá „TAG“, nebo není vhodná protilátka, jiné dobře známé metody purifikace mohou být použity. Jsou to iontoměničová chromatografie, fázově reverzní chromatografie, HPLC, nativní gelová elektroforéza v kombinaci s elucí z gelu a preparativní isoelektrická fokusace („Isoprime“ přístroj/technika, Hoefer Scientific). V některých případech dvě nebo i více těchto technik může být zkombinováno aby se docílilo vyšší čistoty.

Pro produkci NATu se s výhodou používají kvasinky, nejvýhodnější je druh *Pichia* (např. *Pichia pastoris*), kvůli jejich vyšší účinnosti při sbalování polypeptidu do původní struktury, ve srovnání s bakteriálními buňkami, např. *E.coli*. Vhodné rekombinantní metody pro expresi v kvasinkách jsou popsány v Patentu Spojených Států 4, 855, 231, (Stroman et al.), 4, 812, 405 (Lair et al.), 4, 818, 700 (Cregg et al.), 4, 885, 242 (Cregg), 4, 837, 148 (Cregg), které jsou začleněné uvnitř referencí.

Pichia buňky mohou být také použity na expresi fibrolázy z DNA molekul, které kódují tuto metaloproteinázu se stejnou efektivitou a takováto metoda představuje další hledisko předkládaného vynálezu.

Fibroláza je známá metaloproteináza, která byla popsána ve vědecké a patentové literatuře, viz. Randolph et al., a Evropská patentová žádost č. 0 323 722, citovaná výše. Většinou je exprimována fibroláza o SEQ ID NO: 5, která je kódována cDNA molekulou SEQ ID NO: 6 (nebo variantami, které kódují stejnou aminokyselinovou sekvenci). Expres fibrolázy v takovém to systému většinou navíc, kromě maturovaného polypeptidu (nukleotidy 784-1392), zahrnuje DNA molekulu o SEQ ID NO: 7, která kóduje „prepo“ sekvenci (nukleotidy 1-783).

Chemicky modifikované varianty NATu, ve kterých je polypeptid navázán na polymer nebo jinou molekulu, aby vytvořil derivát, proto aby modifikoval vlastnosti, jsou také zahrnuty v rámci tohoto předkládaného vynálezu.

Výhodné, hlavně pro lidské léčebné účely, je derivatizovat NAT tak, že je připojena jedna nebo více chemických molekul na molekulu polypeptidu. Tyto molekuly mohou být různé ve vodě rozpustné polymery. Polymer musí být ve vodě rozpustný, protože NAT, ke kterému je připojen ve vodě, jakožto ve fyziologickém prostředí

rozpustný. Ve vodě rozpustné polymery mohou být vybrány ze skupin sestávající se, například, z polyethylen-glykolu, kopolymerů ethylen-glycol/propylen-glykol, karboxy-methyl-celulosa, dextran, polyvinyl-alkohol, polyvinyl pyrrolidon, poly-1,3-dioxalan, poly-1,3,6-trioxan, ethylen/anhydrid kyseliny maleinové kopolymer polyamino kyseliny (buď homopolymery, nebo náhodné či nenáhodné kopolymery (viz.dále u fúzních molekul) a dextran nebo poly (n-vinylpyrrolidon)polyethylen-glykol, homopolymery polypropylen-glykolu, kopolymery polypropylen oxid/ethylen oxid, polyoxy-ethylované polyoly, polystyren-maleat a polyvinyl-alkohol.

Polyethylen-glykol-propion-aldehyd je vhodný pro průmyslovou výrobu díky své stabilitě ve vodě.

Polymer může mít jakoukoliv molekulární hmotnost a může být rozvětvený nebo nerozvětvený. Pro polyethylen glykol je preferovaná molekulární hmotnost mezi 2 kilodaltony (kDa) a okolo 100 kDa (termín „okolo“ znamená, že při přípravě polyethylenglykolu některé molekuly váží více, jiné o něco méně než je stanovená molekulární hmotnost), což usnadní zacházení a průmyslovou výrobu. Jiné velikosti mohou být použity v závislosti na žádaném terapeutickém profilu (např. požadovaná délka doby uvolňování, účinky na biologickou aktivitu, jsou-li nějaké, usnadnění manipulace, stupeň, nebo nedostatek antigenicity nebo jiných známých efektů polyethylenglykolu na terapeutický protein.

Počet připojených molekul polymeru může být různý a zkušený chemik je schopný zjistit účinek na funkci. Může být použita derivatizace, jak mono-, tak i di-, tri-, tetra- nebo i kombinovaná, se stejnou nebo jinou chemickou molekulou (např. polymerem o jiné molekulové hmotnosti, než je polyethylenglykol).

Poměr molekul polymeru a molekul NAT polypeptidu kolísá, stejně jako kolísá jejich koncentrace v reakční směsi. Obecně, je optimální poměr (ve smyslu efektivity reakce zde není přebytek nezreagovaného polypeptidu nebo polymeru) určen faktory jako je požadovaný stupeň derivatizace (např. mono-, di-, tri-, atd.), molekulární hmotnost vybraného polymeru, je-li polymer rozvětvený či nikoliv a reakční podmínky.

Chemické skupiny by měly být připojeny k NAT s ohledem na jejich účinek na funkci nebo antigenní domény polypeptidu. Existuje

velký počet metod pro vytvoření vazby, například viz, E- 0401 384 (spojení PEG k G-CSF) a Malik et al., Experimental Hematology, Volume 20, strany 1028-1035 (1992) (popisující „pegylaci GM-CSF pomocí chloridu tresylového). Pro ilustraci, polyethylenglykol může být kovalentně navázán přes reaktivní skupiny aminokyselinových zbytků, jako volná amino nebo karboxylová skupina. Reaktivní skupiny jsou ty, ke kterým se aktivovaná molekula polyethylenglykolu (nebo jiné chemické skupiny) může vázat.

Aminokyselinové zbytky, které mají volné aminoskupiny mohou obsahovat lyzinové zbytky a N-koncový aminokyselinový zbytek.

Ty které mají volné karboxylové skupiny, mohou obsahovat zbytky kyseliny asparagové a glutamové a C-koncový aminokyselinový zbytek. Sulfohydrylové skupiny mohou být také použity jako reaktivní skupiny pro vazbu molekuly polyethylen-glykolu nebo jiných chemických skupin. V průmyslové výrobě je preferovaná vazba aminokyseliny jako je N-konec nebo lyzinová skupina.

Je potřeba se vyvarovat vazby na reaktivní skupiny, které jsou důležité pro vazbu receptoru, je-li navázání na receptor požadováno.

N-koncová chemicky modifikovaná derivatizace může být také požadována. Pro ilustraci, různé molekuly polyethylenglykolu mohou být vybrány (podle molekulové hmotnosti, rozvětvení, atd.), různý poměr molekul polyethylenglykolu s molekul polypeptidu v reakční směsi, typy „pegylace“ a metody pro získání vybraného N-koncového pegylovaného NATu.

Metodou k získání pegylovaného N-konce (např. je-li nezbytné oddělení těchto sloučenin od jiných monopegylovaných molekul) může být purifikace N-koncově pegylovaného materiálu z populace pegylovaných NAT molekul. Selektivní N-koncová chemická modifikace může být dosažena pomocí redukující alkylace, která využívá rozdílné reaktivity různých typů primárních amino skupin (lyzin versus N-konec), které jsou k dispozici pro derivatizaci. Viz PCT žádost WO 96/11953, publikováno 25. srpna 1996.

Za vhodných reakčních podmínek je dosažena podstatně selektivní derivatizace NATu na N-konci s karboxylovou skupinou, která obsahuje polymer. Například se může použít selektivní N-koncová pegylace NATu při pH, které pak zvýhodňuje rozdíly mezi ϵ -amino skupiny lysinových zbytků a α -amino skupiny N-konce polypeptidu. Díky této selektivní

derivatizaci je připojení polymeru k polypeptidu kontrolováno: konjugace s polymerem probíhá převážně na N-konci polypeptidu a nevyskytuje se žádná významná modifikace jiných reaktivních skupin, jako je postranní řetězec amino skupin lyzinu. Při použití redukující alkylace může být použit jakýkoliv z polymerů popsany výše, a měl by mít jedinou reaktivní aldehydovou skupinu pro spojení s polypeptidem.

Polyethylenglykol propionaldehyd, obsahující jediný reaktivní aldehyd, může být použit.

NAT nebo chemicky modifikované deriváty v souhlasu s vynálezem mohou být navrženy k *in vivo* aplikaci, nejlépe přes intratrombus. (např. přes lokalizované podání přímo na místo sraženiny v cévě, např. přes katetr). Systémové podávání není běžně preferováno, kvůli pravděpodobnosti, že přirozený α_2 makroglobulin v celkovém krevním oběhu může vytvořit komplex s NAT, a tak zabránit interakci s fibrinem nebo fibrinogenem a sníží rozpuštění sraženiny. Ačkoliv mohou být případy, kdy větší množství NATu může být aplikováno, což převyší krevní hladiny α_2 makroglobulinu, a tudíž umožní systémové podávání.

Obecně, v rámci vynálezu farmaceutická sloučenina zahrnuje efektivní množství NATu společně s farmaceuticky přijatelnými ředidly, konzervačními činidly, rozpouštědly, emulgátory, adjuvans, a/nebo nosiči. „Efektivním množstvím“ je míněno množství dostatečné k produkci měřitelného biologického vlivu (např. trombolyticky efektivní množství, které způsobí rozpuštění krevní sraženiny nebo vznikající sraženiny léčí).

Typicky, NAT je ve vysoce purifikované formě a jakákoliv farmaceutická sloučenina, která bude použita jako pojídlo, bude před použitím normálně sterilizována, např. filtrací přes sterilní filtrační membrány.

Zkušený farmaceut bude schopen zjistit efektivní dávky podáváním a pozorováním požadovaného terapeutického vlivu. Určité vlivy dávek budou záviset na dané nemoci nebo stavu, který bude léčen, stejně jako na věku a celkovém zdravotním stavu příjemce, a který může být určen standardními klinickými postupy.

Kde je to možné, bude vhodné stanovit křivku farmaceutického složení odezvy na dávku, nejprve *in vitro* -jako bio-test a potom

ve vhodném zvířecím modelu (*in vivo*), před tím, než se začne s testováním na lidech. Zkušený praktický lékař, po zvážení léčebných souvislostí, typu léčené nemoci a jiných vhodných faktorů bude schopen zjistiť správné dávkování bez přílišného úsilí. Typicky, praktický lékař bude podávat sloučeninu NAT dokud nebude dosaženo dávky, která způsobí požadovaný efekt (např. rozpuštění krevní sraženiny). Sloučenina může být podávána jako jednorázová dávka, nebo ve dvou a více dávkách (které mohou ale nemusí obsahovat stejné množství polypeptidu) v určitých časech, nebo kontinuálně.

NAT může být také použit pro přípravu protilátek podle standardních metod. Protilátky mohou být polyklonální, monoklonální, rekombinantní, chimérické, jedno-řetězcové a/nebo bi-specifické, apod. Aby se vylepšila pravděpodobnost produkce imunitní odpovědi, aminokyselinová sekvence NATu může být analyzována, aby se určila část molekuly, která by mohla být spojena se zvýšenou imunogenitou. Například, aminokyselinová sekvence může být podrobena počítačové analýze, aby se určily povrchové epitopy, podle metod Hopa a Wooda, v *Proceedings of the National Academy of Science USA*, Volume 78, strany 3824-3828 (1981).

Různé známé postupy mohou být použity pro produkci polyklonálních protilátek, které rozeznají epitopy NATu. Jako hostitel na produkci protilátky mohou být imunizována různá zvířata (bez omezení králíci, myši, krysy, atd.)

Různá adjuvans mohou být použita ke zvýšení imunologické odpovědi, v závislosti na hostitelském druhu, včetně a bez omezení Freundovo adjuvans, minerální gely jako je hydroxid hlinitý, (alum), povrchově aktivní látky, jako je lysolecitin, pluronové polyoly, polyanionty, peptidy, olejové emulze, hemocyanin z přílipky, dinitrofenol a potencionálně užitečné lidské adjuvans, jako je *Bacillus Calmette-Guerin* a *Corynebacterium parvum*.

Pro přípravu monoklonálních protilátek účinných na NAT může být použita jakákoli technika, která umožňuje přípravu molekul protilátky v buněčné linii. Například, hybridomová metoda, původně vyvinuta Kohlerem a Milsteinem, která je popsána v *Nature*, Volume 256, strany 495-497 (1975), stejně jako trioma technika, metodika hybridomů lidských B-buněk popsána Kozborem et al., v *Immunology Today*, Volume 4, strana 72 (1983) a EBV-hybridomová metodika

produkce monoklonálních protilátek popsaná Coleem et al. v „Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy“, Alan R. Liss, Inc., strany 77-96 (1985). Všechny tyto metody jsou použitelné pro přípravu monoklonálních protilátek v souladu s tímto vynálezem.

Protilátky tohoto vynálezu mohou být použity k léčebným účelům, jako je vazba a tím neutralizace nebo inhibice přebytečného množství NATu *in vivo* po podání. Protilátky mohou být dále použity k diagnostickým účelům, jako třeba ve značené formě k detekci přítomnosti NATu v tělních tekutinách, vzorcích tkáně nebo jiných extraktech, v souhlasu se známými diagnostickými metodami.

Příklady provedení vynálezu

Dále je vynález ilustrován následujícími příklady.

Příklad 1

Odvození sekvence NATu

Efektivní způsob výroby fibrolázy je exprimovat ji jako prefibrolázu, která je štěpena proteázou kex-2 na „prepo“ a „maturovanou“ část. (Získá se biologicky aktivní materiál („maturovaná“ fibroláza)).

V tomto uspořádání, vede syntéza a procesování prefibrolázy k sekreci maturované fibrolázy do kultivačního média. Skutečná sekvence v štěpeném místě je (...TKR↓QQRF...).

Kex-2 je endoproteáza která štěpí za dvěma sousedními basickými aminokyselinami, v tomto případě lysinem (K)-argininem (R). Zralá fibroláza exprimovaná z DNA má, již výše zmíněný, N-koncový glutamín (Q), který byl pozměněn deaminací a cyklizací na pyroglutamovou kyselinu (E). Tato chemická modifikace byla považována za nežádoucí, protože peptidy s N-koncovým cyklickým glutamínem (pyroglutamová kyselina) selhávaly při reakci v Edmanově odbourávání-aminokyselinovém sekvenování. Tudíž byly oba glutamíny (Q) na N-konci v sekvenci zralé fibrolázy odstraněny, a N-koncem se stal arginin (R). Protože kex-2 štěpí po dvou sousedních bazických aminokyselinách, jak bylo zmíněno, očekávalo se, že sekvence (...KR↓RF...), ukáže nejednoznačné místo pro štěpení kex-2.

Proto byl N-koncový arginin (R) (podtržený) nahrazen serinem (S) s výslednou sekvencí (...KRSF...). Serin byl vybrán na základě potřeby vložení aminokyseliny, která usnadní štěpení kex-2, když se vyskytne na C-konci místa hydrolýzi. Rholam et al., European Journal of biochemistry, Volume 227, strany 707-714 (1995).

DNA sekvence preprofibrolázy byla modifikována metodou cílené mutagenese na N-konci kódující sekvence maturované fibrolázy, tak aby se nahradil kodón pro „QQR“ kodónem pro „S“, použitím standardního PCR protokolu. Výsledkem je prepoNAT o aminokyselinové sekvenci SEQ ID NO:3. Oligonukleotidy použité jako primery pro PCR reakce jsou sepsány dále a jejich homologie s cílovou sekvencí je také naznačena. Na začátku byly provedeny 2 PCR reakce za použití oligonukleotidů 1 a 4 v jednom páru a oligonukleotidy 2 a 3 v druhém páru primerů. Templátem byla DNA. PCR produkty těchto reakcí (601 a 815 nukleotidů dlouhé) byly následně přečištěny pomocí agarozové gelové elektroforézy a dále sloužily jako templát pro druhé kolo PCR za použití oligonukleotidů 1 a 2 jako primerů. Tento konečný PCR produkt (1372 nukleotidů dlouhý) byl štěpen restričními endonukleázami *XhoI* a *NotI*. Rozštěpená směs byla zbavena proteinu pomocí fenol/chloroformu a DNA vysrážena. Část této znovu získané DNA byla vložena do plazmidu pPICZα (Invitrogen, Carlsbad, CA, Katalogové č. VI95-20), který byl shodně naštěpen restričními endonukleázami *XhoI* a *NotI*, enzymaticky defosforylován a zbaven proteinu fenol/chloroformem.

Všechny další kroky byly prováděny podle příručky Expresního Kitu- Invitrogen Pichia (Invitrogen Corp., katalogové č. K1710-01). Produkty ligační reakce byly transformovány do *E.coli* pomocí elektroporace a ty selektovány na pevném médiu s zeocinem. Plasmid byl vyizolován a sekvence prefibrolázy byla ověřena DNA sekvenováním. Plasmid byl linearizován štěpením restriční endonukleázou *PmeI* a dále transformován do *Pichia pastoris* GS115 his^+ . Rod GS115 je běžně his^- , his^+ genotyp byl obnoven transformací DNA, která kóduje divokou (wild-type) verzi genu *his4*. Alternativně může být his^+ druh získán komerčně od Invitrogenu (X-33 tkáňová kultura, katalogové č. C180-00). Úspěšně integrované komplexy byly selektovány jako kolonie rezistentní na zeocin. Kandidátní klony byly indukovány kultivačním médiem, které

obsahovali methanol a kultura byla testována na produkci NATu na 4-20 % PAGE, barvením Coomassie.

Pro cílenou PCR mutagenezu byly použity následující oligonukleotidy:

Oligo 1 5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3' (SEQ ID NO: 8)

Oligo 2 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3' (SEQ ID NO: 9)

Oligo 3 (SEQ ID NO: 10)

5'-TCCAATTAACTTGACTAAGAGTCTTCCCACAAAGATACGTAC-3'

Oligo 4 (SEQ ID NO: 11)

5'-GTACGTATCTTTGTGGGAAAGATCTCTTAGTCAAGTTTAATTGG-3'

Umístění těchto oligonukleotidů je naznačeno níže na dvouvláknové sekvenci DNA (SEQ ID NO: 12 kódující nebo-li sens vlákno, SEQ ID NO: 13, komplementární nebo-li antisens vlákno) a korespondující aminokyselinová sekvence (SEQ ID NO:14) fibrolázy (včetně prepo úseku). N-koncové a C-koncové oblasti maturované fibrolázy jsou označeny podtržením koncové aminokyselinové sekvence (QQRF a LNKP). N-koncová oblast (QQRF) je modifikována (nahrazení S za QQF). V oligonukleotidech 3 a 4, značí vložené pomlčky místo, kde byly vynechány kodóny kódující aminokyseliny QQ na N-konci fibrolázy.

ATGAGATTTCCTTCAATTTTACTGCTGTTTTATTGCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TACTCTAAAGGAAGTTAAAAATGACGACAAAATAAGCGTCGTAGGAGGCGTAATCGACGA

M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A

CCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATCCGGCTGAAGCTGTCATCGGT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GGTCAAGTTGTGATGTTGTCTTCTACTTTGCCGTGTTTAAGGCCGACTTCGACAGTAGCCA

P V N T T T E D E T A Q I P A E A V I G

TACTCAGATTTAGAAGGGGATTTGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAAT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ATGAGTCTAAATCTTCCCCTAAAGCTACAACGACAAAACGGTAAAAGGTTGTCGTGTTTA

Y S D L E G D F D V A V L P F S N S T N

Oligo 1 5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3'

AACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTGCCCAATAACAAATATTTATGATGATAACGGTCGTAACGACGATTCTTCTTCCCCTAT

N G L L F I N T T I A S I A A K E E G V

XhoI

TCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTTCTTCTATTATCTTGGAACTCTGGTAACGTTAAC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AGAGAGCTCTTTTCTCTCCGACTTCGAAGAAGATAATAGAACCTTAGACCATTGCAATTG

 S L E K R E A E A S S I I L E S G N V N

 GATTACGAAGTTGTTTATCCAAGAAAGGTCACCTCCAGTTCCTAGGGGTGCTGTTCAACCA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTAATGCTTCAACAAATAGGTTCTTTCCAGTGAGGTCAAGGATCCCCACGACAAGTTGGT

 D Y E V V Y P R K V T P V P R G A V Q P

 AAGTACGAAGATGCCATGCAATACGAATTCAAGGTTAACAGTGAACCAGTTGTCTTGCAC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTCATGCTTCTACGGTACGTTATGCTTAAGTTCCAATTGTCACTTGGTCAACAGAACGTG

 K Y E D A M Q Y E F K V N S E . P V V L H

 TTGGAAAAAAACAAAGGTTTGTCTCTGAAGATTACTCTGAACTCATTACTCCCCAGAT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AACCTTTTTTTGTTTCCAACAAGAGACTTCTAATGAGACTTTGAGTAATGAGGGGTCTA

 L E K N K G L F S E D Y S E T H Y S P D

 GGTAGAGAAATTACTACTTACCCATTGGGTGAAGATCACTGTTACTACCATGGTAGAATC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCATCTCTTTAATGATGAATGGGTAACCCACTTCTAGTGACAATGATGGTACCATCTTAG

 G R E I T T Y P L G E D H C Y Y H G R I

 GAAAACGATGCTGACTCCACTGCTTCTATCTCTGCTTGTAACGGTTTGAAGGGTCATTTC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTTTGTGCTACGACTGAGGTGACGAAGATAGAGACGAACATTGCCAACTTCCCAGTAAAG

 E N D A D S T A S I S A C N G L K G H F

 AAGTTGCAAGGTGAAATGTACTTGATTGAACCATTGGAATTGTCCGACTCTGAAGCCCAT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTCAACGTTCCACTTTACATGAACTAAGTTGTAACCTTAACAGGCTGAGACTTCGGGTA

 K L Q G E M Y L I E P L E L S D S E A H

GCTGTCTACAAGTACGAAAACGTCGAAAAGGAAGATGAAGCCCCAAAGATGTGTGGTGT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CGACAGATGTTTCATGCTTTTGCAGCTTTTCCTTCTACTTCGGGGTTTCTACACACCACAA
 A V Y K Y E N V E K E D E A P K M C G V

Oligo 3 5'-TCCAATTAACTTGACTAAG
 ACCCAAACTGGGAATCATATGAACCAATCAAGAAGGCCTTCCAATTAACTTGACTAAG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TGGGTTTGGACCCCTTAGTATACTTGGTTAGTTCTTCCGGAAGGTTAATTTGAACTGATTC
 Oligo 4 3'-GGTTAATTTGAACTGATTC

T Q N W E S Y E P I K K A F Q L N L T K
 AGA-----TCTTTCCCACAAAGATACGTAC-3'
 AGACAACAAAGATTCCCACAAAGATACGTACAGCTGGTTATCGTTGCTGACCACCGTATG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TCTGTTGTTTCTAAGGGTGTTCCTATGCATGTGCGACCAATAGCAACGACTGGTGGCATACT
 TCT-----AGAAAGGGTGTTCCTATGCATG-5'

R Q Q R E P Q R Y V Q L V I V A D H R M
 AACACTAAATACAACGGTGACTCTGACAAAATCCGTCAATGGGTGCACCAAATCGTCAAC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTGTGATTTATGTTGCCACTGAGACTGTTTTAGGCAGTTACCCACGTGGTTTAGCAGTTG
 N T K Y N G D S D K I R Q W V H Q I V N

ACCATTAACGAAATCTACAGACCACTGAACATCCAATTCACTTTGGTTGGTTTGGAAATC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TGGTAATTGCTTTAGATGTCTGGTGACTTGTAGGTTAAGTGAACCAACCAACCTTTAG
 T I N E I Y R P L N I Q F T L V G L E I
 TGGTCCAACCAAGATTTGATCACCGTTACTTCTGTATCCCACGACACTCTGGCATCCTTC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ACCAGGTTGGTTCTAAACTAGTGGCAATGAAGACATAGGGTGCTGTGAGACCGTAGGAAG

W S N Q D L I T V T S V S H D T L A S F

03.04.03

GGTAACTGGCGTGAAACCGACCTGCTGCGTCGCCAACGTCATGATAACGCTCAACTGCTG

-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCATTGACCGCACTTTGGCTGGACGACGCAGCGGTTGCAGTACTATTGCGAGTTGACGAC

G N W R E T D L L R R Q R H D N A Q L L

ACCGCTATCGACTTCGACGGTGATACTGTTGGTCTGGCTTACGTTGGTGGCATGTGTCAA

-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGGCGATAGCTGAAGCTGCCACTATGACAACCAGACCGAATGCAACCACCGTACACAGTT

T A I D F D G D T V G L A Y V G G M C Q

CTGAAACATTCTACTGGTGTTATCCAGGACCACTCCGCTATTAACCTGCTGGTTGCTCTG

-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GACTTTGTAAGATGACCACAATAGGTCCTGGTGAGGCGATAATTGGACGACCAACGAGAC

L K H S T G V I Q D H S A I N L L V A L

ACCATGGCACACGAACTGGGTCATAACCTGGGTATGAACCACGATGGCAACCAGTGTCAC

-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGGTACCGTGTGCTTGACCCAGTATTGGACCCATACTTGGTGCTACCGTTGGTCACAGTG

T M A H E L G H N L G M N H D G N Q C H

TGCGGTGCAAACCTCCTGTGTTATGGCTGCTATGCTGTCCGATCAACCATCCAAACTGTTT

-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACGCCACGTTTGAGGACACAATACCGACGATACGACAGGCTAGTTGGTAGGTTTGACAAG

C G A N S C V M A A M L S D Q P S K L F

TCCGACTGCTCTAAGAAAGACTACCAGACCTTCCTGACCGTTAACAACCCGCGAGTGATC

-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGGCTGACGAGATTCTTTCTGATGGTCTGGAAGGACTGGCAATTGTTGGGCGTCACATAG

S D C S K K D Y Q T F L T V N N P Q C I

NotI

|

CTGAACAAACCGTAAGCGGCCGCGCTTTCTAGAACAAAACCTCATCTCAGAAGAGGAT

-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GACTTGTGTTGGCATTGCGCCGCGGTCGAAAGATCTTGTTTGTGAGTAGAGTCTTCTCCTA

L N K P * A A A S F L E Q K L I S E E D

CTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCATCATGAGTTTGTAGCCTTAGACATGAC

-----+-----+-----+-----+-----+
GACTTATCGCGGCAGCTGGTAGTAGTAGTAGTAGTAACTCAAACATCGGAATCTGTACTG

L N S A V D H H H H H * V C S L R H D

TGTTCCCTCAGTTCAAGTTGGGCACTTACGAGAAGACCGGTCTTGCTAGATTCTAATCAAG

-----+-----+-----+-----+-----+
ACAAGGAGTCAAGTTCAACCCGTGAATGCTCTTCTGGCCAGAACGATCTAAGATTAGTTC

C S S V Q V G H L R E D R S C * I L I K

AGGATGTCAGAATGCCATTTGCCTGAGAGATGCAGGCTTCATTTTGTACTTTTTTATT

-----+-----+-----+-----+-----+
TCCTACAGTCTTACGGTAAACGGACTCTCTACGTCCGAAGTAAAACTATGAAAAAATAA
CCTACAGTCTTACGGTAAACG-5' Oligo 2

R M S E C H L P E R C R L H F * Y F F I -

Příklad 2

Expres NATu v *Pichia pastoris*

Při pokusech exprimovat DNA NATu v *E.coli*, velmi slabé sbalení do sekundární struktury a požadavek na zředěné podmínky snížily efektivitu purifikace. Tyto a jiné úvahy vedly k použití druhu kvasinek *Pichia pastoris* jako hostitelské buňky. Kultura selektovaných buněčných klonů *Pichia pastoris*, které byly transfekovány cDNA prepo NATu (SEQ ID NO: 4) byla inokulována do 500 ml inokulačního růstového média, popsaného zde:

Na 1 litr média

Kvasničný extrakt	30,0 g
Fosforečnan draselný dihydrát	17,2 g
Glukóza	20,0 g
Biotin	0,004 g
Voda	do 1 litru
Fosforečná kyselina, 85%	upravit pH na 6,00

Transfekované *P.pastoris* byly inkubovány ve 30°C ve třepačce po dobu 30-32 hodin. Přibližně 1% (hmotnostní) výsledné kultury bylo použito jako inokulum do 10-ti litrového fermentoru. Fermentor obsahoval sterilní základní soli a glukózu (níže). Dvanáct mililitrů na litr PTM4 solí (PTM4 je roztok stopových kovů obsahující síran měďný pentahydrát, jodid sodný, síran hořečnatý monohydrát, molybden sodný dihydrát, kyselina boritá, chlorid kobaltnatý hexahydrát, chlorid zinečnatý, síran železnatý heptahydrát, d-biotin, kyselina sírová a purifikovaná voda) bylo přidáno do litrové dávky média po sterilizaci fermentoru. Růstová teplota ve fermentoru byla 30°C. pH ve fermentoru bylo regulováno hydroxidem amonným a kyselinou fosforečnou na hodnotu 6.00. Zinek ze zinečnatých solí, které byly přidány do média byly inkorporovány do NATu jako součást struktury metaloproteinázy.

Základní soli na litrovou dávku média

Fosforečná kyselina, 85%	26,7 ml
Síran vápenatý	0,93 g
Síran draselný	18,2 g
Síran hořečnatý-7 H ₂ O	14,9 g

Hydroxid draselný	4,13 g
Glukóza	30,0 g
Voda	do 1 litru

Kultura se nechá růst, dokud není veškerá glukóza spotřebována (17 až 20 hodin). Potom se začne se „sytící“ fází. „Sytící“ médium je tvořeno glukózou a 12 ml PTM4 solí na 1 litr. Indukce sycení se sestává z glukózy, 25% metanolu, a 12 ml PTM4 solí na 1 litr. Při indukci je teplota reaktoru 20°C. Indukční fáze trvá 60 až 75 hodin. Upravená média byla sklizena a buněčné zbytky byly vyhozeny.

Příklad 3

Purifikace NATu z *Pichia pastoris*

Kvasinková živná půda z Příkladu 2 byla vyčištěna a upraveno pH na 6,5 a vodivost 10-20mS/ cm. Živná půda byla nalita na imobilizovanou kovovou afinitní pryskyřici, která byla naplněna mědí a ekvilibrována fosfátovým pufrem (PBS). Pryskyřice byla opláchnuta v PBS a vymývána gradientem imidazolu (0-100 mM) v PBS. Frakce, které obsahovaly maturovaný NAT (SEQ ID No:1) byly dány dohromady a ředěny dokud vodivost nebyla nižší než 1,5 mS/cm, pH 6,4. Ředěný vzorek byl nalit na SP Sefarózovou pryskyřici (Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ), která byla ekvilibrována 10 mM 2-(N-morfolino)ethan-sírovou kyselinou (MES). Kolona byla omyta pomocí MES a eluována a vymyta pomocí gradientu NaCl (0-500mM) v MES. Frakce, které obsahovaly NAT byly dány dohromady a uschovány.

Příklad 4

Trombolýza v akutní trombóze v krysí krkavici, porovnání NATu s Urokinázou

Aby se prokázala biologická aktivita a funkční jednoznačnost maturovaného NATu (SEQ ID NO:1) byly provedeny farmakologické studie na krysách. Anodovým proudem bylo vytvořeno ohniskové poškození na jedné krkavici. Toto poškození vyvolalo do 15 minut vytvoření okluzivní krevní sraženiny. Po vytvoření trombu, byla tepna ještě po 30 minut pozorována, zda je okluze krkavice stabilní. Poté byl aplikován intravenózně heparin a aspirin, aby se předešlo šíření trombu. Zvířata byla léčena pomocí intra-arteriálních infuzí

testované látky. Byl sledován průtok krve krkavicí během podávání testovaného materiálu, takže úspěšné rozpuštění krevní sraženiny mohlo být detekováno a také mohl být zaznamenán čas lýzy. Procenta pokusů, kdy byla sraženina rozpuštěna byly zaznamenány a vypočítán průměr pouze u těch, kde byla sraženina úspěšně rozpuštěna. Protože je měřen hemoragický potenciál testované látky, všechna krev která byla vyloučena z operačního místa byla sbírána gázovými tampóny. Tampóny byly umístěny do roztoku detergentu, aby se rozpustily červené krvinky a množství uvolněného hemoglobinu bylo poté měřeno spektrofotometricky.

Podle množství vysušeného hemoglobinu byly vypočítány ztráty krve. Data získaná v testech jsou uvedena v tabulce dále.

Table 1

Výskyt lýzy krevní sraženiny, čas za který došlo k rozpuštění sraženiny a operační ztráty krve (průměr $\pm$ standardní odchylka)

	VÝSKYT LÝZY (%)	ČAS (min)	KREVNÍ ZTRÁTY (ml)
FYZIOLOGICKÝ ROZTOK (n=6)	0% (0 ze 6)	NEMĚŘENO	0,10 $\pm$ 0,23
Urokináza 25 U/ min (n=15)	33% (5 z 15)	55,3 $\pm$ 15,9	1,06 $\pm$ 1,59
Urokináza 250 U/ml (n=15)	86 % (13 z 15)	33,5 $\pm$ 15,3	1,43 $\pm$ 1,45
NAT 2mg (n=14)	78% (11 z 14)	6,3 $\pm$ 5,8	0,96 $\pm$ 0,77

Tyto studie prokazují, že NAT je biologicky aktivní na zvířecím modelu v *in vivo* lýze krevní sraženiny.

Dále, rozpuštění krevní sraženiny bylo dosaženo ve značně kratším čase a s menšími ztrátami krve z operačního místa, v porovnání s urokinázou. Tak profil aktivity NATu může být odlišen od třídy plasminogen-aktivátorů trombolytických činitelů

(reprezentovaných urokinázou), tak že rozpuštění krevní sraženiny NATem proběhne rychleji a se sníženými hemoragickými komplikacemi.

Fibrinolytická aktivita NATu je srovnatelná s firolázou. A navíc, jak bylo zmíněno výše, stabilita N-konce NATu vede k větší homogenitě koncového produktu při rekombinantní expresi, což je nesporná výhoda (např. N-konec se v čase nemění na směs různých forem, což vytváří stabilnější polypeptid).

Obrázek 1

MRFPSIFTAV LFAASSALAA PVNTTTEDET AOIPAEAVIG
YSDLEGDFDV AVLPFSNSTN NGLLFINTTI ASIAAKEEGV
SLEKREAEAS SIILESGNVN DYEVVYPRKV TPVPRGAVQP
KYEDAMOYEF KVNSEPVVLH LEKNKGLFSE DYSETHYSPD
GREITTYPLG EDHCYYHGRI ENDADSTASI SACNGLKGHF
KLOGEMYLIE PLELSDSEAH AVYKYENVEK EDEAPKMCGV
TONWESYEPI KKAFQLNLTK RSFPQRYVQL VIVADHRMNT
KYNGDSDKIR QWVHQIVNTI NEIYRPLNIQ FTLVGLEIWS
NQDLITVTSV SHDTLASFGN WRETDLRRQ RHDNAQLLTA
IDFDGDTVGL AYVGGMCLK HSTGVIQDHS AINLLVALTM
AHELGHNLGM NHDGNQCHCG ANSCVMAAML SDQPSKLFSD
CSKKDYQTFL TVNNPQCILN KP

Seznam sekvencí

<110> Boone, Thomas C.
 Li, Huimin
 Mann, Michael B.

<120> Fybrinolyticky aktivní polypeptid

<130> A-596

<140> 09/411,329

<141> 1999-10-01

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 201

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: NAT (analog fibrolázy z Agkistrodon contortrix)

<400> 1

Ser Phe Pro Gln Arg Tyr Val Gln Leu Val Ile Val Ala Asp His Arg
 1 5 10 15

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Gly Asp Ser Asp Lys Ile Arg Gln Trp Val
 20 25 30

His Gln Ile Val Asn Thr Ile Asn Glu Ile Tyr Arg Pro Leu Asn Ile
 35 40 45

Gln Phe Thr Leu Val Gly Leu Glu Ile Trp Ser Asn Gln Asp Leu Ile
 50 55 60

Thr Val Thr Ser Val Ser His Asp Thr Leu Ala Ser Phe Gly Asn Trp
 65 70 75 80

Arg Glu Thr Asp Leu Leu Arg Arg Gln Arg His Asp Asn Ala Gln Leu
 85 90 95

Leu Thr Ala Ile Asp Phe Asp Gly Asp Thr Val Gly Leu Ala Tyr Val
 100 105 110

Gly Gly Met Cys Gln Leu Lys His Ser Thr Gly Val Ile Gln Asp His
 115 120 125

Ser Ala Ile Asn Leu Leu Val Ala Leu Thr Met Ala His Glu Leu Gly
 130 135 140

His Asn Leu Gly Met Asn His Asp Gly Asn Gln Cys His Cys Gly Ala
 145 150 155 160

28

Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Ser Ser Ile Ile Leu Glu Ser
 85 90 95
 Gly Asn Val Asn Asp Tyr Glu Val Val Tyr Pro Arg Lys Val Thr Pro
 100 105 110
 Val Pro Arg Gly Ala Val Gln Pro Lys Tyr Glu Asp Ala Met Gln Tyr
 115 120 125
 Glu Phe Lys Val Asn Ser Glu Pro Val Val Leu His Leu Glu Lys Asn
 130 135 140
 Lys Gly Leu Phe Ser Glu Asp Tyr Ser Glu Thr His Tyr Ser Pro Asp
 145 150 155 160
 Gly Arg Glu Ile Thr Thr Tyr Pro Leu Gly Glu Asp His Cys Tyr Tyr
 165 170 175
 His Gly Arg Ile Glu Asn Asp Ala Asp Ser Thr Ala Ser Ile Ser Ala
 180 185 190
 Cys Asn Gly Leu Lys Gly His Phe Lys Leu Gln Gly Glu Met Tyr Leu
 195 200 205
 Ile Glu Pro Leu Glu Leu Ser Asp Ser Glu Ala His Ala Val Tyr Lys
 210 215 220
 Tyr Glu Asn Val Glu Lys Glu Asp Glu Ala Pro Lys Met Cys Gly Val
 225 230 235 240
 Thr Gln Asn Trp Glu Ser Tyr Glu Pro Ile Lys Lys Ala Phe Gln Leu
 245 250 255
 Asn Leu Thr Lys Arg Ser Phe Pro Gln Arg Tyr Val Gln Leu Val Ile
 260 265 270
 Val Ala Asp His Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asn Gly Asp Ser Asp Lys
 275 280 285
 Ile Arg Gln Trp Val His Gln Ile Val Asn Thr Ile Asn Glu Ile Tyr
 290 295 300
 Arg Pro Leu Asn Ile Gln Phe Thr Leu Val Gly Leu Glu Ile Trp Ser
 305 310 315 320
 Asn Gln Asp Leu Ile Thr Val Thr Ser Val Ser His Asp Thr Leu Ala
 325 330 335
 Ser Phe Gly Asn Trp Arg Glu Thr Asp Leu Leu Arg Arg Gln Arg His
 340 345 350
 Asp Asn Ala Gln Leu Leu Thr Ala Ile Asp Phe Asp Gly Asp Thr Val
 355 360 365

Gly Leu Ala Tyr Val Gly Gly Met Cys Gln Leu Lys His Ser Thr Gly
 370 375 380

Val Ile Gln Asp His Ser Ala Ile Asn Leu Leu Val Ala Leu Thr Met
 385 390 395 400

Ala His Glu Leu Gly His Asn Leu Gly Met Asn His Asp Gly Asn Gln
 405 410 415

Cys His Cys Gly Ala Asn Ser Cys Val Met Ala Ala Met Leu Ser Asp
 420 425 430

Gln Pro Ser Lys Leu Phe Ser Asp Cys Ser Lys Lys Asp Tyr Gln Thr
 435 440 445

Phe Leu Thr Val Asn Asn Pro Gln Cys Ile Leu Asn Lys Pro
 450 455 460

<210> 4
 <211> 1386
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: kóduje pro-NAT (analog fibrolázy)

<400> 4
 atgagatttc cttcaatttt tactgctgtt ttattcgcag catcctccgc attagctgct 60
 ccagtcaaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggt 120
 tactcagatt tagaagggga tttcgatgtt gctgttttgc cattttccaa cagcacaat 180
 aacgggttat tgtttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta 240
 tctctcgaga aaagagaggc tgaagcttct tctattatct tgggaatctgg taacgttaac 300
 gattacgaag ttgtttatcc aagaaaggtc actccagttc ctagggggtgc tgttcaacca 360
 aagtacgaag atgccatgca atacgaattc aagggttaaca gtgaaccagt tgtcttgac 420
 ttggaaaaaa acaaaggttt gttctctgaa gattactctg aaactcatta ctccccagat 480
 ggtagagaaa ttactactta cccattgggt gaagatcact gttactacca tggtagaatc 540
 gaaaacgatg ctgactccac tgcttctatc tctgcttgta acggtttgaa gggtcatttc 600
 aagttgcaag gtgaaatgta cttgattgaa ccattggaat tgtccgactc tgaagcccat 660
 gctgtctaca agtacgaaaa cgtcgaaaag gaagatgaag ccccaaagat gtgtggtggt 720
 acccaaaact gggaatcata tgaaccaatc aagaaggcct tccaattaaa cttgactaag 780
 agatctttcc cacaagata cgtacagctg gttatcggtg ctgaccaccg tatgaacact 840
 aaatacaacg gtgactctga caaatccgt caatgggtgc accaaatcgt caacaccatt 900
 aacgaaatct acagaccact gaacatccaa ttcactttgg ttgggttggg aatctggtcc 960
 aaccaagatt tgatcacctg tacttctgta tcccacgaca ctctggcatc cttcggtaac 1020
 tggcgtgaaa ccgacctgct gcgtcgccaa cgctcatgata acgctcaact gctgaccgct 1080
 atcgacttcg acggtgatac tggttgcttg gcttacgttg gtggcatgtg tcaactgaaa 1140
 cattctactg tggttatcca ggaccactcc gctattaacc tgctggttgc tctgaccatg 1200
 gcacacgaac tgggtcataa cctgggtatg aaccacgatg gcaaccagtg tcaactgagg 1260
 gcaaaactct gtgttatggc tgctatgctg tccgatcaac catccaaact gttctccgac 1320
 tgctctaaga aagactacca gaccttctg accgttaaca acccgcatgt tatcctgaac 1380
 aaaccg 1386

<210> 5
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> Agkistrodon contortrix

<220>
 <223> Nativní fibroláza z Agkistrodon contortrix

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

<210> 6
 <211> 609
 <212> DNA
 <213> Agkistrodon contortrix

<220>
 <223> Kóduje nativní fibrolázu z Agkistrodon contortrix

<400> 6

```

caacaaagat tcccacaaag atacgtacag ctgggttatcg ttgctgacca ccgtatgaac 60
actaaataca acggtgactc tgacaaaatc cgtcaatggg tgcaccaaact cgtcaacacc 120
attaacgaaa tctacagacc actgaacatc caattcactt tgggttggtt ggaaatctgg 180
tccaaccaag atttgatcac cgttacttct gtatcccacg acactctggc atccttcggt 240
aactggcggtg aaaccgacct gctgcgtcgc caacgtcatg ataacgctca actgctgacc 300
gctatcgact tcgacggtga tactgttggt ctgggttacg ttgggtggcat gtgtcaactg 360
aaacattcta ctggtgttat ccaggaccac tccgctatta acctgctggt tgctctgacc 420
atggcacacg aactgggtca taacctgggt atgaaccacg atggcaacca gtgtcactgc 480
ggtgcaaact cctgtgttat ggctgctatg ctgtccgacg aaccatccaa actgttctcc 540
gactgctcta agaaagacta ccagaccttc ctgaccgtta acaaccgcga gtgtatcctg 600
aacaaccg

```

609

<210> 7

<211> 1392

<212> DNA

<213> *Agkistrodon contortrix*

<220>

<223> Kódující sekvence nativní pro-fibrolázy
z *Agkistrodon contortrix*

<400> 7

```

atgagatttc cttcaatttt tactgctggt ttattcgcag catcctccgc attagctgct 60
ccagtcaaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaatc cggctgaagc tgtcatcggt 120
tactcagatt tagaaggga tttcgaatgt gctgttttgc cattttccaa cagcacaact 180
aacgggttat tgtttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta 240
tctctcgaga aaagagaggc tgaagcttct tctattatct tggaatctgg taacgttaac 300
gattacgaag ttgtttatcc aagaaaggtc actccagttc ctagggggtgc tgttcaacca 360
aagtacgaag atgccatgca atacgaatc aagggttaaca gtgaaccagt tgtcttgac 420
ttggaaaaaa acaaagggtt gttctctgaa gattactctg aaactcatta ctcccagat 480
ggtagagaaa ttactactta cccattgggt gaagatcact gttactacca tggtagaatc 540
gaaaacgatg ctgactccac tgcttctatc tctgcttgta acggtttgaa gggcatttcc 600
aagttgcaag gtgaaatgta cttgattgaa ccattggaat tgtccgactc tgaagcccat 660
gctgtctaca agtacgaaaa cgtcgaaaag gaagatgaag ccccaaagat gtgtggtggt 720
acccaaaaact gggaatcata tgaaccaatc aagaaggcct tccaattaaa cttgactaag 780
agacaacaaa gattcccaca aagatacgta cagctgggta tcgttgctga ccaccgtatg 840
aacactaaat acaacggtga ctctgacaaa atccgtcaat ggggtgcacca aatcgtcaac 900
accattaacg aaatctacag accactgaac atccaattca ctttggttgg tttggaaatc 960
tggtccaacc aagatttgat caccgttact tctgtatccc acgacactct ggcacacctc 1020
ggtaactggc gtgaaaccga cctgctgcgt cgccaacgtc atgataacgc tcaactgctg 1080
accgctatcg acttcgacgg tgatactggt ggtctggctt acgttggtgg catgtgtcaa 1140
ctgaaacatt ctactggtgt tatccaggac cactccgcta ttaacctgct ggttgctctg 1200
accatggcac acgaactggg tcataacctg ggtatgaacc acgatggcaa ccagtgtcac 1260
tgcggtgcaa actcctgtgt tatggctgct atgctgtccg atcaaccatc caaactgttc 1320
tccgactgct ctaagaaaga ctaccagacc ttctgaccg ttaacaaccc gcagtgtatc 1380
ctgaacaaac cg

```

1392

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Oligonukleotid

<400> 8

tactattgcc agcattgctg c

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Oligonukleotid

<400> 9

cctacagtct tacggtaaac g

<210> 10

<211> 45

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Oligonukleotid

<400> 10

tcctaataaa cttgactaag agatctttcc cacaagata cgtac

<210> 11

<211> 44

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Oligonukleotid

<400> 11

ggttaatttg aactgattct ctagaaaggg tgtttctatg catg

<210> 12

<211> 1620

<212> DNA

<213> Agkistrodon contortrix

<220>

<221> misc_feature

<222> Komplement ((1)..(1620))

<223> Komplementární (sens) řetězec k antisensovému řetězci
(viz SEQ ID NO:13)

<220>

<223> Kódující sekvence nativní pro-fibrolázy
z Agkistrodon contortrix

<400> 12

```

atgagatttc cttcaatttt tactgctggt ttattcgcag catcctccgc attagctgct 60
ccagtcaaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggg 120
tactcagatt tagaagggga tttcgaatgt gctgttttgc cattttccaa cagcacaaat 180
aacgggttat tgtttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta 240
tctctcgaga aaagagaggc tgaagcttct tctattatct tggaatctgg taacgttaac 300
gattacgaag ttgtttatcc aagaaaggtc actccagttc ctagggtggtc tgttcaacca 360
aagtacgaag atgccatgca atacgaattc aagggttaaca gtgaaccagt tgtcttgac 420
ttggaaaaaa acaaagggtt gtctctgaa gattactctg aaactcatta ctcccagat 480
ggtagagaaa ttactactta cccattgggt gaagatcact gttactacca tggtagaatc 540
gaaaacgatg ctgactccac tgcttctatc tctgcttgta acggtttgaa gggtcatttc 600
aagttggaag gtgaaatgta cttgattgaa ccattggaat tgtccgactc tgaagcccat 660
gctgtctaca agtacgaaaa cgtcgaaaag gaagatgaag ccccaaagat gtgtgggtgt 720
acccaaaact gggaatcata tgaaccaatc aagaaggcct tccaattaaa cttgactaag 780
agacaacaaa gattcccaca aagatacgta cagctgggta tcggttgctga ccaccgtatg 840
aacactaaat acaacgggtga ctctgacaaa atccgtcaat ggggtgcacca aatcgtcaac 900
accattaacg aaatctacag accactgaac atccaattca ctttgggttg tttggaaatc 960
tggtccaacc aagatttgat caccgttact tctgtatccc acgacactct ggcaccttc 1020
ggtaactggc gtgaaaccga cctgctgctg cgccaacgct atgataacgc tcaactgctg 1080
accgctatcg acttcgacgg tgatactgtt ggtctggctt acgttgggtg catgtgtcaa 1140
ctgaaacatt ctactgggtg tatccaggac cactccgcta ttaacctgct ggttgctctg 1200
accatggcac acgaactggg tcataacctg ggtatgaacc acgatggcaa ccagtgtcac 1260
tgcggtgcaa actcctgtgt tatggctgct atgctgtccg atcaaccatc caaactgttc 1320
tcgactgct ctaagaaaga ctaccagacc ttctgaccg ttaacaaccc gcagtgtatc 1380
ctgaacaaac cgtaagcggc cgccagcttt ctagaacaaa aactcatctc agaagaggat 1440
ctgaatagcg ccgtcgacca tcatcatcat catcattgag tttgtagcct tagacatgac 1500
tgttcctcag ttcaagttgg gcacttacga gaagaccggg cttgctagat tctaatacag 1560
aggatgtcag aatgccattt gcctgagaga tgcaggcttc atttttgata cttttttatt 1620

```

<210> 13

<211> 1620

<212> DNA

<213> Agkistrodon contortrix

<220>

<221> misc_feature

<222> Complement((1)..(1620))

<223> Komplementární (antisens) řetězec k sens řetězci
(viz SEQ ID No:12)

<220>

<223> Anti-kódující sekvence nativní pro-fibrolázy
z Agkistrodon contortrix

<400> 13

```

aataaaaaag tatcaaaaat gaagcctgca tctctcaggc aaatggcatt ctgacatcct 60
cttgattaga atctagcaag accggtcttc tcgtaagtgc ccaacttgaa ctgaggaaca 120
gtcatgtcta aggctacaaa ctcaatgatg atgatgatga tggtcgacgg cgctattcag 180

```

```

atcctcttct gagatgagtt tttgttctag aaagctggcg gccgcttacg gtttgttcag 240
gatacactgc gggttgttaa cggtcaggaa ggtctggttag tctttcttag agcagtcgga 300
gaacagtttg gatggttgat cggacagcat agcagccata acacaggagt ttgcaccgca 360
gtgacactgg ttgccatcgt ggttcatacc caggttatga cccagttcgt gtgccatggt 420
cagagcaacc agcagggttaa tagcggagtg gtcctggata acaccagtag aatgtttcag 480
ttgacacatg ccaccaacgt aagccagacc aacagtatca ccgtcgaagt cgatagcggg 540
cagcagttga gcgttatcat gacgttggcg acgcagcagg tcggtttcac gccagttacc 600
gaaggatgcc agagtgtcgt gggatacaga agtaacgggt atcaaattctt ggttggacca 660
gatttccaaa ccaaccaaag tgaattggat gttcagtggt ctgtagattt cgtaaagggt 720
gttgacgatt tgggtgcaccc attgacggat tttgtcagag tcaccgttgt atttagtgtt 780
catacgggtg tcagcaacga taaccagctg tacgtatctt tgtgggaatc tttgttgtct 840
cttagtcaag ttttaattgga aggccttctt gattggttca tatgattccc agttttgggt 900
aacaccacac atctttgggg cttcatcttc cttttcgacg ttttcgtact tgtagacagc 960
atgggcttca gagtgcgaca attccaatgg ttcaatcaag tacatttcac cttgcaactt 1020
gaaatgaccc ttcaaaccgt tacaagcaga gatagaagca gtggagtcag catcgtttcc 1080
gattctacca tggtagtaac agtgatcttc acccaatggg taagtagtaa tttctctacc 1140
atctggggag taatgagttt cagagtaatc ttcagagaac aaacctttgt ttttttccaa 1200
gtgcaagaca actggttcac tgtaaacctt gaattcgtat tgcattggcat cttcgtaact 1260
tggttgaaca gcacccctag gaactggagt gacctttctt ggataaacia cttcgtaact 1320
gttaacggtt ccagattcca agataataga agaagcttca gcctctcttt tctcgagaga 1380
tacccttctt tctttagcag caatgctggc aatagtagta tttataaaca ataaccggtt 1440
atgtgtgctg ttggaaaatg gcaaaacagc aacatcgaaa tccccttcta aatctgagta 1500
accgatgaca gcttcagccg gaatttgtgc cgtttcatct tctgtttagt tgttgactgg 1560
agcagctaatt gcggaggatg ctgcgaataa aacagcagta aaaattgaag gaaatctcat 1620

```

<210> 14

<211> 540

<212> PRT

<213> Agkistrodon contortrix

<220>

<223> Xaa na pozicích 465, 493, 516 a 536 značí stop kodóny.

<220>

<223> Nativní pro-fibroláza z Agkistrodon contortrix

<400> 14

```

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 1              5              10              15

```

```

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
      20              25              30

```

```

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
 35              40              45

```

```

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
 50              55              60

```

```

Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
 65              70              75              80

```

```

Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Ser Ser Ile Ile Leu Glu Ser
      85              90              95

```

Gly Asn Val Asn Asp Tyr Glu Val Val Tyr Pro Arg Lys Val Thr Pro
 100 105 110
 Val Pro Arg Gly Ala Val Gln Pro Lys Tyr Glu Asp Ala Met Gln Tyr
 115 120 125
 Glu Phe Lys Val Asn Ser Glu Pro Val Val Leu His Leu Glu Lys Asn
 130 135 140
 Lys Gly Leu Phe Ser Glu Asp Tyr Ser Glu Thr His Tyr Ser Pro Asp
 145 150 155 160
 Gly Arg Glu Ile Thr Thr Tyr Pro Leu Gly Glu Asp His Cys Tyr Tyr
 165 170 175
 His Gly Arg Ile Glu Asn Asp Ala Asp Ser Thr Ala Ser Ile Ser Ala
 180 185 190
 Cys Asn Gly Leu Lys Gly His Phe Lys Leu Gln Gly Glu Met Tyr Leu
 195 200 205
 Ile Glu Pro Leu Glu Leu Ser Asp Ser Glu Ala His Ala Val Tyr Lys
 210 215 220
 Tyr Glu Asn Val Glu Lys Glu Asp Glu Ala Pro Lys Met Cys Gly Val
 225 230 235 240
 Thr Gln Asn Trp Glu Ser Tyr Glu Pro Ile Lys Lys Ala Phe Gln Leu
 245 250 255
 Asn Leu Thr Lys Arg Gln Gln Arg Phe Pro Gln Arg Tyr Val Gln Leu
 260 265 270
 Val Ile Val Ala Asp His Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asn Gly Asp Ser
 275 280 285
 Asp Lys Ile Arg Gln Trp Val His Gln Ile Val Asn Thr Ile Asn Glu
 290 295 300
 Ile Tyr Arg Pro Leu Asn Ile Gln Phe Thr Leu Val Gly Leu Glu Ile
 305 310 315 320
 Trp Ser Asn Gln Asp Leu Ile Thr Val Thr Ser Val Ser His Asp Thr
 325 330 335
 Leu Ala Ser Phe Gly Asn Trp Arg Glu Thr Asp Leu Leu Arg Arg Gln
 340 345 350
 Arg His Asp Asn Ala Gln Leu Leu Thr Ala Ile Asp Phe Asp Gly Asp
 355 360 365
 Thr Val Gly Leu Ala Tyr Val Gly Gly Met Cys Gln Leu Lys His Ser
 370 375 380

Thr Gly Val Ile Gln Asp His Ser Ala Ile Asn Leu Leu Val Ala Leu
385 390 395 400

Thr Met Ala His Glu Leu Gly His Asn Leu Gly Met Asn His Asp Gly
405 410 415

Asn Gln Cys His Cys Gly Ala Asn Ser Cys Val Met Ala Ala Met Leu
420 425 430

Ser Asp Gln Pro Ser Lys Leu Phe Ser Asp Cys Ser Lys Lys Asp Tyr
435 440 445

Gln Thr Phe Leu Thr Val Asn Asn Pro Gln Cys Ile Leu Asn Lys Pro
450 455 460

Xaa Ala Ala Ala Ser Phe Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp
465 470 475 480

Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His Xaa Val Cys Ser
485 490 495

Leu Arg His Asp Cys Ser Ser Val Gln Val Gly His Leu Arg Glu Asp
500 505 510

Arg Ser Cys Xaa Ile Leu Ile Lys Arg Met Ser Glu Cys His Leu Pro
515 520 525

Glu Arg Cys Arg Leu His Phe Xaa Tyr Phe Phe Ile
530 535 540

<210> 15

<211> 203

<212> PRT

<213> Agkistrodon contortrix

<220>

<223> Nativní fibroláza z Agkistrodon contortrix

<220>

<223> Xaa na pozici 1 zastupuje chemickou sloučeninu
-kyselinu pyroglutamovou. Tato chemická sloučenina
je označovaná v seznamu písmenem "E".

<400> 15

Xaa Gln Arg Phe Pro Gln Arg Tyr Val Gln Leu Val Ile Val Ala Asp
1 5 10 15

His Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asn Gly Asp Ser Asp Lys Ile Arg Gln
20 25 30

Trp Val His Gln Ile Val Asn Thr Ile Asn Glu Ile Tyr Arg Pro Leu
35 40 45

Asn Ile Gln Phe Thr Leu Val Gly Leu Glu Ile Trp Ser Asn Gln Asp
 50 55 60
 Leu Ile Thr Val Thr Ser Val Ser His Asp Thr Leu Ala Ser Phe Gly
 65 70 75 80
 Asn Trp Arg Glu Thr Asp Leu Leu Arg Arg Gln Arg His Asp Asn Ala
 85 90 95
 Gln Leu Leu Thr Ala Ile Asp Phe Asp Gly Asp Thr Val Gly Leu Ala
 100 105 110
 Tyr Val Gly Gly Met Cys Gln Leu Lys His Ser Thr Gly Val Ile Gln
 115 120 125
 Asp His Ser Ala Ile Asn Leu Leu Val Ala Leu Thr Met Ala His Glu
 130 135 140
 Leu Gly His Asn Leu Gly Met Asn His Asp Gly Asn Gln Cys His Cys
 145 150 155 160
 Gly Ala Asn Ser Cys Val Met Ala Ala Met Leu Ser Asp Gln Pro Ser
 165 170 175
 Lys Leu Phe Ser Asp Cys Ser Lys Lys Asp Tyr Gln Thr Phe Leu Thr
 180 185 190
 Val Asn Asn Pro Gln Cys Ile Leu Asn Lys Pro
 195 200

<210> 16
 <211> 202
 <212> PRT
 <213> Agkistrodon contortrix

<220>
 <223> Nativní fibroláza z Agkistrodon contortrix

<220>
 <223> Xaa na pozici 1 zastupuje chemickou sloučeninu
 -kyselinu pyroglutamovou. Tato chemická sloučenina
 je označovaná v seznamu písmenem "E".

<400> 16
 Xaa Arg Phe Pro Gln Arg Tyr Val Gln Leu Val Ile Val Ala Asp His
 1 5 10 15
 Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asn Gly Asp Ser Asp Lys Ile Arg Gln Trp
 20 25 30
 Val His Gln Ile Val Asn Thr Ile Asn Glu Ile Tyr Arg Pro Leu Asn
 35 40 45

Ile Gln Phe Thr Leu Val Gly Leu Glu Ile Trp Ser Asn Gln Asp Leu
50 55 60

Ile Thr Val Thr Ser Val Ser His Asp Thr Leu Ala Ser Phe Gly Asn
65 70 75 80

Trp Arg Glu Thr Asp Leu Leu Arg Arg Gln Arg His Asp Asn Ala Gln
85 90 95

Leu Leu Thr Ala Ile Asp Phe Asp Gly Asp Thr Val Gly Leu Ala Tyr
100 105 110

Val Gly Gly Met Cys Gln Leu Lys His Ser Thr Gly Val Ile Gln Asp
115 120 125

His Ser Ala Ile Asn Leu Leu Val Ala Leu Thr Met Ala His Glu Leu
130 135 140

Gly His Asn Leu Gly Met Asn His Asp Gly Asn Gln Cys His Cys Gly
145 150 155 160

Ala Asn Ser Cys Val Met Ala Ala Met Leu Ser Asp Gln Pro Ser Lys
165 170 175

Leu Phe Ser Asp Cys Ser Lys Lys Asp Tyr Gln Thr Phe Leu Thr Val
180 185 190

Asn Asn Pro Gln Cys Ile Leu Asn Lys Pro
195 200

<210> 17

<211> 538

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: analog nativní pro-fibrolázy
z Agkistrodon contortrix

<400> 17

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
20 25 30

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35 40 45

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
50 55 60

Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
65 70 75 80

03.04.03

Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Ser Ser Ile Ile Leu Glu Ser
 85 90 95
 Gly Asn Val Asn Asp Tyr Glu Val Val Tyr Pro Arg Lys Val Thr Pro
 100 105 110
 Val Pro Arg Gly Ala Val Gln Pro Lys Tyr Glu Asp Ala Met Gln Tyr
 115 120 125
 Glu Phe Lys Val Asn Ser Glu Pro Val Val Leu His Leu Glu Lys Asn
 130 135 140
 Lys Gly Leu Phe Ser Glu Asp Tyr Ser Glu Thr His Tyr Ser Pro Asp
 145 150 155 160
 Gly Arg Glu Ile Thr Thr Tyr Pro Leu Gly Glu Asp His Cys Tyr Tyr
 165 170 175
 His Gly Arg Ile Glu Asn Asp Ala Asp Ser Thr Ala Ser Ile Ser Ala
 180 185 190
 Cys Asn Gly Leu Lys Gly His Phe Lys Leu Gln Gly Glu Met Tyr Leu
 195 200 205
 Ile Glu Pro Leu Glu Leu Ser Asp Ser Glu Ala His Ala Val Tyr Lys
 210 215 220
 Tyr Glu Asn Val Glu Lys Glu Asp Glu Ala Pro Lys Met Cys Gly Val
 225 230 235 240
 Thr Gln Asn Trp Glu Ser Tyr Glu Pro Ile Lys Lys Ala Phe Gln Leu
 245 250 255
 Asn Leu Thr Lys Arg Ser Phe Pro Gln Arg Tyr Val Gln Leu Val Ile
 260 265 270
 Val Ala Asp His Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asn Gly Asp Ser Asp Lys
 275 280 285
 Ile Arg Gln Trp Val His Gln Ile Val Asn Thr Ile Asn Glu Ile Tyr
 290 295 300
 Arg Pro Leu Asn Ile Gln Phe Thr Leu Val Gly Leu Glu Ile Trp Ser
 305 310 315 320
 Asn Gln Asp Leu Ile Thr Val Thr Ser Val Ser His Asp Thr Leu Ala
 325 330 335
 Ser Phe Gly Asn Trp Arg Glu Thr Asp Leu Leu Arg Arg Gln Arg His
 340 345 350
 Asp Asn Ala Gln Leu Leu Thr Ala Ile Asp Phe Asp Gly Asp Thr Val
 355 360 365
 Gly Leu Ala Tyr Val Gly Gly Met Cys Gln Leu Lys His Ser Thr Gly
 370 375 380

Val Ile Gln Asp His Ser Ala Ile Asn Leu Leu Val Ala Leu Thr Met
 385 390 395 400

Ala His Glu Leu Gly His Asn Leu Gly Met Asn His Asp Gly Asn Gln
 405 410 415

Cys His Cys Gly Ala Asn Ser Cys Val Met Ala Ala Met Leu Ser Asp
 420 425 430

Gln Pro Ser Lys Leu Phe Ser Asp Cys Ser Lys Lys Asp Tyr Gln Thr
 435 440 445

Phe Leu Thr Val Asn Asn Pro Gln Cys Ile Leu Asn Lys Pro Xaa Ala
 450 455 460

Ala Ala Ser Phe Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
 465 470 475 480

Ser Ala Val Asp His His His His His His Xaa Val Cys Ser Leu Arg
 485 490 495

His Asp Cys Ser Ser Val Gln Val Gly His Leu Arg Glu Asp Arg Ser
 500 505 510

Cys Xaa Ile Leu Ile Lys Arg Met Ser Glu Cys His Leu Pro Glu Arg
 515 520 525

Cys Arg Leu His Phe Xaa Tyr Phe Phe Ile
 530 535

<210> 18
 <211> 602
 <212> DNA
 <213> Agkistrodon contortrix

<220>
 <223> Fragment fibrolázy z Agkistrodon contortrix

<400> 18
 tactattgcc agcattgctg ctaaagaaga aggggtatct ctcgagaaaa gagaggctga 60
 agcttcttct attatcttgg aatctggtaa cgtaacgat tacgaagttg tttatccaag 120
 aaaggctact ccagttccta ggggtgctgt tcaaccaaag tacgaagatg ccatgcaata 180
 cgaattcaag gttaacagtg aaccagttgt cttgcacttg gaaaaaaca aagggtttgtt 240
 ctctgaagat tactctgaaa ctcttactc cccagatggt agagaaatta ctacttacc 300
 attgggtgaa gatcactgtt actaccatgg tagaatcgaa aacgatgctg actccactgc 360
 ttctatctct gcttgtaacg gtttgaaggg tcatttcaag ttgcaagggtg aaatgtactt 420
 gattgaacca ttggaattgt ccgactctga agcccatgct gtctacaagt acgaaaacgt 480
 cgaaaaggaa gatgaagccc caaagatgtg tgggtgttacc caaaactggg aatcatatga 540
 accaatcaag aaggccttcc aattaaactt gactaagaga tctttccac aaagatacgt 600
 ac 602

<210> 19
 <211> 816

<212> DNA

<213> Agkistrodon contortrix

<220>

<223> Fragment fibrolázy z Agkistrodon contortrix

<400> 19

```
tccaattaaa cttgactaag agatctttcc cacaaagata cgtacagctg gttatcgttg 60
ctgaccaccg tatgaacact aaatacaacg gtgactctga caaaatccgt caatgggtgc 120
accaaatacgt caacaccatt aacgaaatct acagaccact gaacatccaa ttcacttttg 180
ttgggtttgga aatctgggtcc aaccaagatt tgatcacctg tacttctgta tcccacgaca 240
ctctggcatc cttcggtaac tggcgtgaaa ccgacctgct gcgtcgccaa cgtcatgata 300
acgctcaact gctgaccgct atcgacttcg acggtgatac tgttgggtctg gcttacgttg 360
gtggcatgtg tcaactgaaa cattctactg gtgttatcca ggaccactcc gctattaacc 420
tgctgggtgc tctgaccatg gcacacgaac tgggtcataa cctgggtatg aaccacgatg 480
gcaaccagtg tcaactgagg gcaaaactcc gtgttatggc tgctatgctg tccgatcaac 540
catccaaact gttctccgac tgctctaaga aagactacca gaccttctgt accgttaaca 600
acccgcagtg tatcttgaac aaaccgtaag cggccgccag ctttctagaa caaaaactca 660
tctcagaaga ggatctgaat agcgcgctcg accatcatca tcatcatcat tgagtttgta 720
gccttagaca tgactgttcc tcagttcaag ttgggcactt acgagaagac cggctcttgc 780
agatttcta atcaagaggatg tcagaatgcc atttgc 816
```

<210> 20

<211> 1373

<212> DNA

<213> Agkistrodon contortrix

<220>

<223> Fragment fibrolázy z Agkistrodon contortrix

<400> 20

```
tactattgcc agcattgctg ctaaagaaga aggggtatct ctcgagaaaa gagaggctga 60
agctttctct attatcttgg aatctggtaa cgttaacgat tacgaagttg tttatccaag 120
aaaggttcaact ccagttccta ggggtgctgt tcaaccaaag tacgaagatg ccatgcaata 180
cgaattcaag gttaacagtg aaccagttgt cttgcacttg gaaaaaaca aaggtttgtt 240
ctctgaagat tactctgaaa ctctattctc cccagatggg agagaaatta ctacttacc 300
attgggtgaa gatcactgtt actaccatgg tagaatcgaa aacgatgctg actccactgc 360
ttctatctct gcttgtaacg gtttgaaggg tcatttcaag ttgcaagggtg aaatgtactt 420
gattgaacca ttggaattgt ccgactctga agcccatgct gtctacaagt acgaaaacgt 480
cgaaaaggaa gatgaagccc caaagatgtg tgggtgttacc caaaactggg aatcatatga 540
accaatcaag aaggccttcc aattaaactt gactaagaga tctttcccac aaagatacgt 600
acagctgggt atcgttgctg accaccgtat gaacactaaa tacaacggtg actctgacaa 660
aatccgtcaa tgggtgcacc aaatcgtcaa caccattaac gaaatctaca gaccactgaa 720
catccaattc actttgggtg gtttggaaat ctggtccaac caagatttga tcaccgttac 780
ttctgtatcc caccgactc tggcatcctt cggttaactg cgtgaaaccg acctgctgcg 840
tcgccaacgt catgataacg ctcaactgct gaccgctatc gacttcgacg gtgatactgt 900
tgggtctggct tacgttgggt gcattgtgtc actgaaacat tctactgggtg ttatccagga 960
ccactccgct attaacctgc tgggtgtctt gaccatggca caggaactgg gtcataacct 1020
gggtatgaac cagatgggca accagtgtca ctgctgtgca aactcctgtg ttatggctgc 1080
tatgtgttcc gatcaaccat ccaaactgtt ctccgactgc tctaagaaag actaccagac 1140
cttcttgacc gtttaacaacc cgcagtgtat cctgaacaaa ccgtaagcgt ccgccagctt 1200
tctagaacaa aaactcatct cagaagagga tctgaatagc gccgtcgacc atcatcatca 1260
tcatcattga gtttgtagcc ttagacatga ctgttcttca gttcaagttg ggcacttacg 1320
agaagaccgg tcttgctaga ttctaataca gaggatgtca gaatgccatt tgc 1373
```

03.04.03

PV 2002-1034

~~24328~~

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Fibrinolyticky aktivní polypeptid má aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1.
2. Polypeptid z nároku 1, který byl vyroben rekombinantní expresí v kvasinkách.
3. Molekula nukleové kyseliny kóduje polypeptid o sekvenci SEQ ID NO:1.
4. Molekula nukleové kyseliny z nároku 3 která má sekvenci SEQ ID NO :4.
5. Expresní vektor obsahuje expresní regulační prvky, které jsou účinně připojeny k molekule nukleové kyseliny podle nároku 3.
6. Expresní vektor podle nároku 5 ve kterém je molekula nukleové kyseliny má nukleotidovou sekvenci SEQ ID NO:4.
7. Hostitelská buňka transformovaná nebo transfekovaná molekulou nukleové kyseliny podle nároku 3.
8. Transformovaná nebo transfekovaná hostitelská buňka podle nároku 7, která je prokaryotická nebo eukaryotická.
9. Transformovaná nebo transfekovaná prokaryotická buňka podle nároku 8, která je kvasinková buňka.
10. Transformovaná nebo transfekovaná kvasinková buňka podle nároku 9, která je *Pichia pastoris*.
11. Metoda produkce NATu, zahrnující kultivaci hostitelských buněk obsahujících DNA molekulu kódující uvedenou metaloproteinázu ,

účinně připojenou k regulačním prvkům které stimulují expresi za podmínek, že je DNA molekula exprimována a izolace exprimované metaloproteinázy z kultury hostitelských buněk.

12. Metoda z nároku 11, kde DNA molekula je SEQ ID NO:4.

13. Metoda z nároku 11, ve které jsou hostitelské buňky kvasinky.

14. Metoda z nároku 13, ve kterém jsou kvasinkové buňky *Pichia pastoris*.

15. Metoda produkce metaloproteinázy-fybrinolytického agens vybraného ze skupiny sestávající se z fibrolázy NATu, obsahující kultivaci *Pichia* hostitelských buněk, které obsahují DNA molekulu kódující zmíněnou metaloproteinázu, účinně připojenou k regulačním prvkům pro stimulaci exprese za podmínek kdy je DNA molekula exprimována a izolace exprimované metaloproteinázy z kultury hostitelských buněk.

16. Metoda z nároku 15, kde *Pichia* hostitelská buňka je *Pichia pastoris*.

17. Metoda léčby trombózy u savců zahrnující podávání trombolyticky efektivního množství NATu savcům.

18. Protilátku proti polypeptidu z nároku 1.

19. Protilátka z nároku 17 která je monoklonální protilátka.