(19) Országkód

HU

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG

MAGYAR SZABADALMI HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

221 118 B1

(21) A bejelentés ügyszáma: P 96 03477
(22) A bejelentés napja: 1995. 06. 16.
(30) Elsőbbségi adatok:
0705/94 1994. 06. 16. DK
08/282,852 1994. 07. 29. US
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/DK 95/00249
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 95/34666

(51) Int. Cl.[7]

C 12 N 15/81
C 12 N 15/79
C 12 N 15/17

(40) A közzététel napja: 1997. 08. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi Közlönyben: 2002. 08. 28.

(72) Feltalálók:
Kjeldsen, Thomas Borglum, Virum (DK)
Vad, Knud, Frederiksberg (DK)

(73) Szabadalmas:
NOVO NORDISK A/S, Bagsvaerd (DK)

(74) Képviselő:
ifj. Szentpéteri Ádám, S. B. G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi Iroda, Budapest

(54) **Szintetikus vezérpeptid-szekvenciák**

KIVONAT

A jelen találmány tárgya egy új típusú vezérpeptid, amely lehetővé teszi, hogy egy heterológ polipeptid nagy mennyiségben szekretálódjon élesztőben. A találmány tárgya továbbá eljárás egy polipeptid előállítására élesztőben, amely eljárás abban áll, hogy egy olyan élesztősejtet, amely képes egy polipeptid expresszálására, és amelyet egy, a találmány szerinti élesztő-expressziósvektorral transzformáltak, amely vektor tartalmaz egy, a találmány szerinti vezérpeptid-szekvenciát, megfelelő táptalajban tenyésztik, a polipeptid expressziójának és szekréciójának elérése céljából, majd a polipeptidet kinyerik a táptalajból.

HU 221 118 B1

A leírás terjedelme 44 oldal (ezen belül 13 lap ábra)

A találmány tárgyát fehérjék élesztőben való szekretálására alkalmas szintetikus vezérszekvenciák képezik.

Az élesztők számos olyan fehérjét expresszálnak, amelyek intracellulárisan szintetizálódnak, de funkciójuk a sejten kívül van. Az ilyen extracelluláris fehérjéket hívják szekretált fehérjéknek. Ezek a szekretált fehérjék a sejtben először prekurzor vagy prefehérje formájában szintetizálódnak, tartalmaznak egy olyan preszekvenciát, amely biztosítja az expresszált termék hatékony átirányítását az endoplazmatikus retikulum (ER) membránján keresztül. A preszekvencia, amit általában szignálszekvenciának is neveznek, a transzlokáció során általában lehasad a kívánt termékről. Ha egyszer belépett a szekréciós bioszintézisútba, akkor a fehérje a Golgi-készülékbe transzportálódik. A Golgi-készülékből a fehérje különböző útvonalakat követhet, amelyek vezethetnek a sejt különböző kompartmentjeibe, azaz például a sejtvakuólumba vagy a sejtmembránhoz, de a sejten kívülre is irányíthatók, hogy a sejtet körülvevő közegbe szekretálódjanak [Pfeffer, S. R. és Rothman, J. E.: Annu. Rev. Biochem. *65,* 829–852 (1987)].

Számos megközelítést javasoltak az élesztő számára heterológ fehérjék expresszálására és szekretálására. A No. 88632 számú publikált európai szabadalmi bejelentésben leírnak egy eljárást, amelynek segítségével az élesztő számára heterológ fehérjék expresszálódnak, processzálódnak és szekretálódnak, oly módon, hogy az élesztősejtet egy olyan expressziós hordozóval transzformálják, amely a kívánt fehérjét és egy szignálpeptidet kódoló DNS-t hordoz, a transzformált sejtből tenyészetet készítenek, szaporítják a tenyészetet és kinyerik a fehérjét a tenyészközegből. A szignálpeptid lehet magának a kívánt fehérjének a szignálpeptidje, lehet egy heterológ szignálpeptid, vagy a természetes és a heterológ szignálpeptid hibridje.

Az élesztő számára idegen szignálpeptidek alkalmazása olyan problémákat eredményezhet, hogy a heterológ szignálpeptid nem biztosítja a hatékony transzlokációt és/vagy a szignálpeptid lehasítását.

A *Saccharomyces cerevisiae* MFα1 (α-faktor) 165 aminosavból álló pre-pro formában szintetizálódik, amely tartalmaz egy 19 aminosavból álló szignál- vagy prepeptidet, ezt követi egy 64 aminosavból álló „vezér" vagy propeptid, amely közrefog három N-kapcsolt glikozilezési helyet, amit követ a (LysArg-((Asp/Glu)Ala)$_{2-3}$α-faktor)$_4$ szekvencia [Kurjan, J. és Herskovitz, I.: Cell *30,* 933–943 (1982)]. A pre-pro-MFα1 szignálpeptid részét széles körben alkalmazzák a *Saccharomyces cerevisiae*-ben heterológ fehérjék szintézisére és szekretálására.

Az élesztőben homológ szignál/vezér peptidek használatát több publikációban is leírták: 4,546,082 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés, a 116 201, 123 294, 123 544, 163 529 és 123 289 számú európai szabadalmi bejelentés, valamint a 3614/83 számú DK bejelentés.

Az EP 123 289 számú bejelentésben a *Saccharomyces cerevisiae* α-faktor prekurzor alkalmazását írják le, míg a WO 84/01153 számú bejelentésben a *Saccharomyces cerevisiae* invertáz szignálpeptid alkalmazását írják le, a DK 3614/83 számú bejelentésben pedig a *Saccharomyces cerevisiae* PHO5 szignálpeptid alkalmazását írják le idegen fehérjék szekretálására.

A 4,546,082 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés, az EP 16 201, 123 294, 123 544 és 163 529 számú bejelentés olyan eljárásokat ismertet, amelyekkel a *Saccharomyces cerevisiae* α-faktor szignál/vezér szekvenciát (MFα1 vagy MFα2) alkalmazzák az expresszált heterológ fehérjék szekréciós folyamataiban élesztőben. A *Saccharomyces cerevisiae* MFα1 szignál/vezér szekvenciát kódoló DNS-szekvenciát fuzionáltatva a kívánt fehérjét kódoló gén 5' végéhez, a kívánt fehérje szekréciója és processzálása volt kimutatható.

Az EP 206 783 számú szabadalmi bejelentésben leírnak egy rendszert *Saccharomyces cerevisiae*-ből való szekrécióra, egy α-faktorszekvenciát alkalmazva, amit megcsonkítottak, hogy eliminálják a természetes vezérszekvencián levő négy α-faktoregységet, és ezáltal csak a vezérszekvenciát fuzionáltatják egy heterológ polipeptidhez a LysArgGluAlaGluAla α-faktor processzálási helyén keresztül. Erről a konstrukcióról leírják, hogy kisebb (50 aminosavnál kevesebbet tartalmazó) fehérjék hatékony processzálását eredményezi. A nagyobb polipeptidek szekretálásához és processzálásához a természetes α-faktor-vezérszekvenciát megcsonkították, hogy csak egy vagy két α-faktoregység maradjon a vezérpeptid és a polipeptid között.

Számos szekretált fehérje olyan úton halad, hogy érintkezésbe kerüljön a proteolitikus processzálási rendszerrel, amely képes lehasítani a peptidkötést két egymást követő bázikus aminosav C-terminálisán. Ezt az enzimaktivitást a *Saccharomyces cerevisiae*-ben a KEX 2 gén kódolja [Julius, D. A. és munkatársai: Cell *37,* 1075 (1984b)]. A KEX 2 proteáz termékének a processzálására van szükség az aktív *Saccharomyces cerevisiae* mating faktor α1 (MFα1 vagy α-faktor) szekretálásához, míg a KEX 2 nem játszik szerepet az aktív *Saccharomyces cerevisiae* mating faktor a szekretálásában.

Egy szekretálásra szánt polipeptid szekrécióját és helyes processzálását néhány esetben akkor érjük el, ha egy élesztősejtet tenyésztünk, amelyet egy olyan vektorral transzformáltunk, amelyet az előzőekben ismertetett referenciák alapján állítottunk elő. Számos esetben azonban a szekréció szintje nagyon alacsony, vagy egyáltalán nincs szekréció, vagy pedig a proteolitikus processzálás nem helyes vagy nem teljes. Ennélfogva a jelen találmány tárgyát olyan vezérpeptidek képezik, amelyek a polipeptidek hatékony expresszióját és/vagy processzálását biztosítják.

A feltalálóknak meglepő módon sikerült olyan új típusú vezérpeptidet találniuk, amely lehetővé teszi egy polipeptid magas hozammal való szekrécióját élesztőben.

A jelen találmány tárgya tehát az alábbi szekvenciát tartalmazó DNS-expressziós kazetta:

5'–P–SP–LS–PS–*gén*–(T)$_i$–3'

amelyben

P jelentése promoterszekvencia,

SP jelentése egy szignálpeptidet kódoló DNS-szekvencia,

LS jelentése egy (I) általános képletű vezérpeptidet kódoló DNS-szekvencia:

GlnProIle(Asp)/Glu)(Asp/Glu)X^1(Glu)/Asp)X^2Asn Z(Thr/Ser)X^3, (I)

amelyben

X^1 jelentése peptidkötés vagy kódolható aminosav;

X^2 jelentése peptidkötés, egy kódolható aminosav vagy egy maximum 4 kódolható aminosavat tartalmazó szekvencia, amely aminosavak lehetnek azonosak vagy eltérőek;

Z jelentése egy kódolható aminosav, Pro kivételével; és

X^3 jelentése egy 4–30 kódolható aminosavat tartalmazó szekvencia, amely aminosavak lehetnek azonosak vagy eltérőek;

PS jelentése egy processzálási helyet kódoló DNS-szekvencia;

gén jelentése egy polipeptidet kódoló DNS-szekvencia;

T jelentése terminátorszekvencia; és

i értéke 0 vagy 1.

Az előző szövegösszefüggésben a „vezérpeptid" szakkifejezés egy olyan peptidet jelent, amelynek az a funkciója, hogy lehetővé tegye, hogy az expresszált polipeptid az endoplazmatikus retikulumból a Golgi-készülékbe irányuljon, majd ezután egy szekréciós vezikulumba, a táptalajba való szekréció céljából (azaz az expresszált polipeptidnek a sejtfalon át való expressziója, vagy legalább a sejtmembránon át való expressziója a sejt periplazmatikus terébe). A „szintetikus" szakkifejezés a vezérpeptiddel kapcsolatban használva azt jelenti, hogy a vezérpeptid nem található meg a természetben.

A „szignálpeptid" szakkifejezés jelentése egy olyan preszekvencia, amely főleg hidrofób tulajdonságú, és egy élesztőbe expresszálódó extracelluláris fehérje prekurzor formájának N-terminális szekvenciája formájában van jelen. A szignálpeptid funkciója az, hogy lehetővé teszi az expresszált fehérje szekrécióját, és az endoplazmatikus retikulumba való belépését. A szignálpeptid általában lehasad az eljárás során. A szignálpeptid lehet heterológ vagy homológ a fehérjét termelő élesztősejt szempontjából.

A „polipeptid" szakkifejezés jelentése vagy egy heterológ polipeptid, azaz egy olyan polipeptid, amely természetes körülmények között nem termelődik az élesztősejtben, vagy egy homológ polipeptid, azaz egy olyan polipeptid, amely természetes körülmények között is termelődik az élesztőben, vagy ennek bármely pre formája. Egy előnyös megvalósítási mód szerint a jelen találmány szerinti expressziós kazetta egy heterológ polipeptidet kódol.

A „kódolható aminosav" szakkifejezés jelentése egy olyan aminosav, amit egy nukleotidtriplett („kodon") kódolhat.

Ha a jelen leírásban az aminosavszekvenciákban két aminosav hárombetűs kódját egy perjel választja el és zárójelbe vannak téve [azaz például (Asp/Glu)], akkor ez azt jelenti, hogy a szekvenciában az adott pozícióban vagy az egyik, vagy a másik aminosav található meg.

A jelen találmány tárgya továbbá eljárás egy polipeptid előállítására élesztőben, amely eljárás abban áll, hogy egy olyan élesztősejtet, amely képes egy polipeptid expresszálására, és amelyet egy, az előzőekben ismertetett élesztő-expressziósvektorral transzformáltunk, amely vektor tartalmaz egy, a találmány szerinti vezérpeptid-szekvenciát, megfelelő táptalajban tenyésztünk, a polipeptid expressziójának és szekréciójának elérése céljából, majd a polipeptidet kinyerjük a táptalajból.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a mellékelt ábrákat.

Az 1. ábrán a pAK492 plazmid sematikus ábrázolása látható.

A 2. ábrán a szignálpeptid/vezér/MI3 inzulin prekurzort kódoló DNS-szekvencia egy része látható.

A 3. ábrán a pAK456 plazmid készítése látható.

A 4. ábrán a 4. számú szekvenciával leírható vezérszekvencia aminosavszekvenciája, valamint az azt kódoló DNS-szekvencia látható.

Az 5. ábrán a pAK456 *Saccharomyces cerevisiae* expressziós vektor DNS-szekvenciája látható, amely a YAP3 szignálpeptidet, a 4. számú szekvenciával leírható vezérszekvenciát, valamint az MI3 inzulin prekurzort kódolja, valamint látható az aminosavszekvencia is.

A 6. ábrán a 6. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvencia aminosavszekvenciája, valamint az azt kódoló DNS-szekvencia látható.

A 7. ábrán a 8. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvencia aminosavszekvenciája, valamint az azt kódoló DNS-szekvencia látható.

A 8. ábrán a 17. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvencia aminosavszekvenciája, valamint az azt kódoló DNS-szekvencia látható.

A 9. ábrán a 16. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvencia aminosavszekvenciája, valamint az azt kódoló DNS-szekvencia látható.

A 10. ábrán a 19. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvencia aminosavszekvenciája, valamint az azt kódoló DNS-szekvencia látható.

A 11. ábrán a 20. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvencia aminosavszekvenciája, valamint az azt kódoló DNS-szekvencia látható.

A 12. ábrán a 21. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvencia aminosavszekvenciája, valamint az azt kódoló DNS-szekvencia látható.

A 13. ábrán a pAK527 DNS-fragmens látható, amelyet a 4. és 6. számú szekvenciának megfelelő szekvenciák készítésénél használunk.

A 14. ábrán a pAK531 DNS-fragmens látható, amelyet a 8. számú szekvenciának megfelelő szekvencia készítésénél használunk.

A 15. ábrán a pAK555 DNS-fragmens látható, amelyet a 16. és 17. számú szekvenciáknak megfelelő szekvenciák készítésénél használunk.

A 16. ábrán a pAK559 DNS-fragmens látható, amelyet a 19. és 20. számú szekvenciáknak megfelelő szekvenciák készítésénél használunk.

A 17. ábrán a pAK562 DNS-fragmens látható, amelyet a 21. számú szekvenciának megfelelő szekvencia készítésénél használunk.

A 18. ábrán a 27. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvencia, valamint az azt kódoló 66. számú DNS-szekvencia látható.

A 19. ábrán egy N-terminálisán meghosszabbított MI3 inzulin prekurzor 70. számú szekvenciának megfelelő szekvenciája látható, valamint az azt kódoló 71. számú DNS-szekvencia.

A 20. ábrán a 67. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvencia aminosavszekvenciája, valamint az azt kódoló 69. számú DNS-szekvencia látható.

A 21. ábrán a pAK614 72. számú DNS-szekvenciának megfelelő DNS-fragmense látható, amit a 27. számú szekvencia készítésénél használunk közvetlen templátként.

A 22. ábrán a pAK625 73. számú szekvenciának megfelelő DNS-fragmense látható, amit a 67. számú szekvencia készítésénél közvetlen templátként használunk.

Ha az (I) általános képletben az X^1 jelentése aminosav, akkor az az aminosav előnyösen Ser, Thr vagy Ala. Ha az (I) általános képletben X^2 jelentése egy aminosav, akkor az előnyösen Ser, Thr vagy Ala. Ha az (I) általános képletben X^2 jelentése két aminosavból álló szekvencia, akkor az előnyösen SerIle. Ha az (I) általános képletben X^2 jelentése három aminosavból álló szekvencia, akkor ez előnyösen SerAlaIle. Ha az (I) általános képletben X^2 jelentése négy aminosavból álló szekvencia, akkor ez előnyösen SerPheAlaThr. Egy előnyös megvalósítási mód szerint X^3 jelentése a (II) általános képletű aminosavszekvencia:

$$X^4-X^5-X^6 \quad \text{(II)},$$

ahol X^4 jelentése 1–21 kódolható aminosavból álló szekvencia, amelyben az aminosavak lehetnek azonosak vagy eltérőek, X^5 jelentése a Pro, ValAsnLeu vagy a LeuAlaAsnValAlaMetAla szekvenciák közül az egyik, és X^6 jelentése 1–8 kódolható aminosavból álló szekvencia, amelyben az aminosavak lehetnek azonosak vagy eltérőek.

A (II) általános képletben X^4 jelentése egy olyan aminosavszekvencia, amely egyet tartalmaz az alábbi motívumok közül: LeuValAsnLeu, SerValAsnLeu, MetAlaAsp, ThrGluSer, ArgPheAlaThr vagy ValAlaMetAla; vagy X^4 jelentése egy aminosavszekvencia, amelynek összetétele: AsnSerThr vagy AsnThrThr; vagy X^4 jelentése aminosavszekvencia, amely az alábbi összetételű lehet:
(Ser/Leu)ValAsnLeu,
(Ser/Leu)ValAsnLeuMetAlaAsp,
(Ser/Leu)ValAsnLeuMetAlaAspAsp,
(Ser/Leu)ValAsnLeuMetAlaAspAspThrGluSer,
(Ser/Leu)ValAsnLeuMetAlaAspAspThrGluSerIle vagy
(Ser/Leu)ValAsnLeuMetAlaAspAspThrGluSerArgPheAlaThr; vagy X^4 jelentése aminosavszekvencia, amely az alábbi összetételű lehet:
Asn(Thr/Ser)ThrLeu,
Asn(Thr/Ser)ThrLeuAsnLeu vagy
Asn(Thr/Ser)ThrLeuValAsnLeu; vagy ezek bármely kombinációja.

A (II) általános képletben X^5 jelentése előnyösen Pro vagy egy aminosavszekvencia, amely az alábbi összetételű lehet: ValAsnLeu, LeuAlaAsnValAlaMetAla, LeuAspValValAsnLeuProGly vagy LeuAspValVal AsnLeuIleSerMet.

Ha a (II) általános képletben X^6 jelentése egy aminosav, akkor az előnyösen Ala, Gly, Leu, Thr, Val vagy Ser. Ha a (II) általános képletben X^6 jelentése két aminosavból álló szekvencia, akkor az előnyösen GlyAla vagy SerAla. Ha a (II) általános képletben X^6 jelentése három aminosavból álló szekvencia, akkor az előnyösen AlaValAla. Ha a (II) általános képletben X^6 jelentése nyolc aminosavból álló szekvencia, akkor az előnyösen GlyAlaAspSerLysThrValGlu.

Az LS DNS-szekvencia által kódolt előnyös vezérpeptid-szekvenciákra az alábbi példákat adjuk meg:

1. számú szekvencia:
GlnProIleAspGluAspAsnAspThrSerValAsnLeuProAla;
2. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspGluAsnThrThrSerValAsnLeuProAla;
3. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuProAla;
4. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspGluAsnThrThrSerValAsnLeuProVal;
5. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluAsnThrThrSerValAsnLeuProAla;
6. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuProAla;
7. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspGluAsnThrThrSerValAsnLeuMetAla;
8. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuProGlyAla;
9. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAla;
10. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnValProThr;

11. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrLeuValAsnValProThr;
12. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuProThr;
13. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrLeuValAsnValProGlyAla;
14. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaProAlaValAla;
15. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAspLeuAlaValGly
LeuProGlyAla;
16. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaAspAspThrGlu
SerIleAsnThrThrLeuValAsnLeuProGlyAla;
17. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerIleAsnThrThrLeuValAsnLeuProGlyAla;
18. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrLeuValAsnLeuProGlyAla;
19. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaAspAspThrGlu
SerArgPheAlaThrAsnThrThrLeuValAsnLeuProLeu;
20. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaAspAspThrGlu
SerIleAsnThrThrLeuValAsnLeuAlaAsnValAlaMetAla;
21. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAlaIleAsnThrThrLeuValAsnLeuProGlyAla;
22. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerPheAlaThrAsnThrThrLeuValAsnLeuPro
GlyAla;
23. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerIleAsnThrThrLeuValAsnLeuMetAlaAspAspThr
GluSerArgPheAlaThrAsnThrThrLeuValAsnLeuPro Leu;
24. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerIleAsnThrThrLeuValAsnLeuMetAlaAspAspThr
GluSerArgPheAlaThrAsnThrThrLeuAspValValAsnLeuGlyAla;
25. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerPheAlaAlaIleAsnThrThrLeuValAsnLeuProGly
Ala;
26. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaAspAspThrGlu
SerArgPheAlaThrAsnThrThrLeuValAsnLeuAlaAsnValAlaMetAla;
27. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaAspAspThrGlu
SerArgPheAlaThrAsnThrThrLeuAspValValAsnLeuIleSerMetAla;
28. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaAsnThrThrGlu
SerArgPheAlaThrAsnThrThrLeuAspValValAsnLeuIleSerMetAla; és
29. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaAspAspThrGlu
SerArgPheAlaThrAsnThrThrLeuAlaLeuAspValValAsnLeuIleSerMetAlaLys
Arg.

Az LS DNS-szekvenciák által kódolt, különösen előnyös vezérpeptidek az alábbiak:
15. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAspLeuAlaValGly
LeuProGlyAla;
16. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaAspAspThrGlu
SerIleAsnThrThrLeuValAsnLeuProGlyAla;
17. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerIleAsnThrThrLeuValAsnLeuProGlyAla;

18. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrLeuValAsnLeuProGlyAla;
19. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaAspAspThrGlu
SerArgPheAlaThrAsnThrThrLeuValAsnLeuProLeu;
20. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaAspAspThrGlu
SerIleAsnThrThrLeuValAsnLeuAlaAsnValAlaMetAla;
21. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAlaIleAsnThrThrLeuValAsnLeuProGlyAla;
22. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerPheAlaThrAsnThrThrLeuValAsnLeuPro
GlyAla;
23. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerIleAsnThrTheLeuValAsnLeuMetAlaAspAspThr
GluSerArgPheAlaThrAsnThrThrLeuValAsnLeuProLeu;
24. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerIleAsnThrTheLeuValAsnLeuMetAlaAspAspThr
GluSerArgPheAlaThrAsnThrThrLeuAspValValAsnLeuGlyAla;
25. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerPheAlaAlaIleAsnThrThrLeuValAsnLeuProGly
Ala;
26. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaAspAspThrGlu
SerArgPheAlaThrAsnThrThrLeuValAsnLeuAlaAsnValAlaMetAla;
28. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaAsnThrThrGlu
SerArgPheAlaThrAsnThrThrLeuAspValValAsnLeuIleSerMetAla; és
67. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaAspAspThrGlu
SerArgPheAlaThrAsnThrThrLeuAlaLeuAspValValAsnLeuIleSerMetAlaLys
Arg.

A szignálszekvencia (SP) kódolhat bármilyen szignálpeptidet, amely biztosítja az expresszált polipeptid hatékony irányítását a sejt szekréciós bioszintézis útjára. A szignálpeptid lehet természetes szignálpeptid, vagy annak funkcionális része, vagy lehet szintetikus peptid. Megfelelő szignálpeptidnek találták az α-faktor szignálpeptidjét, az egérnyálmirigyek amilázát, egy módosított karboxipeptidáz szignálpeptidet, az élesztő BAR1 szignálpeptidjét, vagy a *Humicola lanuginosa* lipáz szignálpeptidjét, vagy ezek származékát. Az egérnyálmirigy amiláz szignálszekvenciáját Hagenbüchle és munkatársai írták le [Hagenbüchle, O. és munkatársai: Nature *289,* 643–646 (1981)]. A karboxipeptidáz szignálszekvenciáját Valls és munkatársai közölték [Valls, L. A. és munkatársai: Cell *48,* 887–897 (1987)]. A BAR1 szignálpeptidet a WO 87/0260 szabadalmi bejelentésben írták le. Az élesztő aszparagin proteáz 3 szignálpeptidjét a 0828/93 számú dán szabadalmi bejelentésben írták le.

A PS DNS-szekvencia által kódolt élesztő-processzálásihely lehet alkalmas módon Lys és Arg bármelyik párosított kombinációja, azaz például LysArg, ArgLys, ArgArg vagy LysLys, ami lehetővé teszi, hogy a polipeptidet a *Saccharomyces cerevisiae* KEX2 proteáza processzálja, illetve az egyéb élesztőfajokban jelen levő ekvivalens proteázok processzálják [Julius, D. A. és munkatársai: Cell *37,* 1075 (1984)]. Ha a KEX2 processzálás nem felel meg, azaz például a polipeptidtermék hasítását eredményezi például egymást követő bázikus aminosav jelenléte miatt a kívánt termék belsejében, akkor egy másik proteáznak megfelelő processzálási helyet lehet választani, ami egy olyan aminosavkombinációt tartalmaz, ami nem található meg a polipeptidtermékben, azaz például az FX_a processzálási helye, az IleGluGlyArg [Sambrook és munkatársai: Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)].

A találmány szerinti módszerrel előállított fehérje lehet bármilyen fehérje, amely előnyösen élesztőben állítható elő. Ilyen fehérjék lehetnek például heterológ fehérjék, azaz például az aprotinin, a szöveti faktor bioszintézis inhibitor, vagy egyéb proteázinhibitorok, inzulin vagy inzulinprekurzorok, humán- vagy szarvasmarha-növekedési hormon, interleukin, glukagon, GLP–1, IGF–I, IGF–II, szöveti plazminogén aktivátor, α és β transzformáló növekedési faktor, vérlemezke-eredetű növekedési faktor, enzimek vagy azok funkcionális analógjai. A jelen találmány szövegösszefüggésében a „funkcionális analóg" szakkifejezés jelentése egy olyan fehérje, amelynek hasonlóak a funkciói, mint a természetes fehérjének (ezt úgy kell érteni, hogy inkább hasonlít a természetes formához, mint a természetes fehérje biológiai aktivitási szintjéhez). A fehérje szerkezetileg lehet hasonló a természetes fehérjéhez, és a természetes fehérjéből egy

vagy több aminosavnak vagy a C-terminális vagy az N-terminális végéhez, vagy mindkettőhöz való hozzáadásából, egy vagy több aminosavnak a természetes aminosavszekvencia egy vagy több pontján való helyettesítéséből, egy vagy több aminosavnak vagy az egyik, vagy mindkét végről való deléciójából, vagy az aminosavszekvenciában egy vagy több ponton való deléciójából, vagy egy vagy több aminosavnak a természetes aminosavszekvencia egy vagy több pontjában való beszúrásából származhat. Ezek a módosítások jól ismertek számos, az előzőekben ismertetett fehérjénél. Emellett egyéb fehérjék prekurzorjait vagy intermedierjeit is elő lehet állítani a jelen találmány szerinti módszerrel. Egy ilyen prekurzor lehet például az MI3 inzulin prekurzor, amely tartalmazza a B(1–29)AlaAlaLysA(1–21) aminosavszekvenciát, amelyben A(1–21) jelentése a humáninzulin A lánca, B(1–29) jelentése a humáninzulin B lánca, amelyből hiányzik a Thr(B30).

A vektorszekvenciákat kódoló előnyös DNS-konstrukciókat a 4–12. ábrán mutatjuk be, illetve előnyösek lehetnek ezek megfelelő módosításai is. A DNS-szekvenciák megfelelő módosítása például az olyan nukleotidhelyettesítések, amelyek nem eredményezik a fehérje aminosavszekvenciájának megváltozását, de amelyek megfelelnek azon élesztősejt kodonhasznosításának, amelybe a DNS-konstrukciót bejuttatjuk, vagy az olyan nukleotidhelyettesítések, amelyek más aminosavszekvenciát eredményeznek, és ennek következtében feltehetőleg egy másik fehérjeszerkezetet eredményeznek. Egyéb lehetséges módosítás egy vagy több kodonnak a szekvencia bármelyik végéhez való hozzáadása, és egy vagy több kodonnak a lehasítása akármelyik végről, vagy kihasítása a szekvenciából.

Az 5'–P–SP–LS–PS–*gén*–$(T)_i$–3' expressziós kazettát, amelyben P, SP, LS, *gén*, T és i jelentése ugyanaz, mint amit az előzőkben meghatároztunk, hordozó rekombináns expressziós vektor lehet bármely vektor, amely képes élesztőben replikációra. A promoter lehet bármely olyan DNS-szekvencia, amely transzkripciós aktivitást mutat élesztőben, és az élesztőben homológ vagy heterológ fehérjéket kódoló génekből származhat. A promoter előnyösen egy, az élesztőben homológ fehérjéből származik. Megfelelő promoter lehet például a *Saccharomyces cerevisiae* MFα1, TPI, ADH vagy PGK promotere.

Az előzőkben ismertetett szekvenciáknak emellett előnyösen működés szempontjából egy megfelelő terminátorhoz kell kapcsolódniuk, azaz például a TPI terminátorhoz [Alber, T. és Kawasaki, G.: J. Mol. Appl. Genet. *1* 419–434 (1982)].

A jelen találmány szerinti rekombináns expressziós vektor tartalmaz egy olyan DNS-szekvenciát, amely lehetővé teszi, hogy a vektor replikálódjon élesztőben. Ilyen szekvencia lehet például az élesztő 2 μm-os plazmidjának REP 1–3 replikációs génje és replikációs origója. A vektor tartalmazhat emellett egy szelektálható markert, azaz például a *Schizoaccharomyces pombe* TPI génjét [Russell, P. R.: Gene *40,* 125–130 (1985)].

Az 5'–P–SP–LS–PS–*gén*–$(T)_i$–3' szekvencia ligálására használt módszerek, valamint olyan megfelelő élesztővektorokba való beépítése, amelyek tartalmazzák az élesztő replikációjához szükséges információt, jól ismertek a szakterületen jártas szakember számára [Sambrook és munkatársai: Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)]. Az nyilvánvaló, hogy a vektor vagy úgy állítható elő, hogy először egy olyan DNS-konstrukciót készítünk, amely a teljes 5'–P–SP–LS–PS–*gén*–$(T)_i$–3' szekvenciát tartalmazza, majd ezt a fragmenst beépítjük egy megfelelő expressziós vektorba, vagy pedig úgy, hogy egymás után építjük be a DNS-fragmenseket az egyes elemek (azaz például promoter szekvencia, a szignálpeptid, a GlnProIle (Asp/Glu)(Asp/Glu)X^1(Glu/Asp)X^2AsnZ (Thr/Ser)X^3 vezérszekvencia, a processzálási pont, a polipeptid, és ha jelen van, akkor a terminátorszekvencia) genetikai információját tartalmazó alkalmas vektorba, ligálást követően.

A jelen találmány szerinti élesztő lehet bármelyik alkalmas élesztő, amely tenyésztése során nagy mennyiséget termel a kívánt polipeptidből. Megfelelő élesztő lehet például a *Saccharomyces cerevisiae,* a *Saccharomyces kluyveri,* a Schizoaccharomyces pombe vagy a *Saccharomyces uvarum* faj egy törzse. Az élesztősejtek transzformációját végezhetjük például protoplasztképzéssel majd azt követő, önmagában ismert transzformációval. A sejtek tenyésztésére használt táptalaj lehet bármelyik, az élesztősejtek szaporítására alkalmas szokványos táptalaj. A szekretált polipeptidet, amelynek jelentős része a táptalajban megfelelően processzált formában lehet jelen, szokványos módszerekkel nyerhetjük ki a táptalajból, beleértve az élesztősejtek centrifugálással vagy szűréssel való elválasztását a táptalajtól, a fehérjeszerű anyagok kicsapását a felülúszóból vagy a szűrletből valamilyen só segítségével, azaz például ammónium-szulfáttal, majd ezt követi a tisztítás különböző kromatográfiás eljárásokkal, azaz például ioncserés kromatográfiával, affinitáskromatográfiával vagy hasonlókkal.

A jelen találmányt tovább ismertetjük az alábbi példákban, amelyeknek nem az a céljuk, hogy a találmány oltalmi körét korlátozzák.

Példák

Plazmidok és DNS-ek

Mindegyik plazmid C-POT típusú. Ezeket a plazmidokat a 171 142 számú EP szabadalmi bejelentésben írták le, és azzal jellemezhetők, hogy a *Schizoaccharomyces pombe* triózfoszfát-izomeráz (POT)-génjét tartalmazzák, a plazmid szelektálhatósága és stabilitása érdekében. Egy, a POT-gént tartalmazó plazmid elérhető egy letétbe helyezett *Escherichia coli* törzsben (ATCC 39685). A plazmidok emellett tartalmazzák a *Saccharomyces cerevisiae* triózfoszfát-izomeráz promotert és terminátort (P_{TPI} és T_{TPI}). Ezek azonosak a pMT742-vel [Egel-Mitani, M. és munkatársai: Gene *73,* 113–120 (1988)] (lásd 1. ábra), azzal az eltéréssel, hogy az EcoRI-XbaI restrikciós hasítási hely által meghatározott régió lefedi a szignál/vezér/termék kódoló régiót.

A pAK527, pAK531, pAK555, pAK559, pAK562, pAK614 és pAK625 plazmidokat alkalmazzuk DNS-

templátként a PCR-reakciókban, amiket a példákban említett vezérszekvenciák készítésekor használunk. A közvetlen templátként szolgáló szintetikus DNS-fragmenseket a 13–17. ábrákon mutatjuk be. A bemutatott DNS-régiók kivételével a plazmidok azonosak az 1. ábrán bemutatott pAK492-vel.

A szintetikus DNS-fragmenseket automatizált DNS-szintetizátorokkal szintetizáljuk (Applied Biosystems, 380A modell), foszforamidit-kémiát és kereskedelmi forgalomban levő reagenseket alkalmazva [Beaucage, S. L. és Caruthers, M. H.: Tetrahedron Letters *22*, 1859–1869 (1981)].

Az összes többi anyag és módszer ismert a szakterületen [Sambrook és munkatársai: Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)].

1. példa

Az MI3 inzulin prekurzor *Saccharomyces cerevisiae*-ben (yAK546 törzs) való expressziójához használható, a 4. számú szekvenciavázlatban ismertetett vezérszekvencia szintézise

A 4. számú szekvenciavázlatban ismertetett vezérszekvencia aminosavszekvenciája az alábbi:

GlnProIleAspAspGluAsnThrThrSerValAsnLeuProVal.

Az alábbi oligonukleotidokat szintetizáljuk:

#94 5'–TAAATCTATAACTACAAAAAACAC ATA–3':

29. számú szekvencia

#333 5'–GACTCTCTTAACTGGCAAGTTGA CA–3'

30. számú szekvencia

#312 5'–AAGTACAAAGCTTCAACCAAGTGA GAACCA CACAAGTGTTGGTTAACGAATCTCTT–3'

31. számú szekvencia

#1845 5'–CATACACAATATAAACGACGG–3'

32. számú szekvencia.

Az alábbi polimeráz láncreakciókat (PCR) hajtottuk végre a Gene Amp PCR-reagens-kit alkalmazásával (Perkin Elmer, 761 Main Avewalk, CT 06589, USA), a gyártó előírásai szerint. A reakciókban a PCR-elegyeket 100 µl ásványolajjal borítjuk (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO):

1. számú polimeráz láncreakció

5 µl #94 oligonukleotid (50 pmol)
5 µl #333 oligonukleotid (50 pmol)
10 µl 10X PCR puffer
16 µl dNTP keverék
0,5 µl Taq enzim
0,5 µl pAK527 plazmid (13. ábra) templátként (0,2 µg DNS)
63 µl víz.

Összesen 12 ciklust hajtunk végre, egy ciklus a következő: 94 °C 1 perc; 37 °C 2 perc; 72 °C 3 perc. A PCR-elegyet azután 2%-os agarózgélre visszük, és az elektroforézist standardtechnikák alkalmazásával hajtjuk végre [Sambrook és munkatársai: Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)]. A kapott DNS-fragmenst kivágjuk az agarózgélből, és a Gene Clean-kit alkalmazásával (Bio 101 Inc. PO BOX 2284, La Jolla, CA 92038, USA) izoláljuk, a gyártó előírásai szerint.

2. számú polimeráz láncreakció

5 µl #312 oligonukleotid (50 pmol)
5 µl #94 oligonukleotid (50 pmol)
10 µl 10X PCR puffer
16 µl dNTP keverék
0,5 µl Taq enzim
10 µl tisztított DNS-fragmens az 1. számú polimeráz láncreakcióból
53,5 µl víz.

Összesen 12 ciklust hajtunk végre. Egy ciklus az alábbi: 94 °C 1 perc; 37 °C 2 perc; 72 °C 3 perc.

A 2. számú polimeráz láncreakcióból származó DNS-fragmenst a Gene Clean-kit alkalmazásával (Bio 101 Inc. PO BOX 2284, La Jolla, CA 92038, USA) izoláljuk és tisztítjuk, a gyártó előírásai szerint.

A tisztított PCR-DNS-fragmenst 10 µl vízben oldjuk, majd restrikciósendonukleáz-puffert adunk hozzá, utána pedig Asp718, valamint HindIII restrikciós endonukleázokkal hasítjuk 15 µl össztérfogatban, standardtechnikákat alkalmazva [Sambrook és munkatársai: Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)]. A 167 bázispár méretű Asp718/HindIII DNS-fragmenst agarózgélen elektroforézisnek vetjük alá, majd az előzőkben ismertetett módon a Gene Clean-kittel tisztítjuk. A *Saccharomyces cerevisiae* pAK492 expressziós plazmid (lásd 1. ábra) egy származéka az előzőkben ismertetett pMT742 plazmidnak, amelyben a szignál/vezér/inzulin prekurzor komplexet kódoló fragmenst a 2. ábrán látható EcoRI-XbaI fragmenssel helyettesítjük. Ezt a fragmenst egy Applied Biosystems DNS-szintetizátorral állítjuk elő, a gyártó előírásai szerint. A pAK492 plazmidot Asp718 és XbaI restrikciós enzimmel hasítjuk, majd a 10896 bázispár méretű vektorfragmenst izoláljuk. A pAK492 plazmidot HindIII és XbaI restrikciós enzimekkel hasítjuk, majd izoláljuk a 140 bázispár méretű DNS-fragmenst, amely az MI3 inzulin prekurzor egy részét kódolja. A három DNS-fragmenst T4 DNS-ligázzal ligáljuk, standard körülmények között [Sambrook és munkatársai: Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)]. A ligálóelegyet azután kompetens *Escherichia coli* (R^-, M^+) törzsbe transzformáljuk, és a transzformánsokat az ampicillinrezisztencia alapján azonosítjuk. A kapott *Escherichia coli* telepekből plazmidokat izolálunk, standard miniprep-technika alkalmazásával [Sambrook és munkatársai: Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)], ellenőrizzük őket a megfelelő restrikciós endonukleázokkal, azaz EcoRI, XbaI, NcoI és HindIII enzimekkel. A kiválasztott pAK546 jelű plazmidot DNS-szekvenálással ellenőrizzük (Sequenase, U. S. Biochemical Corp.), a #94-es primert alkalmazva, hogy tartalmazza-e a 4. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvenciát. A 4.

számú szekvenciának megfelelő vezérszekvencia DNS-szekvenciáját a 4. ábrán mutatjuk be. A pAK546 plazmidot *Saccharomyces cerevisiae* MT663 törzsbe transzformáljuk, a 214 826 számú európai szabadalmi publikáció alapján, majd a kapott törzsnek az yAK546 jelzést adjuk. Az expressziós plazmid DNS-szekvenciáját az 5. ábrán adjuk meg.

2. példa

Az MI3 inzulin prekurzor *Saccharomyces cerevisiae*-ben (yAK531 törzs) való expressziójához használható, a 6. számú szekvenciavázlatban ismertetett vezérszekvencia szintézise.

A 6. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvencia aminosavszekvenciája az alábbi:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeu ProAla.

A következő oligonukleotidot szintetizáljuk meg:
#331 5'–GAATCTCTTAGCTGGCAAGTTGACAG AAGTAGT

GTTAGTTTCAGAGTCGTCAATT–3' 33. számú szekvencia

A polimeráz láncreakciót az 1. példában leírtak alapján hajtjuk végre, azzal az eltéréssel, hogy a #331 számú oligonukleotidot használjuk a #333-as oligonukleotid helyett.

A 168 bázispár méretű Asp718/HindIII DNS-fragmenst agarózgélen végzett gélelektroforézisnek vetjük alá, majd az 1. példában leírtak alapján tisztítjuk. Az Asp718/HindIII DNS-fragmenst *Saccharomyces cerevisiae* expressziós plazmidba szubklónozzuk, az 1. példában leírtak alapján. A kiválasztott pAK531 jelű plazmidról DNS-szekvenálással kimutatjuk, az 1. példában leírtak alapján, hogy a 6. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvenciát tartalmazza. A 6. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvenciát kódoló DNS-szekvenciát a 6. ábrán mutatjuk be. A pAK531 jelű plazmidot *Saccharomyces cerevisiae* MT663 törzsbe transzformáljuk, a 86306721.1 számú európai szabadalmi bejelentésben leírtak alapján, és a kapott törzsnek a yAK531 jelzést adjuk. A szignálpeptidet és az MI3 inzulin prekurzort kódoló DNS-szekvenciák azonosak azzal, amit az 5. ábrán bemutattunk.

3. példa

Az MI3 inzulin prekurzor *Saccharomyces cerevisiae*-ben (yAK547 törzs) való expressziójához használható, a 8. számú szekvenciavázlatban ismertetett vezérszekvencia szintézise.

A 8. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvencia aminosavszekvenciája az alábbi:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeu ProGlyAla.

Az alábbi oligonukleotidot szintetizáljuk meg:
#345 5'–AACGAATCTCTTAGCACCTGGCAAGTT GACAGAAGT–3'
34. számú szekvencia.

A polimeráz láncreakciót az 1. példában leírtak alapján hajtjuk végre, azzal az eltéréssel, hogy a #333-as oligonukleotid helyett a #345-ös oligonukleotidot használjuk, és templátként a pAK351 plazmidot (14. ábra) használjuk.

A 171 bázispár méretű Asp718/HindIII DNS-fragmenst agarózgélen végzett gélelektroforézisnek vetjük alá, majd az 1. példában leírtak alapján tisztítjuk. Az Asp718/HindIII DNS-fragmenst *Saccharomyces cerevisiae* expressziós plazmidba szubklónozzuk, az 1. példában leírtak alapján. A kiválasztott pAK547 jelű plazmidról DNS-szekvenálással kimutatjuk, az 1. példában leírtak alapján, hogy a 8. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvenciát tartalmazza. A 8. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvenciát kódoló DNS-szekvenciát a 7. ábrán mutatjuk be. A pAK547 jelű plazmidot *Saccharomyces cerevisiae* MT663 törzsbe transzformáljuk, a 86306721.1 számú európai szabadalmi bejelentésben leírtak alapján, és a kapott törzsnek a yAK547 jelzést adjuk. A szignálpeptidet és az MI3 inzulin prekurzort kódoló DNS-szekvenciák azonosak azzal, amit az 5. ábrán bemutattunk.

4. példa

Az MI3 inzulin prekurzor *Saccharomyces cerevisiae*-ben (yAK561 törzs) való expressziójához használható, a 17. számú szekvenciavázlatban ismertetett vezérszekvencia szintézise

A 17. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvencia aminosavszekvenciája az alábbi:
GlnProIleAspAspThrGluSerIleAsnThrThrLeuValAsn LeuProGlyAla

Az alábbi oligonukleotidot szintetizáljuk meg:
#376 5'–AACGAATCTCTTAGCACCTGGCAAGTT GACCAAAGT

AGTGTTGATAGATTCAGTGTCGTC–3' 35. számú szekvencia

A polimeráz láncreakciót az 1. példában leírtak alapján hajtjuk végre, azzal az eltéréssel, hogy a #333-as oligonukleotid helyett a #376-os oligonukleotidot használjuk, és templátként a pAK555 plazmidot (15. ábra) használjuk.

A 180 bázispár méretű Asp718/HindIII DNS-fragmenst agarózgélen végzett gélelektroforézisnek vetjük alá, majd az 1. példában leírtak alapján tisztítjuk. Az Asp718/HindIII DNS-fragmenst *Saccharomyces cerevisiae* expressziós plazmidba szubklónozzuk, az 1. példában leírtak alapján. A kiválasztott pAK561 jelű plazmidról DNS-szekvenálással kimutatjuk, az 1. példában leírtak alapján, hogy a 17. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvenciát tartalmazza. A 17. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvenciát kódoló DNS-szekvenciát a 8. ábrán mutatjuk be. A pAK561 jelű plazmidot *Saccharomyces cerevisiae* MT663 törzsbe transzformáljuk, a 86306721.1 számú európai szabadalmi bejelentésben leírtak alapján, és a kapott törzsnek a yAK561 jelzést adjuk. A szignálpeptidet és az MI3 inzulin prekurzort kódoló DNS-szekvenciák azonosak azzal, amit az 5. ábrán bemutattunk.

5. példa

Az MI3 inzulin prekurzor *Saccharomyces cerevisiae*-ben (yAK559 törzs) való expressziójához használ-

ható, a 16. számú szekvenciavázlatban ismertetett vezérszekvencia szintézise

A 16. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvencia aminosavszekvenciája az alábbi:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeu
MetAlaAspAspThrGlu
SerIleAsnThrThrLeuValAsnLeuProGlyAla

Az alábbi oligonukleotidot szintetizáljuk meg:
#375 5'-AACGAATCTCTTAGCACCTGGCAAGTT
AACCAAAGTAGTGTTGATAGAT
TCAGTGTCGTCAGCCATCAAGTTGAC-3' 36. számú szekvencia

A polimeráz láncreakciót az 1. példában leírtak alapján hajtjuk végre, azzal az eltéréssel, hogy a #333-as oligonukleotid helyett a #375-ös oligonukleotidot használjuk, és templátként a pAK555 plazmidot (15. ábra) használjuk.

A 222 bázispár méretű Asp718/HindIII DNS-fragmenst agarózgélen végzett gélelektroforézisnek vetjük alá, majd az 1. példában leírtak alapján tisztítjuk. Az Asp718/HindIII DNS-fragmenst *Saccharomyces cerevisiae* expressziós plazmidba szubklónozzuk, az 1. példában leírtak alapján. A kiválasztott pAK559 jelű plazmidról DNS-szekvenálással kimutatjuk, az 1. példában leírtak alapján, hogy a 16. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvenciát tartalmazza. A 16. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvenciát kódoló DNS-szekvenciát a 9. ábrán mutatjuk be. A pAK559 jelű plazmidot *Saccharomyces cerevisiae* MT663 törzsbe transzformáljuk, a 86306721.1 számú európai szabadalmi bejelentésben leírtak alapján, és a kapott törzsnek a yAK559 jelzést adjuk. A szignálpeptidet és az MI3 inzulin prekurzort kódoló DNS-szekvenciák azonosak azzal, amit az 5. ábrán bemutattunk.

6. példa

Az MI3 inzulin prekurzor *Saccharomyces cerevisiae*-ben (yAK580 törzs) való expressziójához használható, a 19. számú szekvenciavázlatban ismertetett vezérszekvencia szintézise

A 19. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvencia aminosavszekvenciája az alábbi:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeu
MetAlaAspAspThrGlu
SerArgPheAlaThrAsnThrThrLeuValAsnLeuProLeu

Az alábbi oligonukleotidot szintetizáljuk meg:
#384 5'-AACGAATCTCTTCAATGGCAAGTTAA
CCAAAGTAGTGTTAGTAGCGA
ATCTAGATTCAGTGTCGTCAGCCAT-3' 37. számú szekvencia

A polimeráz láncreakciót az 1. példában leírtak alapján hajtjuk végre, azzal az eltéréssel, hogy a #333-as oligonukleotid helyett a #384-es oligonukleotidot használjuk, és templátként a pAK559 plazmidot (15. ábra) használjuk.

A 228 bázispár méretű Asp718/HindIII DNS-fragmenst agarózgélen végzett gélelektroforézisnek vetjük alá, majd az 1. példában leírtak alapján tisztítjuk. Az Asp718/HindIII DNS-fragmenst *Saccharomyces cerevisiae* expressziós plazmidba szubklónozzuk, az 1. példában leírtak alapján. A kiválasztott pAK580 jelű plazmidról DNS-szekvenálással kimutatjuk, az 1. példában leírtak alapján, hogy a 19. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvenciát tartalmazza. A 19. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvenciát kódoló DNS-szekvenciát a 10. ábrán mutatjuk be. A pAK580 jelű plazmidot *Saccharomyces cerevisiae* MT663 törzsbe transzformáljuk, a 86306721.1 számú európai szabadalmi bejelentésben leírtak alapján, és a kapott törzsnek a yAK580 jelzést adjuk. A szignálpeptidet és az MI3 inzulin prekurzort kódoló DNS-szekvenciák azonosak azzal, amit az 5. ábrán bemutattunk.

7. példa

Az MI3 inzulin prekurzor *Saccharomyces cerevisiae*-ben (yAK583 törzs) való expressziójához használható, a 20. számú szekvenciavázlatban ismertetett vezérszekvencia szintézise

A 20. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvencia aminosavszekvenciája az alábbi:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeu
MetAlaAspAspThrGlu
SerIleAsnThrThrLeuValAsnLeuAlaAsnValAlaMetAla

Az alábbi oligonukleotidot szintetizáljuk meg:
#390 5'-AACGAATCTCTTAGCCATGGCAACGTT
AGCCAAGTTAACCAAAGT-3' 38. számú szekvencia

A polimeráz láncreakciót az 1. példában leírtak alapján hajtjuk végre, azzal az eltéréssel, hogy a #333-as oligonukleotid helyett a #390-es oligonukleotidot használjuk, és templátként a pAK559 plazmidot (15. ábra) használjuk.

A 231 bázispár méretű Asp718/HindIII DNS-fragmenst agarózgélen végzett gélelektroforézisnek vetjük alá, majd az 1. példában leírtak alapján tisztítjuk. Az Asp718/HindIII DNS-fragmenst *Saccharomyces cerevisiae* expressziós plazmidba szubklónozzuk, az 1. példában leírtak alapján. A kiválasztott pAK583 jelű plazmidról DNS-szekvenálással kimutatjuk, az 1. példában leírtak alapján, hogy a 20. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvenciát tartalmazza. A 20. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvenciát kódoló DNS-szekvenciát a 11. ábrán mutatjuk be. A pAK583 jelű plazmidot *Saccharomyces cerevisiae* MT663 törzsbe transzformáljuk, a 86306721.1 számú európai szabadalmi bejelentésben leírtak alapján, és a kapott törzsnek az yAK583 jelzést adjuk. A szignálpeptidet és az MI3 inzulin prekurzort kódoló DNS-szekvenciák azonosak azzal, amit az 5. ábrán bemutattunk.

8. példa

Az MI3 inzulin prekurzor *Saccharomyces cerevisiae*-ben (yAK586 törzs) való expressziójához használható, a 21. számú szekvenciavázlatban ismertetett vezérszekvencia szintézise

A 21. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvencia aminosavszekvenciája az alábbi:
GlnProIleAspAspThrGluSerAlaIleAsnThrThrLeuVal
AsnLeuProGlyAla

Az alábbi oligonukleotidot szintetizáljuk meg:

#401 5'-AACGAATCTCTTAGCACCTGGCAAGTT GACCAAAGTAGTGTTGATAG CAGATTCAGTGTCG-3' 39. számú szekvencia.

A polimeráz láncreakciót az 1. példában leírtak alapján hajtjuk végre, azzal az eltéréssel, hogy a #333-as oligonukleotid helyett a #401-es oligonukleotidot használjuk, és templátként a pAK562 plazmidot (15. ábra) használjuk.

A 183 bázispár méretű Asp718/HindIII DNS-fragmenst agarózgélen végzett gélelektroforézisnek vetjük alá, majd az 1. példában leírtak alapján tisztítjuk. Az Asp718/HindIII DNS-fragmenst *Saccharomyces cerevisiae* expressziós plazmidba szubklónozzuk, az 1. példában leírtak alapján. A kiválasztott pAK586 jelű plazmidról DNS-szekvenálással kimutatjuk, az 1. példában leírtak alapján, hogy a 21. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvenciát tartalmazza. A 21. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvenciát kódoló DNS-szekvenciát a 12. ábrán mutatjuk be. A pAK586 jelű plazmidot *Saccharomyces cerevisiae* MT663 törzsbe transzformáljuk, a 86306721.1 számú európai szabadalmi bejelentésben leírtak alapján, és a kapott törzsnek az yAK586 jelzést adjuk. A szignálpeptidet és az MI3 inzulin prekurzort kódoló DNS-szekvenciák azonosak azzal, amit az 5. ábrán bemutattunk.

9. példa

Az MI3 inzulin prekurzor expressziója, a jelen találmány szerinti kiválasztott vezérszekvenciák alkalmazásával

Az előzőkben ismertetett plazmidokat hordozó élesztőtörzseket YPD táptalajon szaporítjuk [Sherman, F. és munkatársai: Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1981)]. Minden egyes törzsből 6 db 5 ml-es tenyészetet készítünk, ezeket 30 °C-on rázatjuk 72 óra hosszat, a végső OD_{600}-értékük körülbelül 15. Centrifugálás után HPLC-elemzés céljára eltávolítjuk a felülúszót, és a szekretált inzulin koncentrációját Snel és munkatársai módszerét használva mérjük meg [Snel, L. és munkatársai: Chromatographia *24,* 329-332 (1987)].

Az 1. táblázatban az MI3 inzulin prekurzor expressziós szintjei láthatók, amiket a jelen találmány szerinti vezérszekvenciák alkalmazásával el lehet érni, és ezeknek az értékét százalékban adjuk meg, a pMT742 transzformánsok értékéhez viszonyítva, amelyekben a *Saccharomyces cerevisiae* MFα(1) vezérszekvenciáit használjuk.

1. táblázat

Vezérszekvencia	Expressziós szint, %
MT748 α-vezérszekvencia	100
15. számú szekvencia	87
16. számú szekvencia	215
17. számú szekvencia	157
19. számú szekvencia	166
20. számú szekvencia	86
21. számú szekvencia	145
22. számú szekvencia	137
23. számú szekvencia	121

10. példa

A meghosszabbított MI3 inzulin prekurzor *Saccharomyces cerevisiae*-ben (yAK677 törzs) való expressziójához használható, a 27. számú szekvenciavázlatban ismertetett vezérszekvencia szintézise.

A 27. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvencia aminosavszekvenciája az alábbi:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeu MetAlaAspAspThrGlu
SerArgPheAlaThrAsnThrThrLeuAspValValAsnLeuIle SerMetAla

Az alábbi oligonukleotidokat szintetizáljuk meg:
#440 5'-GGTTAACGAACTTTGGAGCTTCAGCTT CAGCTTCTTCTCTCTTAGC CAT GGAGATCAAGTTAACAACATCCAAAGTAGTGT T-3'
64. számú szekvencia és
#441 5'-CAAGTACAAAGCTTCAACCAAGTGGG AACCGCACAAGT GTTGGTTAACGAACTT-3' 65. számú szekvencia.

A polimeráz láncreakciókat az 1. példában leírtak alapján hajtjuk végre, azzal az eltéréssel, hogy a #333-as oligonukleotid helyett a #440-es oligonukleotidot használjuk, és templátként a pAK614 plazmidot használjuk. A második polimeráz láncreakcióban a #312-es oligonukleotid helyett a #441-es oligonukleotidot használjuk.

A tisztított PCR-DNS-fragmenst izoláljuk, majd az Asp718 és HindIII restrikciós endonukleázzal emésztjük, az 1. példában leírtak alapján. A 268 bázispár méretű Asp718/HindIII DNS-fragmenst agarózgélen végzett gélelektroforézisnek vetjük alá, majd az 1. példában leírtak alapján tisztítjuk. Az Asp718/HindIII DNS-fragmenst *Saccharomyces cerevisiae* expressziós plazmidba szubklónozzuk, az 1. példában leírtak alapján, azzal az eltéréssel, hogy a 140 bázispár méretű HindIII/XbaI DNS-fragmens a pAK602 plazmidból származik, és az Asp^{B28} humáninzulint kódolja. A kiválasztott pAK616 jelű plazmidról DNS-szekvenálással kimutatjuk, az 1. példában leírtak alapján, hogy a 27. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvenciát tartalmazza. A 66. számú szekvenciának megfelelő DNS-szekvenciát és a 27. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvenciát kódoló DNS-szekvenciát a 18. ábrán mutatjuk be. A pAK616-ból származó, 268 bázispár méretű DNS-fragmenst izoláljuk, majd ligáljuk a 10986 bázispár méretű, a pAK601 plazmidból származó DNS-fragmenssel és a pAK464-ből származó 140 bázispár méretű HindIII/XbaI DNS-fragmenssel (ez az Asp^{B28} inzulin meghosszabbított verzióját kódolja), majd a kapott konstrukciónak a pAK625 jelzést adjuk. Izoláljuk a pAK625 plazmidból származó 180 bá-

zispár méretű Asp718/NcoI DNS-fragmenst, és ligáljuk a 221 bázispár méretű NcoI/XbaI DNS-fragmenshez, amely a pJB146 plazmidból származik (az inzulinprekurzor meghosszabbított verzióját kódolja), valamint a pAK601 plazmidból származó 10824 bázispár méretű Asp718/XbaI DNS-fragmenshez, és a kapott plazmidnak a pAK677 jelzést adjuk. A pAK677 jelű plazmidot *Saccharomyces cerevisiae* MT663 törzsbe transzformáljuk, a 86306721.1 számú európai szabadalmi bejelentésben leírtak alapján, és a kapott törzsnek az yAK677 jelzést adjuk. A vezérszekvenciát kódoló DNS-szekvencia kivételével a szignálpeptidet kódoló DNS-szekvencia azonos azzal, amit az 5. ábrán bemutattunk. A meghosszabbított MI3 inzulin prekurzort kódoló DNS-szekvenciát a 19. ábrán mutatjuk be.

11. példa

Az MI3 inzulin prekurzor *Saccharomyces cerevisiae*-ben (yAK680 törzs) való expressziójához használható, a 67. számú szekvenciavázlatban ismertetett vezérszekvencia szintézise

A 67. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvencia aminosavszekvenciája az alábbi:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeu
MetAlaAspAspThrGlu
SerArgPheAlaThrAsnThrThrLeuAlaLeuAspValValAs
nLeuIleSerMetAla

Az alábbi oligonukleotidot szintetizáljuk meg:
#577 5'–TCTCTTAGCCATGGAGATCAAGTTAAC
AACATCCAAAGC
CAAAGTAGTGTT–3' 68. számú szekvencia

A polimeráz láncreakciót az 1. példában leírtak alapján hajtjuk végre, azzal az eltéréssel, hogy a #333-as oligonukleotid helyett az #577-es oligonukleotidot használjuk, és templátként a pAK625 plazmidot használjuk, és a második polimeráz láncreakciót nem végezzük el. A PCR-fragmenst Asp718 és NcoI restrikciós endonukleázokkal emésztjük, az 1. példában leírtak alapján.

A 190 bázispár méretű Asp718/NcoI DNS-fragmenst agarózgélen végzett gélelektroforézisnek vetjük alá, majd az 1. példában leírtak alapján tisztítjuk, azzal az eltéréssel, hogy a 10824 bázispár méretű Asp718/XbaI vektor DNS-fragmenst a pAK601 plazmidból izoláljuk. A 190 bázispár méretű Asp718/NcoI DNS-fragmenst *Saccharomyces cerevisiae* expressziós plazmidba szubklónozzuk, az 1. példában leírtak alapján, azzal az eltéréssel, hogy a 221 bázispár méretű NcoI/XbaI DNS-fragmenst (amely az MI3 inzulin prekurzor meghosszabbított verzióját kódolja) a pAk677-es plazmidból izoláljuk, és ezt használjuk a HindIII/XbaI DNS-fragmens helyett. A kiválasztott pAK680 jelű plazmidról DNS-szekvenálással kimutatjuk, az 1. példában leírtak alapján, hogy a 67. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvenciát tartalmazza. A 67. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvenciát kódoló DNS-szekvenciát (69. számú szekvencia) a 20. ábrán mutatjuk be. A pAK680 jelű plazmidot *Saccharomyces cerevisiae* MT663 törzsbe transzformáljuk, a 86306721.1 számú európai szabadalmi bejelentésben leírtak alapján, és a kapott törzsnek az yAK680 jelzést adjuk. A vezérszekvenciát kódoló DNS-szekvencia kivételével a szignálpeptidet és a meghosszabbított MI3 inzulin prekurzort kódoló DNS-szekvenciák azonosak azzal, amit a 19. ábrán bemutattunk.

12. példa

Az N-terminálison meghosszabbított MI3 inzulin prekurzorok expressziója a 27. számú szekvenciának és a 67. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvenciák alkalmazásával

Az előzőkben ismertetett plazmidokat hordozó élesztőtörzseket szaporítunk YPD tenyésztő táptalajon [Sherman, F. és munkatársai: Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1981)]. Minden egyes törzsből 6 db 5 ml-es tenyészetet készítünk, ezeket 30 °C-on rázatjuk 72 óra hosszat, a végső OD_{600}-értékük körülbelül 15. Centrifugálás után HPLC-elemzés céljára eltávolítjuk a felülúszót, és a szekretált inzulin koncentrációját Snel és munkatársai módszerét használva mérjük meg [Snel, L. és munkatársai: Chromatographia *24*, 329–332 (1987)].

A 2. táblázatban néhány, az N-terminálisán meghosszabbított MI3 inzulin prekurzor expressziós szintjei láthatók, amiket a jelen találmány szerinti, a 27. számú szekvenciának és a 67. számú szekvenciának megfelelő vezérszekvenciák alkalmazásával el lehet érni, és ezeknek az értékét százalékban adjuk meg, a pMT742 transzformánsok értékéhez viszonyítva, amelyekben a *Saccharomyces cerevisiae* MFα(1) vezérszekvenciáit használjuk.

2. táblázat

Törzs	Szignálpeptid	Vezérszekvencia	Meghosszabbítás	Az MT748-hoz viszonyítva
MT748	α	α		
yAK675	YAP3	27. számú szekvencia	EEAEAEAPK	251%
yAK677	YAP3	27. számú szekvencia	EEAEAEAEPK	224%
yAK681	YAP3	67. számú szekvencia	EEAEAEAPK	248%
yAK680	YAP3	67. számú szekvencia	EEAEAEAPK	362%

Az alábbiakban ismertetjük a szövegben szereplő szekvenciákat.

A szekvencialista

(1) Általános információ:
(i) Benyújtó:
(A) Név: Novo Nordisk A/S
(B) Utca: Novo Allé
(C) Város: DK-2880 Bagsvaerd
(E) Ország: Dánia
(G) Telefon: +45 44448888
(H) Telefax: +45 44490555
(I) Telex: 37173
(ii) A találmány címe: Szintetikus vezérpeptid-szekvenciák
(iii) A szekvenciák száma: 73
(iv) Levelezési cím:
(A) Címzett: Novo Nordisk A/S
Corporate Patents
(B) Utca: Novo Allé
(C) Város: DK-2880 Bagsvaerd
(E) Ország: Dánia
(v) Számítógépes forma:
(A) A hordozó típusa: flopilemez
(B) Számítógép: IBM PC kompatibilis
(C) Operációs rendszer: PC-DOS/MS-DOS
(D) Program: PatentIn Release #1.0, Version#1.25
(vi) A jelenlegi benyújtása adatai:
(A) A benyújtás sorszáma:
(B) A benyújtás időpontja:
(C) Osztályozás:
(vii) A korábbi benyújtás adatai:
(A) A benyújtás sorszáma: DK 0705/94 és US 08/282,852
(B) A benyújtás időpontja: 1994. június 16. és 1994. július 29.
(viii) Ügyvivő/ügynök információ:
(A) Név: Jorgensen, Dan és munkatársai
(B) Referencia/lajstromszám: 4085-WO, DJ
(ix) Telekommunikációs információ:
(A) Telefon: +45 44448888
(B) Telefax: +45 44493256

1. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 15 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 1. számú szekvencia

Gln Pro Ile Asp Glu Asp Asn Asp Thr Ser Val Asn Leu Pro Ala
1 5 10 15

2. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 15 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 2. számú szekvencia

Gln Pro Ile Asp Asp Glu Asn Thr Thr Ser Val Asn Leu Pro Ala
1 5 10 15

3. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 16 aminosav
(B) Típus: aminosav

(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 3. számú szekvencia

GlnProIleAspAspGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuProAla
1 5 10 15

4. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 15 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 4. számú szekvencia

GlnProIleAspAspGluAsnThrThrSerValAsnLeuProVal
1 5 10 15

5. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 16 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 5. számú szekvencia

GlnProIleAspAspThrGluAsnThrThrSerValAsnLeuProAla
1 5 10 15

6. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 17 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 6. számú szekvencia

GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuProAla
1 5 10 15

7. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 15 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 7. számú szekvencia

GlnProIleAspAspGluAsnThrThrSerValAsnLeuMetAla
1 5 10 15

8. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 18 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 8. számú szekvencia

GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuProGlyAla
1 5 10 15

9. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 17 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 9. számú szekvencia

GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAla
1 5 10 15

10. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 17 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 10. számú szekvencia

GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnValProThr
1 5 10 15

11. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 17 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 11. számú szekvencia

GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrLeuValAsnValProThr
1 5 10 15

12. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 17 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 12. számú szekvencia

GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuProThr
1 5 10 15

13. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 18 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 13. számú szekvencia

GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrLeuValAsnValProGlyAla
1 5 10 15

14. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 21 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 14. számú szekvencia

GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaProAla
1 5 10 15
ValAla
20

15. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 25 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 15. számú szekvencia

GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAspLeuAla
1 5 10 15
ValGlyLeuProGlyAla
20

16. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 33 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 16. számú szekvencia

```
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaAspAsp
 1               5                  10                  15
ThrGluSerIleAsnThrThrLeuValAsnLeuProGlyAla
            20                  25                  30
```

17. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 19 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 17. számú szekvencia

```
GlnProIleAspAspThrGluSerIleAsnThrThrLeuValAsnLeuProGlyAla
 1               5                  10                  15
```

18. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 18 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 18. számú szekvencia

```
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrLeuValAsnLeuProGlyAla
 1               5                  10                  15
```

19. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 35 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 19. számú szekvencia

```
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaAspAsp
 1               5                  10                  15
ThrGluSerArgPheAlaThrAsnThrThrLeuValAsnLeuProLeu
            20                  25                  30                  35
```

20. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 36 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 20. számú szekvencia

```
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaAspAsp
 1               5                  10                  15
ThrGluSerIleAsnThrThrLeuValAsnLeuAlaAsnValAlaMetAla
            20                  25                  30                  35
```

21. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 20 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid

(xi) A szekvencia leírása: 21. számú szekvencia

GlnProIleAspAspThrGluSerAlaIleAsnThrThrLeuValAsnLeuProGly
1 5 10 15
Ala

22. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 21 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 22. számú szekvencia

GlnProIleAspAspThrGluSerPheAlaThrAsnThrThrLeuValAsnLeuPro
1 5 10 15
GlyAla
20

23. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 36 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 23. számú szekvencia

GlnProIleAspAspThrGluSerIleAsnThrTheLeuValAsnLeuMetAlaAsp
1 5 10 15
AspThrGluSerArgPheAlaThrAsnThrThrLeuValAsnLeuProLeu
20 25 30 35

24. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 39 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 24. számú szekvencia

GlnProIleAspAspThrGluSerIleAsnThrTheLeuValAsnLeuMetAlaAsp
1 5 10 15
AspThrGluSerArgPheAlaThrAsnThrThrLeuAspValValAsnLeuGlyAla
20 25 30 35

25. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 21 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 25. számú szekvencia

GlnProIleAspAspThrGluSerPheAlaAlaIleAsnThrThrLeuValAsnLeu
1 5 10 15
ProGlyAla
20

26. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 39 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 26. számú szekvencia

GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaAspAsp
1 5 10 15
ThrGluSerArgPheAlaThrAsnThrThrLeuValAsnLeuAlaAsnValAlaMet
20 25 30 35
Ala

27. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 39 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 27. számú szekvencia

GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaAspAsp
1 5 10 15
ThrGluSerArgPheAlaThrAsnThrThrLeuAspValValAsnLeuIleSerMet
20 25 30 35
Ala

28. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 39 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 28. számú szekvencia

GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaAsnThr
1 5 10 15
ThrGluSerArgPheAlaThrAsnThrThrLeuAspValValAsnLeuIleSerMet
20 25 30 35
Ala

29. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 27 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS
(xi) A szekvencia leírása: 29. számú szekvencia

TAAATCTATAACTACAAAAAACACATA

30. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 25 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS
(xi) A szekvencia leírása: 30. számú szekvencia

GACTCTCTTAACTGGCAAGTTGACA

31. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 56 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS
(xi) A szekvencia leírása: 31. számú szekvencia

AAGTACAAAGCTTCAACCAAGTGAGAACCACACAAGTGTTGGTTAACGAATCTCTT

32. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 21 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS
(xi) A szekvencia leírása: 32. számú szekvencia

CATACACAATATAAACGACGG

33. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 55 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS
(xi) A szekvencia leírása: 33. számú szekvencia
GAATCTCTTAGCTGGCAAGTTGACAGAAGTAGTGTTAGTTTCAGAGTCGTCAATT

34. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 36 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS
(xi) A szekvencia leírása: 34. számú szekvencia
AACGAATCTCTTAGCACCTGGCAAGTTGACAGAAGT

35. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 60 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS
(xi) A szekvencia leírása: 35. számú szekvencia
AACGAATCTCTTAGCACCTGGCAAGTTGACCAAAGTAGTGTTGATAGATTCAGTGTCGTC

36. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 75 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS
(xi) A szekvencia leírása: 36. számú szekvencia
AACGAATCTCTTAGCACCTGGCAAGTTAACCAAAGTAGTGTTGATAGATTCAGTGTCGTCAGC
CATCAAGTTGAC

37. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 72 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS
(xi) A szekvencia leírása: 37. számú szekvencia
AACGAATCTCTTCAATGGCAAGTTAACCAAAGTAGTGTTAGTAGCGAATCTAGATTCAGTGTC
GTCAGCCAT

38. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 45 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS
(xi) A szekvencia leírása: 38. számú szekvencia
AACGAATCTCTTAGCCATGGCAACGTTAGCCAAGTTAACCAAAGT

39. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 61 bázispár
(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS
(xi) A szekvencia leírása: 39. számú szekvencia

AACGAATCTCTTAGCACCTGGCAAGTTGACCAAAGTAGTGTTGATAGCAGATTCAGTGTCG

40. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 372 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS
(ix) Tulajdonság:
(A) Név/kulcs: CDS
(B) Lokalizáció: 82...351
(xi) A szekvencia leírása: 40. számú szekvencia

```
GAATTCATTC AAGAATAGTT CAAACAAGAA GATTACAAAC TATCAATTTC
ATACACAATA TAAACGACGG GTACCAAAAT A ATG AAA CTG AAA ACT
                                  Met Lys Leu Lys Thr
GTA AGA TCT GCG GTC CTT TCG TCA CTC TTT GCA TCT CAG GTC
Val Arg Ser Ala Val Leu Ser Ser Leu Phe Ala Ser Gln Val
CTT GGC CAA CCA ATC GCA GAA GAC AAC GAC ACT TCT TCC ATG
Leu Gly Gln Pro Ile Asp Glu Asp Asn Asp Thr Ser Ser Met
GCT AAG AGA TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGC GGT TCC CAC TTG
Ala Lys Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu
GTT GAA GCT TTG TAC TTG GTT TGC GGT GAA AGA GGT TTC TTC
Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe
TAC ACT CCT AAG GCT GCT AAG GGT ATT GTC GAG CAA TGC TGT
Tyr Thr Pro Lys Ala Ala Lys Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys
ACC TCC ATC TGC TCC TTG TAC CAA TTG GAA AAC TAC TGC AAC
Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
TAGACGCAGC CCGCAGGCTC TAGA
```

41. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 89 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 41. számú szekvencia

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

42. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 45 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS

(ix) Tulajdonság:
(A) Név/Kulcs: CDS
(B) Lokalizáció: 1...45
(xi) A szekvencia leírása: 42. számú szekvencia

```
CAA CCA ATT GAC GAC GAA AAC ACT ACT TCT GTC AAC TTG CCA
Gln Pro Ile Asp Asp Glu Asn Thr Thr Ser Val Asn Leu Pro
  1               5                  10
GTT
Val
```

43. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 15 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 43. számú szekvencia

```
Gln Pro Ile Asp Asp Glu Asn Thr Thr Ser Val Asn Leu Pro
  1               5                  10
Val
```

44. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 297 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS
(ix) Tulajdonság:
(A) Név/Kulcs: CDS
(B) Lokalizáció: 1...276
(xi) A szekvencia leírása: 44. számú szekvencia

```
                                                ATG AAA CTG AAA ACT
                                                Met Lys Leu Lys Thr
                                                 1               5
GTA AGA TCT GCG GTC CTT TCG TCA CTC TTT GCA TCT CAG GTC
Val Arg Ser Ala Val Leu Ser Ser Leu Phe Ala Ser Gln Val
                   10                  15

CTT GGC CAA CAA ATT GAC GAC GAA AAC ACT ACT TCT GTC AAC
Leu Gly Gln Pro Ile Asp Asp Glu Asn Thr Thr Ser Val Asn
 20                  25                  30
TTG CCA GTT AAG AGA TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT TGT TCT
Leu Pro Val Lys Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser
      35                  40                  45
CAC TTG GTT GAA GCT TTG TAC TTG GTT TGC GGT GAA AGA GGT
His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly
            50                  55                  60
TTC TTC TAC ACT CCT AAG GCT GCT AAG GGT ATT GTC GAA CAA
Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Ala Ala Lys Gly Ile Val Glu Gln
                65                  70                  75
TGC TGT ACC TCC ATC TGC TCC TTG TAC CAA TTG GAA AAC TAC
Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr
                   80                  85
TGC AAC TAGACGCAGC CCGCAGGCTC TAGA
Cys Asn
 90
```

45. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 91 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 45. számú szekvencia

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

46. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 51 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS
(ix) Tulajdonság:
(A) Név/Kulcs: CDS
(B) Lokalizáció: 1...51
(xi) A szekvencia leírása: 46. számú szekvencia

```
CAA CCA ATT GAC GAC ACT GAA TCG AAC ACT ACT TCT GTC AAC
Gln Pro Ile Asp Asp Thr Glu Ser Asn Thr Thr Ser Val Asn
 1               5                  10
TTG CCA GCT
Leu Pro Ala
 15
```

47. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 17 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 47. számú szekvencia

```
Gln Pro Ile Asp Asp Thr Glu Ser Asn Thr Thr Ser Val Asn
 1               5                  10
Leu Pro Ala
 15
```

48. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 54 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS
(ix) Tulajdonság:
(A) Név/Kulcs: CDS
(B) Lokalizáció: 1...54
(xi) A szekvencia leírása: 48. számú szekvencia

```
CAA CCA ATT GAC GAC ACT GAA TCT AAC ACT ACT TCT GTC AAC
Gln Pro Ile Asp Asp Thr Glu Ser Asn Thr Thr Ser Val Asn
 1               5                  10
```

```
TTG CCA GGT GCT
Leu Pro Gly Ala
 15
```

49. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 57 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS
(ix) Tulajdonság:
(A) Név/Kulcs: CDS
(B) Lokalizáció: 1...57
(xi) A szekvencia leírása: 49. számú szekvencia

```
CAA CCA ATT GAC GAC ACT GAA TCT ATC AAC ACT TCT TTG GTC
Gln Pro Ile Asp Asp Thr Glu Ser Ile Asn Thr Thr Leu Val
  1               5                  10
AAC TTG CCA GGT GCT
Asn Leu Pro Gly Ala
 15
```

50. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 99 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS
(ix) Tulajdonság:
(A) Név/Kulcs: CDS
(B) Lokalizáció: 1...99
(xi) A szekvencia leírása: 50. számú szekvencia

```
CAA CCA ATT GAC GAC ACT GAA TCT AAC ACT ACT TCT GTC AAC
Gln Pro Ile Asp Asp Thr Glu Ser Asn Thr Thr Ser Val Asn
  1               5                  10
TTG ATG GCT GAC GAC ACT GAA TCT ATC AAC ACT ACT TTG GTT
Leu Met Ala Asp Asp Thr Glu Ser Ile Asn Thr Thr Leu Val
 15                  20                  25
AAC TTG CCA GGT GCT
Asn Leu Pro Gly Ala
 30
```

51. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 105 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS
(ix) Tulajdonság:
(A) Név/Kulcs: CDS
(B) Lokalizáció: 1...105
(xi) A szekvencia leírása: 51. számú szekvencia

```
CAA CCA ATT GAC GAC ACT GAA TCT AAC ACT ACT TCT GTC AAC
Gln Pro Ile Asp Asp Thr Glu Ser Asn Thr Thr Ser Val Asn
  1               5                  10
TTG ATG GCT GAC GAC ACT GAA TCT AGA TTC GCT ACT AAC ACT
Leu Met Ala Asp Asp Thr Glu Ser Arg Phe Ala Thr Asn Thr
 15                  20                  25
ACT TTG GTT AAC TTG CCA TTG
Thr Leu Val Asn Leu Pro Leu
      30                  35
```

52. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 108 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS
(ix) Tulajdonság:
(A) Név/Kulcs: CDS
(B) Lokalizáció: 1...108
(xi) A szekvencia leírása: 52. számú szekvencia

```
CAA CCA ATT GAC GAC ACT GAA TCT AAC ACT ACT TCT GTC AAC
Gln Pro Ile Asp Asp Thr Glu Ser Asn Thr Thr Ser Val Asn
  1               5                  10
TTG ATG GCT GAC GAC ACT GAA TCT ATC AAC ACT ACT TTG GTT
Leu Met Ala Asp Asp Thr Glu Ser Ile Asn Thr Thr Leu Val
 15                  20                  25
AAC TTG GCT AAC GTT GCC ATG GCT
Asn Leu Ala Asn Val Ala Met Ala
      30                  35
```

53. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 60 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS
(ix) Tulajdonság:
(A) Név/Kulcs: CDS
(B) Lokalizáció: 1...60
(xi) A szekvencia leírása: 53. számú szekvencia

```
CAA CCA ATT GAC GAC ACT GAA TCT GCT ATC AAC ACT ACT TTG
Gln Pro Ile Asp Asp Thr Glu Ser Ala Ile Asn Thr Thr Leu
  1               5                  10
GTC AAC TTG CCA GGT GCT
Val Asn Leu Pro Gly Ala
 15                  20
```

54. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 276 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS
(ix) Tulajdonság:
(A) Név/Kulcs: CDS
(B) Lokalizáció: 113...274
(xi) A szekvencia leírása: 54. számú szekvencia

```
TTAAATCTAT AACTACAAAA AACACATACA GGAATTCATT CAAGAATAGT
TCAAACAAGA AGATTACAAA CTATCAATTT CATACACAAT ATAAACGACG
GGTACCAAAA TA ATG AAA CTG AAA ACT GTA AGA TCT GCG GTC CTT
              Met Lys Leu Lys Thr Val Arg Ser Ala Val Leu
                1               5                  10
TCG TCA CTC TTT GCA TCT CAG GTC CTT GGC CAA CCA ATT GAC
Ser Ser Leu Phe Ala Ser Gln Val Leu Gly Gln Pro Ile Asp
                  15                  20
GAC GAA AAC ACT ACT TCT GTT AAC TTG CCA GCT AAG AGA TTC
Asp Glu Asn Thr Thr Ser Val Asn Leu Pro Ala Lys Arg Phe
 25                  30                  35
```

```
GTT AAC CAA CAC TTG TGC GGT TCC CAC TTG GTT GAA GCT TTG
Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu
     40                  45                  50
TAC TT
Tyr
```

55. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 54 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 55. számú szekvencia

```
Met Lys Leu Lys Thr Val Arg Ser Ala Val Leu Ser Ser Leu
 1               5                  10
Phe Ala Ser Gln Val Leu Gly Gln Pro Ile Asp Asp Glu Asn
15                  20                  25
Thr Thr Ser Val Asn Leu Pro Ala Lys Arg Phe Val Asn Gln
     30                  35                  40
His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
         45                  50
```

56. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 282 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS
(ix) Tulajdonság:
(A) Név/Kulcs: CDS
(B) Lokalizáció: 113...280
(xi) A szekvencia leírása: 54. számú szekvencia

```
TTAAATCTAT AACTACAAAA AACACATACA GGAATTCATT CAAGAATAGT
TCAAACAAGA AGATTACAAA CTATCAATTT CATACACAAT ATAAACGACG
GGTACCAAAA TA ATG AAA CTG AAA ACT GTA AGA TCT GCG GTC CTT
              Met Lys Leu Lys Thr Val Arg Ser Ala Val Leu
                1               5                  10
TCG TCA CTC TTT GCA TCT CAG GTC CTT GGC CAA CCA ATT GAC
Ser Ser Leu Phe Ala Ser Gln Val Leu Gly Gln Pro Ile Asp
            15                  20                  25
GAC ACT GAA TCT AAC ACT ACT TCT GTT AAC TTG CCA GCT AAG
Asp Thr Glu Ser Asn Thr Thr Ser Val Asn Leu Pro Ala Lys
                30                  35
AGA TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGC GGT TCC CAC TTG GTT GAA
Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu
 40                  45                  50
GCT TTG TAC TT
Ala Leu Tyr
 55
```

57. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 56 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 57. számú szekvencia

```
Met Lys Leu Lys Thr Val Arg Ser Ala Val Leu Ser Ser Leu
 1               5                  10
Phe Ala Ser Gln Val Leu Gly Gln Pro Ile Asp Asp Thr Glu
15                  25                  25
```

```
Ser Asn Thr Thr Ser Val Asn Leu Pro Ala Lys Arg Phe Val
      30                  35                  40
Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
          45                  50                  55
```

58. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 282 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS
(ix) Tulajdonság:
(A) Név/Kulcs: CDS
(B) Lokalizáció: 113...280
(xi) A szekvencia leírása: 58. számú szekvencia

```
TTAAATCTAT AACTACAAAA AACACATACA GGAATTCATT CAAGAATAGT
TCAAACAAGA AGATTACAAA CTATCAATTT CATACACAAT ATAAACGACG
GGTACCAAAA TA ATG AAA CTG AAA ACT GTA AGA TCT GCG GTC CTT
              Met Lys Leu Lys Thr Val Arg Ser Ala Val Leu
                1               5                  10
TCG TCA CTC TTT GCA TCT CAG GTC CTT GGC CAA CCA ATT GAC
Ser Ser Leu Phe Ala Ser Gln Val Leu Gly Gln Pro Ile Asp
            15                  20                  25
GAC ACT GAA TCT AAC ACT ACT TCT GTT AAC TTG ATG GCT AAG
Asp Thr Glu Ser Asn Thr Thr Ser Val Asn Leu Met Ala Lys
                30                  35
AGA TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGC GGT TCC CAC TTG GTT GAA
Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu
 40                  45                  50
GCT TTG TAC TT
Ala Leu Tyr
      55
```

59. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 56 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 59. számú szekvencia

```
Met Lys Leu Lys Thr Val Arg Ser Ala Val Leu Ser Ser Leu
  1               5                  10
Phe Ala Ser Gln Val Leu Gly Gln Pro Ile Asp Asp Thr Glu
 15                  20                  25
Ser Asn Thr Thr Ser Val Asn Leu Met Ala Lys Arg Phe Val
      30                  35                  40
Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
          45                  50                  55
```

60. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 330 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS
(ix) Tulajdonság:
(A) Név/Kulcs: CDS
(B) Lokalizáció: 113...328
(xi) A szekvencia leírása: 60. számú szekvencia

```
TTAAATCTAT AACTACAAAA AACACATACA GGAATTCATT CAAGAATAGT
TCAAACAAGA AGATTACAAA CTATCAATTT CATACACAAT ATAAACGACG
```

```
GGTACCAAAA TA ATG AAA CTG AAA ACT GTA AGA TCT GCG GTC CTT
               Met Lys Leu Lys Thr Val Arg Ser Ala Val Leu
                 1               5                  10
TCG TCA CTC TTT GCA TCT CAG GTC CTT GGC CAA CCA ATT GAC
Ser Ser Leu Phe Ala Ser Gln Val Leu Gly Gln Pro Ile Asp
            15                  20                  25
GAC ACT GAA TCT AAC ACT ACT TCT GTT AAC TTG ATG GCT GAC
Asp Thr Glu Ser Asn Thr Thr Ser Val Asn Leu Met Ala Asp
                30                  35
GAC ACT GAA TCT ATC AAC ACT ACT TTG GTT AAC TTG CCA GGT
Asp Thr Glu Ser Ile Asn Thr Thr Leu Val Asn Leu Pro Gly
 40                  45                  50
GCT AAG AGA TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGC GGT TCC CAC TTG
Ala Lys Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu
      55                  60                  65
GTT GAA GCT TTG TAC TT
Val Glu Ala Leu Tyr
 70
```

61. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 72 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 61. számú szekvencia

```
Met Lys Leu Lys Thr Val Arg Ser Ala Val Leu Ser Ser Leu
  1               5                  10
Phe Ala Ser Gln Val Leu Gly Gln Pro Ile Asp Asp Thr Glu
 15                  20                  25
Ser Asn Thr Thr Ser Val Asn Leu Met Ala Asp Asp Thr Glu
      30                  35                  40
Ser Ile Asn Thr Thr Leu Val Asn Leu Pro Gly Ala Lys Arg
          45                  50                  55
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala
              60                  65                  70
Leu Tyr
```

62. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 288 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS
(ix) Tulajdonság:
(A) Név/Kulcs: CDS
(B) Lokalizáció: 113...286
(xi) A szekvencia leírása: 62. számú szekvencia

```
TTAAATCTAT AACTACAAAA AACACATACA GGAATTCATT CAAGAATAGT
TCAAACAAGA AGATTACAAA CTATCAATTT CATACACAAT ATAAACGACG
GGTACCAAAA TA ATG AAA CTG AAA ACT GTA AGA TCT GCG GTC CTT
               Met Lys Leu Lys Thr Val Arg Ser Ala Val Leu
                 1               5                  10
TCG TCA CTC TTT GCA TCT CAG GTC CTT GGC CAA CCA ATT GAC
Ser Ser Leu Phe Ala Ser Gln Val Leu Gly Gln Pro Ile Asp
            15                  20                  25
GAC ACT GAA TCT AAC ATC ACT ACT TTG GTT AAC TTG CCA GGT
Asp Thr Glu Ser Ile Asn Thr Thr Leu Val Asn Leu Pro Gly
                30                  35
```

```
GCT AAG AGA TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGC GGT TCC CAC TTG
Ala Lys Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu
 40                  45                  50
GTT GAA GCT TTG TAC TT
Val Glu Ala Leu Tyr
      55
```

63. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 58 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 63. számú szekvencia

```
Met Lys Leu Lys Thr Val Arg Ser Ala Val Leu Ser Ser Leu
 1               5                  10
Phe Ala Ser Gln Val Leu Gly Gln Pro Ile Asp Asp Thr Glu
 15                  20                  25
Ser Ile Asn Thr Thr Leu Val Asn Leu Pro Gly Ala Lys Arg
      30                  35                  40
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala
          45                  50                  55
Leu Tyr
```

64. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 82 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS
(xi) A szekvencia leírása: 64. számú szekvencia

GGTTAACGAACTTTGGAGCTTCAGCTTCAGCTTCTTCTCTCTTAGCCATGGAGATCAAGTTAA
CAACATCCAAAGTAGTGTT

65. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 54 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS
(xi) A szekvencia leírása: 65. számú szekvencia

CAAGTACAAAGCTTCAACCAAGTGGGAACCGCACAAGTGTTGGTTAACGAACTT

66. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 117 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS
(xi) A szekvencia leírása: 66. számú szekvencia

CAACCAATTG ACGACACTGA ATCTAACACT ACTTCTGTCA ACTTGATGGC
TGACGACACT GAATCTAGAT TCGCTACTAA CACTACTTTG GATGTTGTTA
ACTTGATCTC CATGGCT

67. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 41 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid

(xi) A szekvencia leírása: 67. számú szekvencia

```
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaAspAsp
  1               5                  10                  15
ThrGluSerArgPheAlaThrAsnThrThrLeuAlaLeuAspValValAsnLeuIle
 20                  25                  30                  35
SerMetAla
```

68. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 51 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS
(xi) A szekvencia leírása: 68. számú szekvencia

```
TCTCTTAGCCATGGAGATCAAGTTAACAACATCCAAAGCCAAAGTAGTGTT
```

69. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 123 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS
(xi) A szekvencia leírása: 69. számú szekvencia

```
CAACCAATTG    ACGACACTGA    ATCTAACACT    ACTTCTGTCA    ACTTGATGGC
TGACGACACT    GAATCTAGAT    TCGCTACTAA    CACTACTTTG    GCTTTGGATG
TTGTTAACTT GATCTCCATG GCT
```

70. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 65 aminosav
(B) Típus: aminosav
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: peptid
(xi) A szekvencia leírása: 70. számú szekvencia

```
Lys Arg Glu Glu Ala Glu Ala Glu Ala Glu Pro Lys Phe Val
  1               5                  10
Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 15                  20                  25
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Phe Lys Ala
     30                  35                  40

Ala Lys Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser
         45                  50                  55
Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
             60                  65
```

71. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 219 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS
(xi) A szekvencia leírása: 71. számú szekvencia

```
AAGAGAGAAG    AAGCTGAAGC    TGAAGCTGAA    CCAAAGTTCG    TTAACCAACA
CTTGTGTGGT    TCTCACTTGG    TTGAAGCTTT    GTACTTGGTT    TGCGGTGAAA
GAGGTTTCTT    CTACACTCCT    AAGGCTGCTA    AGGGTATTGT    CGAACAATGC
TGTACCTCCA    TCTGCTCCTT    GTACCAATTG    GAAAACTACT    GCAACTAGAC
GCAGCCCGCA GGCTCTAGA
```

72. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 348 bázispár

(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS
(xi) A szekvencia leírása: 72. számú szekvencia

TTAAATCTAT AACTACAAAA AACACATACA GGAATTCCAT TCAAGAATAG
TTCAAACAAG AAGATTACAA ACTATCAATT TCATACACAA TATAAACGAC
GGTACCAAAA TAATGAAACT GAAAACTGTA AGATCTGCGG TCCTTTCGTC
ACTCTTTGCA TCTCAGGTCC TTGGCCAACC AATTGACGAC ACTGAATCTA
ACACTACTTC TGTCAACTTG ATGGCTGACG ACACTGAATC TAGATTCGCT
ACTAACACTA CTTTGGTTAA CTTGGCTAAC GTTGCCAACC AACACTTGTG
TGGTTCTCAC TTGGTTGAAG CTTTGTACTT ATGGCTAAGA GATTCGTT

73. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 379 bázispár
(B) Típus: nukleinsav
(C) Száltípus: egyszálú
(D) Topológia: lineáris
(ii) A molekula típusa: cDNS
(xi) A szekvencia leírása: 73. számú szekvencia

TTAAATCTAT AACTACAAAA AACACATACA GGAATTCCAT TCAAGAATAG
TTCAAACAAG AAGATTACAA ACTATCAATT TCATACACAA TATAAACGAC
GGTACCAAAA TAATGAAACT GAAAACTGTA AGATCTGCGG TCCTTTCGTC
ACTCTTTGCA TCTCAGGTCC TTGGCCAACC AATTGACGAC ACTGAATCTA
ACACTACTTC TGTCAACTTG ATGGCTGACG ACACTGAATC TAGATTCGCT
ACTAACACTA CTTTGGATGT TGTTAACTTG ATCTCCATGG CTAAGAGAGA
AGAAGCTGAA GCTGAAGCTG AACCAAAGTT CGTTAACCAA CACTTGTGTG
GTTCTCACTT GGTTGAAGCT TTGTACTTG

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. DNS-expressziós kazetta, amely az alábbi szekvenciát tartalmazza:

5'–P–SP–LS–PS–*gén*–$(T)_i$–3'

amelyben
P jelentése promoterszekvencia,
SP jelentése egy szignálpeptidet kódoló DNS-szekvencia,
LS jelentése egy (I) általános képletű vezérpeptidet kódoló DNS-szekvencia:

GlnProIle(Asp)/Glu)(Asp/Glu)X^1(Glu)/Asp)X^2AsnZ(Thr/Ser)X^3,

amelyben
X^1 jelentése peptidkötés vagy kódolható aminosav;
X^2 jelentése peptidkötés, egy kódolható aminosav vagy egy maximum 4 kódolható aminosavat tartalmazó szekvencia, amely aminosavak lehetnek azonosak vagy eltérőek;
Z jelentése egy kódolható aminosav, Pro kivételével; és
X^3 jelentése egy 4–30 kódolható aminosavat tartalmazó szekvencia, amely aminosavak lehetnek azonosak vagy eltérőek;
PS jelentése egy processzálási helyet kódoló DNS-szekvencia;
gén jelentése egy polipeptidet kódoló DNS-szekvencia;
T jelentése terminátorszekvencia; és
i értéke 0 vagy 1.

2. Az 1. igénypont szerinti expressziós kazetta, amelyben az (I) általános képletben X^1 jelentése Ser, Thr vagy Ala.

3. Az 1. igénypont szerinti expressziós kazetta, amelyben az (I) általános képletben X^2 jelentése Ser, Thr vagy Ala.

4. Az 1. igénypont szerinti expressziós kazetta, amelyben az (I) általános képletben X^2 jelentése SerIle.

5. Az 1. igénypont szerinti expressziós kazetta, amelyben az (I) általános képletben X^2 jelentése SerAlaIle.

6. Az 1. igénypont szerinti expressziós kazetta, amelyben az (I) általános képletben X^2 jelentése SerPheAlaThr.

7. Az 1. igénypont szerinti expressziós kazetta, amelyben az (I) általános képletben X^3 jelentése a (II) általános képletű X^4–X^5–X^6 aminosavszekvencia, amelyben
X^4 jelentése 1–21 kódolható aminosavból álló szekvencia,
X^5 jelentése Pro vagy a ValAsnLeu, LeuAlaAsn ValAlaMetAla, LeuAspValValAsnLeuProGly vagy LeuAspValValAsnLeuIleSerMet szekvenciák közül az egyik,
X^6 jelentése 1–8 kódolható aminosavból álló szekvencia.

8. A 7. igénypont szerinti expressziós kazetta, amelyben a (II) általános képletben X^4 jelentése a Leu ValAsnLeu, SerValAsnLeu, MetAlaAsp, ThrGluSer, ArgPheAlaThr vagy ValAlaMetAla szekvenciák közül az egyik.

9. A 7. igénypont szerinti expressziós kazetta, amelyben a (II) általános képletben X^4 jelentése az Asn SerThr vagy AsnThrThr szekvenciák közül az egyik.

10. A 7. igénypont szerinti expressziós kazetta, amelyben a (II) általános képletben X^4 jelentése a (Ser/Leu)ValAsnLeu,
(Ser/Leu)ValAsnLeuMetAlaAsp,
(Ser/Leu)ValAsnLeuMetAlaAspAsp,
(Ser/Leu)ValAsnLeuMetAlaAspAspThrGluSer,
(Ser/Leu)ValAsnLeuMetAlaAspAspThrGluSerIle vagy
(Ser/Leu)ValAsnLeuMetAlaAspAspThrGluSerArgPhe AlaThr
szekvenciák közül az egyik.

11. A 7. igénypont szerinti expressziós kazetta, amelyben a (II) általános képletben X^4 jelentése az Asn(Thr/Ser)ThrLeu,
Asn(Thr/Ser)ThrLeuAsnLeu vagy
Asn(Thr/Ser)ThrLeuValAsnLeu szekvenciák közül az egyik.

12. A 7. igénypont szerinti expressziós kazetta, amelyben a (II) általános képletben X^5 jelentése Pro.

13. A 7. igénypont szerinti expressziós kazetta, amelyben a (II) általános képletben X^5 jelentése a ValAsnLeu szekvencia.

14. A 7. igénypont szerinti expressziós kazetta, amelyben a (II) általános képletben X^5 jelentése a LeuAlaAsnValAlaMetAla szekvencia.

15. A 7. igénypont szerinti expressziós kazetta, amelyben a (II) általános képletben X^5 jelentése a LeuAspValValAsnLeuProGly szekvencia.

16. A 7. igénypont szerinti expressziós kazetta, amelyben a (II) általános képletben X^5 jelentése a LeuAspValValAsnLeuIleSerMet szekvencia.

17. A 7. igénypont szerinti expressziós kazetta, amelyben a (II) általános képletben X^6 jelentése Ala, Gly, Leu, Thr, Val vagy Ser.

18. A 7. igénypont szerinti expressziós kazetta, amelyben a (II) általános képletben X^6 jelentése GlyAla vagy SerAla.

19. A 7. igénypont szerinti expressziós kazetta, amelyben a (II) általános képletben X^6 jelentése AlaValAla.

20. A 7. igénypont szerinti expressziós kazetta, amelyben a (II) általános képletben X^6 jelentése GlyAlaAspSerLysThrValGlu.

21. Az 1. igénypont szerinti expressziós kazetta, amelyben az LS DNS-szekvencia által kódolt vezérpeptidet az alábbi csoportból választjuk:

1. számú szekvencia:
GlnProIleAspGluAspAsnAspThrSerValAsnLeuProAla;
2. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspGluAsnThrThrSerValAsnLeuProAla;
3. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuProAla;
4. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspGluAsnThrThrSerValAsnLeuProVal;
5. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluAsnThrThrSerValAsnLeuProAla;
6. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuProAla;
7. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspGluAsnThrThrSerValAsnLeuMetAla;
8. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuProGlyAla;
9. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAla;
10. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnValProThr;
11. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrLeuValAsnValProThr;
12. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuProThr;
13. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrLeuValAsnValProGlyAla;
14. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaProAlaValAla;
15. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAspLeuAlaValGlyLeuProGlyAla;
16. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaAspAspThrGlu
SerIleAsnThrThrLeuValAsnLeuProGlyAla;
17. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerIleAsnThrThrLeuValAsnLeuProGlyAla;

18. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrLeuValAsnLeuProGlyAla;
19. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaAspAspThrGlu
SerArgPheAlaThrAsnThrThrLeuValAsnLeuProLeu;
20. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaAspAspThrGlu
SerIleAsnThrThrLeuValAsnLeuAlaAsnValAlaMetAla;
21. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAlaIleAsnThrThrLeuValAsnLeuProGlyAla;
22. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerPheAlaThrAsnThrThrLeuValAsnLeuProGlyAla;
23. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerIleAsnThrTheLeuValAsnLeuMetAlaAspAspThr
GluSerArgPheAlaThrAsnThr ThrLeuValAsnLeuProLeu;
24. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerIleAsnThrTheLeuValAsnLeuMetAlaAspAspThr
GluSerArgPheAlaThrAsnThrThrLeuAspValValAsnLeuGlyAla;
25. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerPheAlaAlaIleAsnThrThrLeuValAsnLeuProGlyAla;
26. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaAspAspThrGlu
SerArgPheAlaThrAsnThrThr LeuValAsnLeuAlaAsnValAlaMetAla;
27. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaAspAspThrGlu
SerArgPheAlaThrAsnThrThrLeuAspValValAsnLeuIleSerMetAla;
28. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaAsnThrThrGlu
SerArgPheAlaThrAsnThrThr LeuAspValValAsnLeuIleSerMetAla;
67. számú szekvencia:
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaAspAspThrGlu
SerArgPheAlaThrAsnThrThrLeuAlaLeuAspValValAsnLeuIleSerMetAla.

22. Az 1. igénypont szerinti expressziós kazetta, amelyben SP egy DNS-szekvencia, amely az α-faktor szignálpeptidjét, az egérnyálmirigy amiláz szignálpeptidjét, a karboxipeptidáz szignálpeptidjét, az élesztő aszparagin proteáz 3 szignálpeptidjét vagy az élesztő BAR1 szignálpeptidjét kódolja.

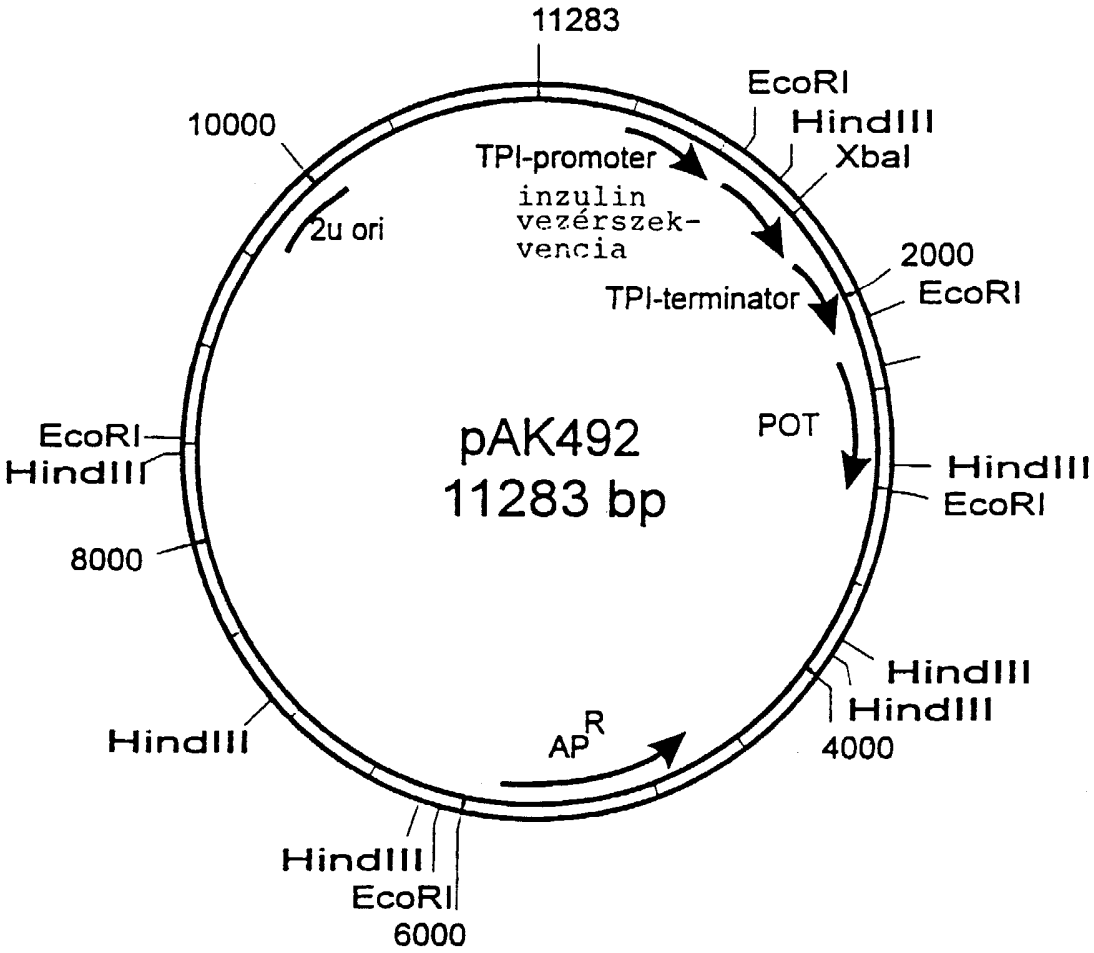
23. Az 1. igénypont szerinti expressziós kazetta, amelyben SP egy DNS-szekvencia, amely a LysArg, ArgLys, ArgArg, LysLys vagy Ile-GluGlyArg peptidet kódolja.

24. Az 1. igénypont szerinti expressziós kazetta, amelyben SP egy DNS-szekvencia, amelyben a polipeptidet az alábbi csoportból választjuk: aprotinin, szöveti faktor bioszintézis inhibitor, vagy egyéb proteázinhibitorok, inzulin vagy inzulinprekurzorok, inzulinszerű I-es növekedési faktor, inzulinszerű II-es növekedési faktor, humán- vagy szarvasmarha-növekedési hormon, interleukin, glukagon, glukagonszerű I-es peptid, szöveti plazminogén aktivátor, α és β transzformáló növekedési faktor, vérlemezke-eredetű növekedési faktor, enzimek vagy azok funkcionális analógjai.

25. Élesztő-expressziósvektor, amely az előző igénypontok bármelyike szerinti expressziós kazettát tartalmaz.

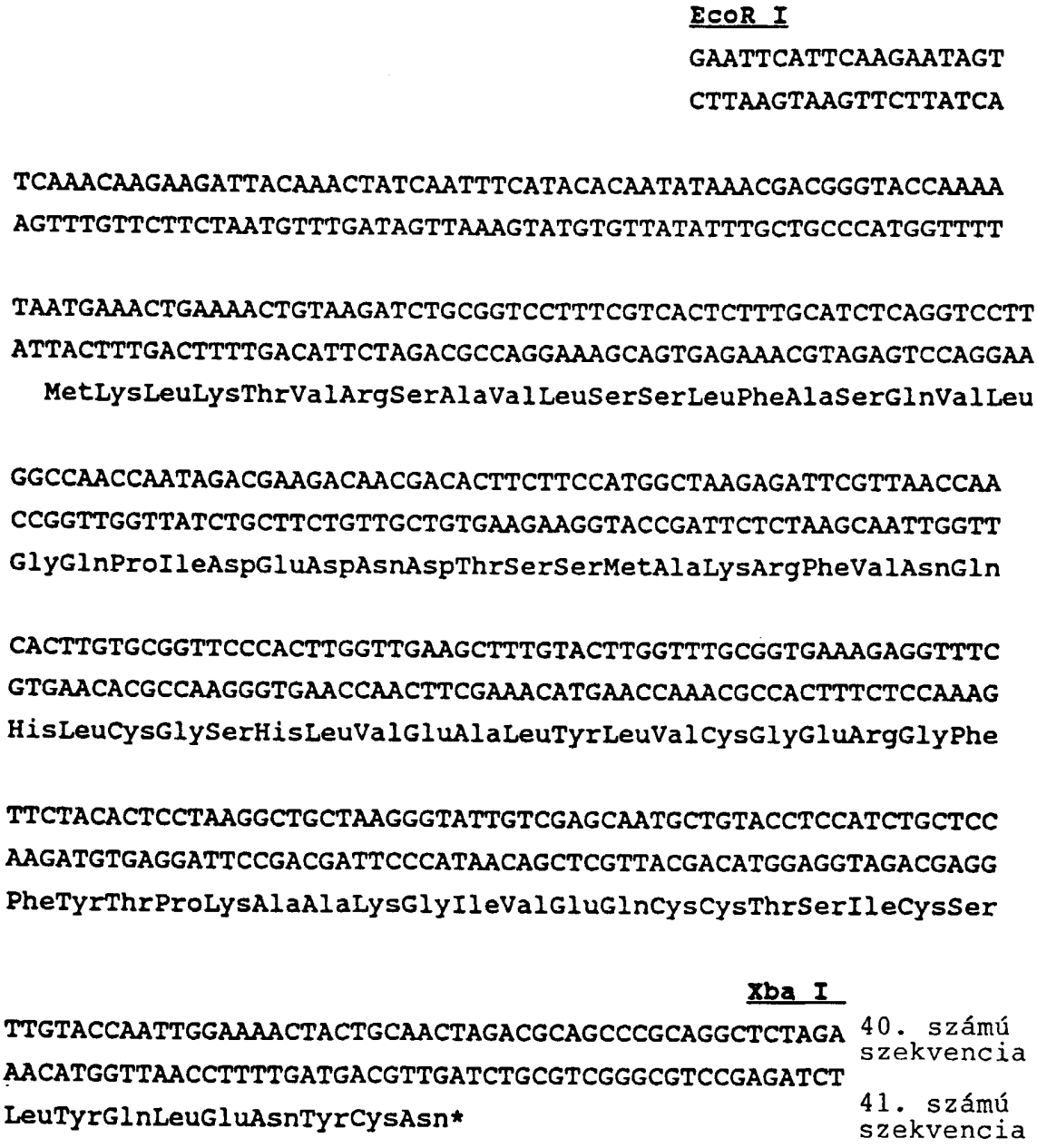
26. Élesztősejt, amely képes polipeptid expressziójára, és amelyet a 25. igénypont szerinti élesztő-expressziósvektorral transzformáltunk.

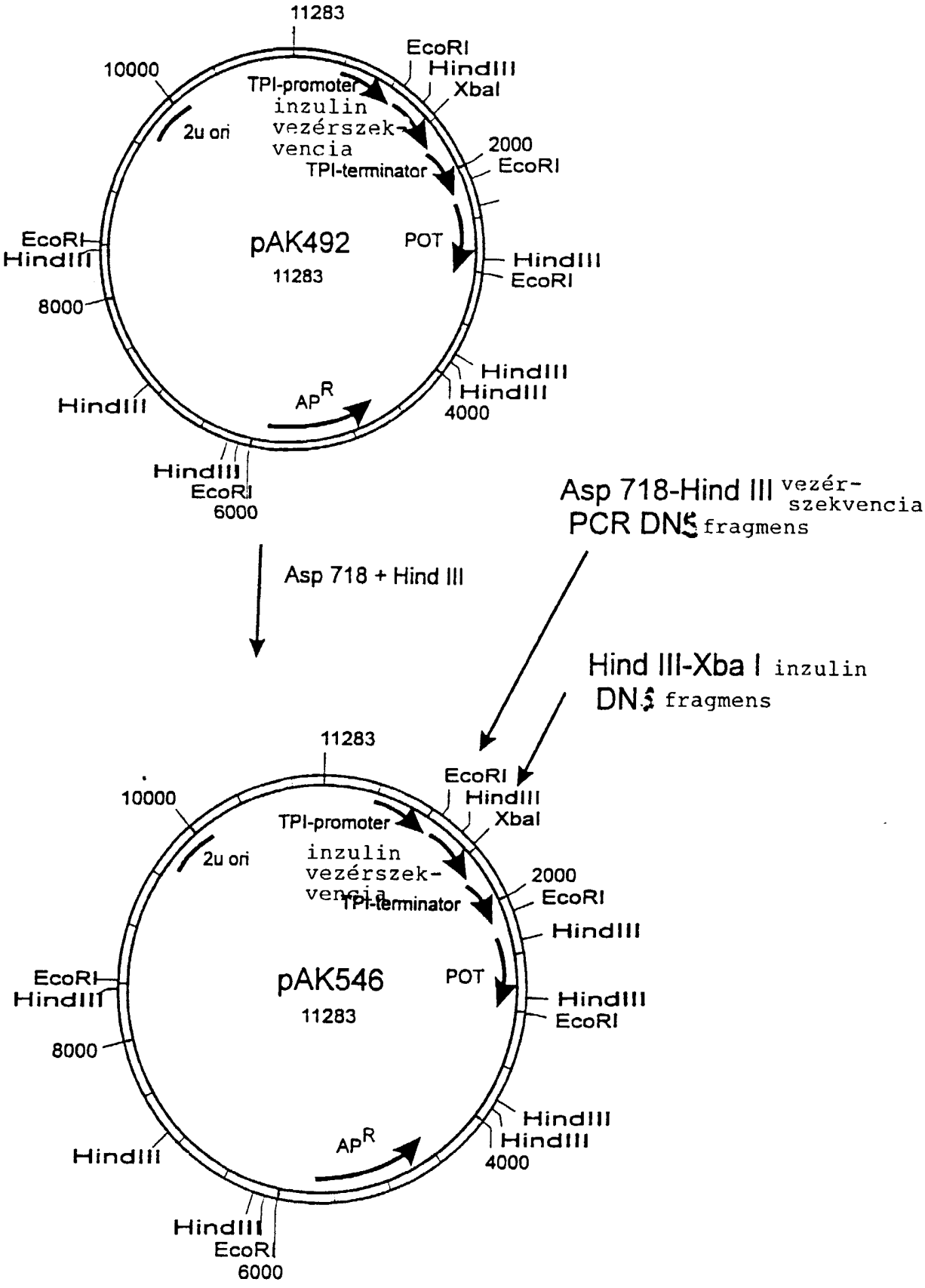
27. Eljárás polipeptid előállítására élesztőben, *azzal jellemezve,* hogy egy olyan élesztősejtet tenyésztünk megfelelő táptalajban, amely képes a kívánt polipeptid expressziójára, és amelyet a 25. igénypont szerinti élesztő-expressziósvektorral transzformáltunk, hogy a polipeptid expresszióját és szekrécióját elérjük, majd a polipeptidet kinyerjük a táptalajból.


11283
EcoRI
HindIII
XbaI
10000
TPI-promoter
inzulin
vezérszek-
vencia
2u ori
2000
EcoRI
TPI-terminator
pAK492
11283 bp
POT
EcoRI
HindIII
HindIII
EcoRI
8000
HindIII
HindIII
AP R
4000
HindIII
HindIII
EcoRI
6000

1. ábra

2. ábra


EcoR I
GAATTCATTCAAGAATAGT
CTTAAGTAAGTTCTTATCA
TCAAACAAGAAGATTACAAACTATCAATTTCATACACAATATAAACGACGGGTACCAAAA
AGTTTGTTCTTCTAATGTTTGATAGTTAAAGTATGTGTTATATTTGCTGCCCATGGTTTT
TAATGAAACTGAAAACTGTAAGATCTGCGGTCCTTTCGTCACTCTTTGCATCTCAGGTCCTT
ATTACTTTGACTTTTGACATTCTAGACGCCAGGAAAGCAGTGAGAAACGTAGAGTCCAGGAA
MetLysLeuLysThrValArgSerAlaValLeuSerSerLeuPheAlaSerGlnValLeu
GGCCAACCAATAGACGAAGACAACGACACTTCTTCCATGGCTAAGAGATTCGTTAACCAA
CCGGTTGGTTATCTGCTTCTGTTGCTGTGAAGAAGGTACCGATTCTCTAAGCAATTGGTT
GlyGlnProIleAspGluAspAsnAspThrSerSerMetAlaLysArgPheValAsnGln
CACTTGTGCGGTTCCCACTTGGTTGAAGCTTTGTACTTGGTTTGCGGTGAAAGAGGTTTC
GTGAACACGCCAAGGGTGAACCAACTTCGAAACATGAACCAAACGCCACTTTCTCCAAAG
HisLeuCysGlySerHisLeuValGluAlaLeuTyrLeuValCysGlyGluArgGlyPhe
TTCTACACTCCTAAGGCTGCTAAGGGTATTGTCGAGCAATGCTGTACCTCCATCTGCTCC
AAGATGTGAGGATTCCGACGATTCCCATAACAGCTCGTTACGACATGGAGGTAGACGAGG
PheTyrThrProLysAlaAlaLysGlyIleValGluGlnCysCysThrSerIleCysSer
Xba I
TTGTACCAATTGGAAAACTACTGCAACTAGACGCAGCCCGCAGGCTCTAGA
AACATGGTTAACCTTTTGATGACGTTGATCTGCGTCGGGCGTCCGAGATCT
LeuTyrGlnLeuGluAsnTyrCysAsn*
40. számú szekvencia
41. számú szekvencia


11283
EcoRI
HindIII
XbaI
10000
TPI-promoter
inzulin
vezérszek-
vencia
2u ori
2000
EcoRI
TPI-terminator
EcoRI
HindIII
pAK492
POT
11283
HindIII
EcoRI
8000
HindIII
HindIII
AP^R
4000
HindIII
HindIII
EcoRI
6000
Asp 718-Hind III vezér-
szekvencia
PCR DNS fragmens
Asp 718 + Hind III
Hind III-Xba I inzulin
DNS fragmens
11283
EcoRI
HindIII
10000
TPI-promoter
XbaI
2u ori
inzulin
vezérszek-
vencia
2000
EcoRI
TPI-terminator
HindIII
EcoRI
HindIII
pAK546
POT
11283
HindIII
EcoRI
8000
HindIII
HindIII
AP^R
4000
HindIII
HindIII
EcoRI
6000

3. ábra

4. ábra

```
CAACCAATTGACGACGAAAACACTACTTCTGTCAACTTGCCAGTT
GTTGGTTAACTGCTGCTTTTGTGATGAAGACAGTTGAACGGTCAA
GlnProIleAspAspGluAsnThrThrSerValAsnLeuProVal
```

42. számú szekvencia

43. számú szekvencia

5. ábra

```
ATGAAACTGAAAACTGTAAGATCTGCGGTCCTTTCGTCACTCTTTGCA
TACTTTGACTTTTGACATTCTAGACGCCAGGAAAGCAGTGAGAAACGT
MetLysLeuLysThrValArgSerAlaValLeuSerSerLeuPheAla

TCTCAGGTCCTTGGCCAACCAATTGACGACGAAAACACTACTTCTGTC
AGAGTCCAGGAACCGGTTGGTTAACTGCTGCTTTTGTGATGAAGACAG
SerGlnValLeuGlyGlnProIleAspAspGluAsnThrThrSerVal

AACTTGCCAGTTAAGAGATTCGTTAACCAACACTTGTGTGGTTCTCAC
TTGAACGGTCAATTCTCTAAGCAATTGGTTGTGAACACACCAAGAGTG
AsnLeuProValLysArgPheValAsnGlnHisLeuCysGlySerHis

TTGGTTGAAGCTTTGTACTTGGTTTGCGGTGAAAGAGGTTTCTTCTAC
AACCAACTTCGAAACATGAACCAAACGCCACTTTCTCCAAAGAAGATG
LeuValGluAlaLeuTyrLeuValCysGlyGluArgGlyPhePheTyr

ACTCCTAAGGCTGCTAAGGGTATTGTCGAACAATGCTGTACCTCCATC
TGAGGATTCCGACGATTCCCATAACAGCTTGTTACGACATGGAGGTAG
ThrProLysAlaAlaLysGlyIleValGluGlnCysCysThrSerIle

TGCTCCTTGTACCAATTGGAAAACTACTGCAACTAGACGCAGCCCGCA
ACGAGGAACATGGTTAACCTTTTGATGACGTTGATCTGCGTCGGGCGT
CysSerLeuTyrGlnLeuGluAsnTyrCysAsn*
```

45. számú szekvencia

```
GGCTCTAGA
CCGAGATCT
```

46. számú szekvencia

6. ábra

CAACCAATTGACGACACTGAATCTAACACTACTTCTGTCAACTTGCCAGCT 46. számú szekvencia
GTTGGTTAACTGCTGTGACTTAGATTGTGATGAAGACAGTTGAACGGTCGA
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuProAla 47. számú szekvencia

7. ábra

CAACCAATTGACGACACTGAATCTAACACTACTTCTGTCAACTTGCCA
GTTGGTTAACTGCTGTGACTTAGATTGTGATGAAGACAGTTGAACGGT
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuPro

GGTGCT 48. számú szekvencia
CCACGA
GlyAla 8. számú szekvencia

8. ábra

CAACCAATTGACGACACTGAATCTATCAACACTACTTTGGTCAACTTG
GTTGGTTAACTGCTGTGACTTAGATAGTTGTGATGAAACCAGTTGAAC
GlnProIleAspAspThrGluSerIleAsnThrThrLeuValAsnLeu

CCAGGTGCT 49. számú szekvencia
GGTCCACGA
ProGlyAla 17. számú szekvencia

9. ábra

CAACCAATTGACGACACTGAATCTAACACTACTTCTGTCAACTTGATG
GTTGGTTAACTGCTGTGACTTAGATTGTGATGAAGACAGTTGAACTAC
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMet

GCTGACGACACTGAATCTATCAACACTACTTTGGTTAACTTGCCAGGTGCT 50. számú szekvencia
CGACTGCTGTGACTTAGATAGTTGTGATGAAACCAATTGAACGGTCCACGA
AlaAspAspThrGluSerIleAsnThrThrLeuValAsnLeuProGlyAla 16. számú szekvencia

10. ábra

```
CAACCAATTGACGACACTGAATCTAACACTACTTCTGTCAACTTGATGGCTGACGACACT
GTTGGTTAACTGCTGTGACTTAGATTGTGATGAAGACAGTTGAACTACCGACTGCTGTGA
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaAspAspThr

GAATCTAGATTCGCTACTAACACTACTTTGGTTAACTTGCCATTG        51. számú szekvencia
CTTAGATCTAAGCGATGATTGTGATGAAACCAATTGAACGGTAAC
GluSerArgPheAlaThrAsnThrThrLeuValAsnLeuProLeu        19. számú szekvencia
```

11. ábra

```
CAACCAATTGACGACACTGAATCTAACACTACTTCTGTCAACTTGATGGCTGACGACACT
GTTGGTTAACTGCTGTGACTTAGATTGTGATGAAGACAGTTGAACTACCGACTGCTGTGA
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaAspAspThr

GAATCTATCAACACTACTTTGGTTAACTTGGCTAACGTTGCCATGGCT     52. számú szekvencia
CTTAGATAGTTGTGATGAAACCAATTGAACCGATTGCAACGGTACCGA
GluSerIleAsnThrThrLeuValAsnLeuAlaAsnValAlaMetAla     20. számú szekvencia
```

12. ábra

```
CAACCAATTGACGACACTGAATCTGCTATCAACACTACTTTGGTCAAC
GTTGGTTAACTGCTGTGACTTAGACGATAGTTGTGATGAAACCAGTTG
GlnProIleAspAspThrGluSerAlaIleAsnThrThrLeuValAsn

TTGCCAGGTGCT                                         53. számú szekvencia
AACGGTCCACGA
LeuProGlyAla                                         21. számú szekvencia
```

13. ábra

pAK527:

```
TTAAATCTATAACTACAAAAAACACATACAGGAATTCATTCAAGAATAGTTCAAACAA
AATTTAGATATTGATGTTTTTTGTGTATGTCCTTAAGTAAGTTCTTATCAAGTTTGTT
```

```
GAAGATTACAAACTATCAATTTCATACACAATATAAACGACGGGTACCAAAATAATGAAA
CTTCTAATGTTTGATAGTTAAAGTATGTGTTATATTTGCTGCCCATGGTTTTATTACTTT
                                                        MetLys

CTGAAAACTGTAAGATCTGCGGTCCTTTCGTCACTCTTTGCATCTCAGGTCCTTGGCCAA
GACTTTTGACATTCTAGACGCCAGGAAAGCAGTGAGAAACGTAGAGTCCAGGAACCGGTT
LeuLysThrValArgSerAlaValLeuSerSerLeuPheAlaSerGlnValLeuGlyGln

CCAATTGACGACGAAAACACTACTTCTGTTAACTTGCCAGCTAAGAGATTCGTTAACCAA
GGTTAACTGCTGCTTTTGTGATGAAGACAATTGAACGGTCGATTCTCTAAGCAATTGGTT
ProIleAspAspGluAsnThrThrSerValAsnLeuProAlaLysArgPheValAsnGln

CACTTGTGCGGTTCCCACTTGGTTGAAGCTTTGTACTT      54. számú szekvencia
GTGAACACGCCAAGGGTGAACCAACTTCGAAACATGAA
HisLeuCysGlySerHisLeuValGluAlaLeuTyr        55. számú szekvencia
```

14. ábra

pAK531:

```
  TTAAATCTATAACTACAAAAAACACATACAGGAATTCATTCAAGAATAGTTCAAACAA
  AATTTAGATATTGATGTTTTTTTGTGTATGTCCTTAAGTAAGTTCTTATCAAGTTTGTT

GAAGATTACAAACTATCAATTTCATACACAATATAAACGACGGGTACCAAAATAATGAAA
CTTCTAATGTTTGATAGTTAAAGTATGTGTTATATTTGCTGCCCATGGTTTTATTACTTT
                                                        MetLys

CTGAAAACTGTAAGATCTGCGGTCCTTTCGTCACTCTTTGCATCTCAGGTCCTTGGCCAA
GACTTTTGACATTCTAGACGCCAGGAAAGCAGTGAGAAACGTAGAGTCCAGGAACCGGTT
LeuLysThrValArgSerAlaValLeuSerSerLeuPheAlaSerGlnValLeuGlyGln

CCAATTGACGACACTGAATCTAACACTACTTCTGTCAACTTGCCAGCTAAGAGATTCGTT
GGTTAACTGCTGTGACTTAGATTGTGATGAAGACAGTTGAACGGTCGATTCTCTAAGCAA
ProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuProAlaLysArgPheVal
```

AACCAACACTTGTGCGGTTCCCACTTGGTTGAAGCTTTGTACTT 56. számú szekvencia
TTGGTTGTGAACACGCCAAGGGTGAACCAACTTCGAAACATGAA
AsnGlnHisLeuCysGlySerHisLeuValGluAlaLeuTyr 57. számú szekvencia

15. ábra

pAK555

TTAAATCTATAACTACAAAAAACACATACAGGAATTCATTCAAGAATAGTTCAAACAA
AATTTAGATATTGATGTTTTTTGTGTATGTCCTTAAGTAAGTTCTTATCAAGTTTGTT

GAAGATTACAAACTATCAATTTCATACACAATATAAACGACGGGTACCAAAATAATGAAA
CTTCTAATGTTTGATAGTTAAAGTATGTGTTATATTTGCTGCCCATGGTTTTATTACTTT
MetLys

CTGAAAACTGTAAGATCTGCGGTCCTTTCGTCACTCTTTGCATCTCAGGTCCTTGGCCAA
GACTTTTGACATTCTAGACGCCAGGAAAGCAGTGAGAAACGTAGAGTCCAGGAACCGGTT
LeuLysThrValArgSerAlaValLeuSerSerLeuPheAlaSerGlnValLeuGlyGln

CCAATTGACGACACTGAATCTAACACTACTTCTGTCAACTTGATGGCTAAGAGATTCGTT
GGTTAACTGCTGTGACTTAGATTGTGATGAAGACAGTTGAACTACCGATTCTCTAAGCAA
ProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaLysArgPheVal

AACCAACACTTGTGCGGTTCCCACTTGGTTGAAGCTTTGTACTT 58. számú szekvencia
TTGGTTGTGAACACGCCAAGGGTGAACCAACTTCGAAACATGAA
AsnGlnHisLeuCysGlySerHisLeuValGluAlaLeuTyr 59. számú szekvencia

16. ábra

pAK559:

TTAAATCTATAACTACAAAAAACACATACAGGAATTCATTCAAGAATAGTTCAAACAA
AATTTAGATATTGATGTTTTTTGTGTATGTCCTTAAGTAAGTTCTTATCAAGTTTGTT

GAAGATTACAAACTATCAATTTCATACACAATATAAACGACGGGTACCAAAATAATGAAA
CTTCTAATGTTTGATAGTTAAAGTATGTGTTATATTTGCTGCCCATGGTTTTATTACTTT
MetLys

```
CTGAAAACTGTAAGATCTGCGGTCCTTTCGTCACTCTTTGCATCTCAGGTCCTTGGCCAA
GACTTTTGACATTCTAGACGCCAGGAAAGCAGTGAGAAACGTAGAGTCCAGGAACCGGTT
LeuLysThrValArgSerAlaValLeuSerSerLeuPheAlaSerGlnValLeuGlyGln

CCAATTGACGACACTGAATCTAACACTACTTCTGTCAACTTGATGGCTGACGACACTGAA
GGTTAACTGCTGTGACTTAGATTGTGATGAAGACAGTTGAACTACCGACTGCTGTGACTT
ProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaAspAspThrGlu

TCTATCAACACTACTTTGGTTAACTTGCCAGGTGCTAAGAGATTCGTTAACCAACACTTG
AGATAGTTGTGATGAAACCAATTGAACGGTCCACGATTCTCTAAGCAATTGGTTGTGAAC
SerIleAsnThrThrLeuValAsnLeuProGlyAlaLysArgPheValAsnGlnHisLeu

TGCGGTTCCCACTTGGTTGAAGCTTTGTACTT        60. számú szekvencia
ACGCCAAGGGTGAACCAACTTCGAAACATGAA
CysGlySerHisLeuValGluAlaLeuTyr          61. számú szekvencia
```

17. ábra

pAK562:

```
  TTAAATCTATAACTACAAAAAACACATACAGGAATTCATTCAAGAATAGTTCAAACAA
  AATTTAGATATTGATGTTTTTTGTGTATGTCCTTAAGTAAGTTCTTATCAAGTTTGTT

GAAGATTACAAACTATCAATTTCATACACAATATAAACGACGGGTACCAAAATAATGAAA
CTTCTAATGTTTGATAGTTAAAGTATGTGTTATATTTGCTGCCCATGGTTTTATTACTTT
                                                        MetLys

CTGAAAACTGTAAGATCTGCGGTCCTTTCGTCACTCTTTGCATCTCAGGTCCTTGGCCAA
GACTTTTGACATTCTAGACGCCAGGAAAGCAGTGAGAAACGTAGAGTCCAGGAACCGGTT
LeuLysThrValArgSerAlaValLeuSerSerLeuPheAlaSerGlnValLeuGlyGln

CCAATTGACGACACTGAATCTATCAACACTACTTTGGTCAACTTGCCAGGTGCTAAGAGA
GGTTAACTGCTGTGACTTAGATAGTTGTGATGAAACCAGTTGAACGGTCCACGATTCTCT
ProIleAspAspThrGluSerIleAsnThrThrLeuValAsnLeuProGlyAlaLysArg
```

TTCGTTAACCAACACTTGTGCGGTTCCCACTTGGTTGAAGCTTTGTACTT 62. számú szekvencia
AAGCAATTGGTTGTGAACACGCCAAGGGTGAACCAACTTCGAAACATGAA
PheValAsnGlnHisLeuCysGlySerHisLeuValGluAlaLeuTyr 63. számú szekvencia

18. ábra

CAACCAATTGACGACACTGAATCTAACACTACTTCTGTCAACTTGATG
GTTGGTTAACTGCTGTGACTTAGATTGTGATGAAGACAGTTGAACTAC
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMet

GCTGACGACACTGAATCTAGATTCGCTACTAACACTACTTTGGATGTT
CGACTGCTGTGACTTAGATCTAAGCGATGATTGTGATGAAACCTACAA
AlaAspAspThrGluSerArgPheAlaThrAsnThrThrLeuAspVal

GTTAACTTGATCTCCATGGCT 66. számú szekvencia
CAATTGAACTAGAGGTACCGA
ValAsnLeuIleSerMetAla 27. számú szekvencia

19. ábra

AAGAGAGAAGAAGCTGAAGCTGAAGCTGAACCAAAGTTCGTTAACCAA
TTCTCTCTTCTTCGACTTCGACTTCGACTTGGTTTCAAGCAATTGGTT
LysArgGluGluAlaGluAlaGluAlaGluProLysPheValAsnGln

CACTTGTGTGGTTCTCACTTGGTTGAAGCTTTGTACTTGGTTTGCGGT
GTGAACACACCAAGAGTGAACCAACTTCGAAACATGAACCAAACGCCA
HisLeuCysGlySerHisLeuValGluAlaLeuTyrLeuValCysGly

GAAAGAGGTTTCTTCTACACTCCTAAGGCTGCTAAGGGTATTGTCGAA
CTTTCTCCAAAGAAGATGTGAGGATTCCGACGATTCCCATAACAGCTT
GluArgGlyPhePheTyrThrProLysAlaAlaLysGlyIleValGlu

CAATGCTGTACCTCCATCTGCTCCTTGTACCAATTGGAAAACTACTGC
GTTACGACATGGAGGTAGACGAGGAACATGGTTAACCTTTTGATGACG
GlnCysCysThrSerIleCysSerLeuTyrGlnLeuGluAsnTyrCys

Xba I

AACTAGACGCAGCCCGCAGGCTCTAGA — 71. számú szekvencia
TTGATCTGCGTCGGGCGTCCGAGATCT
Asn*** — 70. számú szekvencia

20. ábra

CAACCAATTGACGACACTGAATCTAACACTACTTCTGTCAACTTGATG
GTTGGTTAACTGCTGTGACTTAGATTGTGATGAAGACAGTTGAACTAC
GlnProIleAspAspThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMet

GCTGACGACACTGAATCTAGATTCGCTACTAACACTACTTTGGCTTTG
CGACTGCTGTGACTTAGATCTAAGCGATGATTGTGATGAAACCGAAAC
AlaAspAspThrGluSerArgPheAlaThrAsnThrThrLeuAlaLeu

GATGTTGTTAACTTGATCTCCATGGCT — 69. számú szekvencia
CTACAACAATTGAACTAGAGGTACCGA
AspValValAsnLeuIleSerMetAla — 67. számú szekvencia

21. ábra

pAK614

TTAAATCTATAACTACAAAAAACACATACAGGAATTCCATTCAAGA
AATTTAGATATTGATGTTTTTTGTGTATGTCCTTAAGGTAAGTTCT

ATAGTTCAAACAAGAAGATTACAAACTATCAATTTCATACACAATATA
TATCAAGTTTGTTCTTCTAATGTTTGATAGTTAAAGTATGTGTTATAT

AACGACGGTACCAAAATAATGAAACTGAAAACTGTAAGATCTGCGGTC
TTGCTGCCATGGTTTTATTACTTTGACTTTTGACATTCTAGACGCCAG
MetLysLeuLysThrValArgSerAlaVal

CTTTCGTCACTCTTTGCATCTCAGGTCCTTGGCCAACCAATTGACGAC
GAAAGCAGTGAGAAACGTAGAGTCCAGGAACCGGTTGGTTAACTGCTG
LeuSerSerLeuPheAlaSerGlnValLeuGlyGlnProIleAspAsp

```
ACTGAATCTAACACTACTTCTGTCAACTTGATGGCTGACGACACTGAA
TGACTTAGATTGTGATGAAGACAGTTGAACTACCGACTGCTGTGACTT
ThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaAspAspThrGlu

TCTAGATTCGCTACTAACACTACTTTGGTTAACTTGGCTAACGTTGCC
AGATCTAAGCGATGATTGTGATGAAACCAATTGAACCGATTGCAACGG
SerArgPheAlaThrAsnThrThrLeuValAsnLeuAlaAsnValAla

AACCAACACTTGTGTGGTTCTCACTTGGTTGAAGCTTTGTACTTATGG
TACCGATTCTCTAAGCAATTGGTTGTGAACACACCAAGAGTGAACCAA
MetAlaLysArgPheValAsnGlnHisLeuCysGlySerHisLeuVal

CTAAGAGATTCGTT                                    72. számú szekvencia
CTTCGAAACATGAA
GluAlaLeuTyr
```

22. ábra

```
pAK625
  TTAAATCTATAACTACAAAAAACACATACAGGAATTCCATTCAAGA
  AATTTAGATATTGATGTTTTTTGTGTATGTCCTTAAGGTAAGTTCT

ATAGTTCAAACAAGAAGATTACAAACTATCAATTTCATACACAATATA
TATCAAGTTTGTTCTTCTAATGTTTGATAGTTAAAGTATGTGTTATAT

AACGACGGTACCAAAATAATGAAACTGAAAACTGTAAGATCTGCGGTC
TTGCTGCCATGGTTTTATTACTTTGACTTTTGACATTCTAGACGCCAG
                    MetLysLeuLysThrValArgSerAlaVal

CTTTCGTCACTCTTTGCATCTCAGGTCCTTGGCCAACCAATTGACGAC
GAAAGCAGTGAGAAACGTAGAGTCCAGGAACCGGTTGGTTAACTGCTG
LeuSerSerLeuPheAlaSerGlnValLeuGlyGlnProIleAspAsp
```

ACTGAATCTAACACTACTTCTGTCAACTTGATGGCTGACGACACTGAA
TGACTTAGATTGTGATGAAGACAGTTGAACTACCGACTGCTGTGACTT
ThrGluSerAsnThrThrSerValAsnLeuMetAlaAspAspThrGlu

TCTAGATTCGCTACTAACACTACTTTGGATGTTGTTAACTTGATCTCC
AGATCTAAGCGATGATTGTGATGAAACCTACAACAATTGAACTAGAGG
SerArgPheAlaThrAsnThrThrLeuAspValValAsnLeuIleSer

ATGGCTAAGAGAGAAGAAGCTGAAGCTGAAGCTGAACCAAAGTTCGTT
TACCGATTCTCTCTTCTTCGACTTCGACTTCGACTTGGTTTCAAGCAA
MetAlaLysArgGluGluAlaGluAlaGluAlaGluProLysPheVal

AACCAACACTTGTGTGGTTCTCACTTGGTTGAAGCTTTGTACTTG
TTGGTTGTGAACACACCAAGAGTGAACCAACTTCGAAACATGAAC
AsnGlnHisLeuCysGlySerHisLeuValGluAlaLeuTyr

73. számú szekvencia