

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2007-700

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C12N 9/72 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **11.04.2006**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **11.04.2005**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2005/670541**
(33) Země priority: **US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **27.02.2008**
(Věstník č. 9/2008)
(86) PCT číslo: **PCT/US2006/013502**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2006/110761**

(71) Přihlašovatel:

Savient Pharmaceuticals, Inc., East Brunswick, NJ, US

(72) Původce:

Hartman Jacob, 58453 Holon, IL
Mendelovitz Simona, 69341 Ramat Aviv, IL

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS Praha a.s., Jivenská 1273/1, Praha 4,
14021

(54) Název přihlášky vynálezu:

Variantní forma urát oxidázy a její použití

(57) Anotace:

Řešení se týká geneticky modifikovaných proteinů s urikolytickou aktivitou. Konkrétně se též týká proteinů zahrnujících zkrácené urát oxidázy a způsobů jejich přípravy, včetně PEGylovaných proteinů zahrnujících zkrácené urát oxidázy.

Variantní forma urát oxidázy a její použití

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká geneticky modifikovaných proteinů s urikolytickou aktivitou. Konkrétně se vynález týká proteinů zahrnujících zkrácené urát oxidázy a způsobů jejich přípravy.

Dosavadní stav techniky

Výrazy urát oxidáza a urikáza se zde používají zaměnitelně. Urát oxidázy (urikázy, E.C. 1.7.3.3) jsou enzymy, které katalyzují oxidaci kyseliny močové na rozpustnější produkt alantoin, což je purinový metabolit, který je snadněji vylučován. Kvůli několika mutacím v genu pro urikázu, získaným během evoluce vyšších primátů, lidé enzymově aktivní urikázu neprodukují. Wu, X et al., (1992) J.Mol.Evol 34:78-84, úplné znění je zde začleněno formou odkazu. V důsledku toho mohou nadměrné koncentrace kyseliny močové v krvi (hyperurikémie) vést u náchylných jedinců k bolestivé artritidě (dna), znetvořujícímu ukládání urátu (tofus) a selhání ledvin. Dostupné léky, např. allopurinol (inhibitor syntézy kyseliny močové) u některých postižených jedinců vyvolávají vedlejší účinky, které léčbu limitují, nebo dostatečně tyto chorobné stavy nezmírňují. Hande, KR et al., (1984) Am.J.Med 76:4756, Fam, AG, (1990) Bailliere's Clin Rheumatol 4:177-192, úplné znění obou prací je zde začleněno formou odkazu. Injekce urikázy mohou hyperurikémií a hyperurikosurií alespoň přechodně snížit. Jelikož urikáza je pro člověka cizí protein, již první injekce nemodifikovaného proteinu z *Aspergillus flavus* vyvolala u několika procent léčených pacientů anafylaktické reakce (Pui, C-H et al., (1997) Leukemia 11:1813-1816, úplné znění je zde začleněno formou odkazu), a imunologické odpovědi její využitelnost pro chronickou nebo periodickou léčbu limitují. Donadio, D et al., (1981) Nouv Presse Med 10:711-712, Leaustic, M et al., (1983) Rev Rhum Mal Osteoartic 50:553-554, úplné znění obou prací je zde začleněno formou odkazu.

Předkládaný vynález se týká mutantních rekombinantních urikázových proteinů, které jsou zkrácené a mají zvýšenou strukturální stabilitu.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje nové rekombinantní urikázové proteiny. Proteiny podle předkládaného vynálezu jsou zkrácené a mají mutované aminokyseliny ve srovnání s přirozeně se vyskytujícími urikázové proteiny.

Vynález poskytuje mutantní rekombinantní urikázu obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID č. 8. Vynález dále poskytuje mutantní rekombinantní urikázu obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID č. 13.

Předkládaný vynález dále poskytuje prostředek pro metabolizaci kyseliny močové, kde je zahrnut nový rekombinantní urikázový protein s urikolytickou aktivitou. Urikolytická aktivita se zde používá v souvislosti s označením enzymové konverze kyseliny močové na alantoin.

V dalším provedení urikáza obsahuje v polohách 8 až 287 aminokyselinovou sekvenci SEQ ID č. 7 nebo SEQ ID č. 12. Vynález dále poskytuje urikázy obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID č. 8 nebo SEQ ID č. 13. V jednom provedení urikáza obsahuje na aminovém konci aminokyselinu, kterou je alanin, glycin, prolin, serin nebo threonin. V konkrétním provedení je na aminovém konci aminokyselina methionin.

Vynález dále poskytuje izolované nukleové kyseliny obsahující sekvenci, která kóduje urikázu podle vynálezu. V konkrétních provedeních je nukleová kyselina kódující urikázu připojená k heterolognímu promotoru, například promotoru *osmB*. Vynález dále poskytuje vektory obsahující nukleovou kyselinu kódující urikázu, hostitelské buňky obsahující takové vektory a způsoby přípravy urikázy zahrnující kultivaci hostitelské buňky za podmínek, kdy se sekvence nukleových kyselin exprimuje hostitelskou buňkou a exprimovaná urikáza se izoluje.

Stručný popis obrázků

Obrázek 1 zobrazuje strukturu plasmidu pOUR-P-ON-ks-1. Čísla vedle restrikčních míst označují polohu nukleotidu vzhledem k místu *HaeII*, označenému jako 1. Restrikční místa, která během klonování mizí, jsou uvedena v závorkách.

Obrázek 2 zobrazuje DNA a odvozené aminokyselinové sekvence urikázy prasečí KS-AN (SEQ ID č. 9 a SEQ ID č. 7). Číslování aminokyselin na Obrázku 2 se vztahuje k úplné sekvenci prasečí urikázy. V sekvenci prasečí urikázy za iniciačním methioninovým zbytkem nahrazuje aspartamovou kyselinu v poloze 7 threonin. Vyznačená jsou restrikční místa, která

se používají pro různé kroky subklonování. 3'-Netranslatované sekvence jsou označené malými písmeny. Hvězdička označuje stop kodon translace.

Obrázek 3 ukazuje relativní uspořádání odvozených aminokyselinových sekvencí různých rekombinantních sekvencí prasečí urikázy (SEQ ID č. 11), PBC- Δ NC (SEQ ID č. 12) a prasečí KS- Δ N (SEQ ID č. 7). Hvězdička označuje polohy, ve kterých jsou rozdíly v aminokyselinách u prasečí KS- Δ N ve srovnání s publikovanou sekvencí prasečí urikázy, kroužky označují polohy, ve kterých jsou rozdíly v aminokyselinách u prasečí KS- Δ N ve srovnání s PBC- Δ NC. Čárkované jsou vyznačené delece aminokyselin.

Obrázek 4 zobrazuje SDS-PAGE prasečí urikázy a velmi čistých variant urikázy připravených podle příkladů 1 až 3. Pro každý vzorek je vyznačeno datum přípravy (měsíc/rok) a odpovídající číslo pásu, viz následující klíč. Na ose Y je vyznačená molekulová hmotnost pomocí markerů a nahoře na obrázku jsou vyznačená čísla pásů. Pás 1 - markery molekulové hmotnosti, Pás 2 - prasečí KS- Δ N (7/98), Pás 3 – prasečí (9/98), Pás 4 - prasečí KS (6/99), Pás 5 - prasečí KS (6/99), Pás 6 - prasečí- Δ N (6/99), Pás 7 – prasečí KS- Δ N (7/99), Pás 8 - prasečí KS- Δ N (8/99).

Obrázek 5 zobrazuje farmakokinetické profily PEGylované (9x10 kDa) prasečí KS- Δ N urikázy na krysách následně po IM (intramuskulární), SC (podkožní) a IV (intravenózní) injekci, stanovené sledováním enzymové aktivity v krevních vzorcích. Urikázová aktivita ve vzorcích plazmy, odebraných ve vyznačených časových úsecích, je stanovena s pomocí kolorimetrické analýzy. Hodnoty aktivity (mAU = jednotky miliabsorbance) představují rychlost enzymatické reakce v 1 μ l vzorku plazmy. Biodostupnost (množství léku v oběhu ve srovnání s IV injekcí) IV aplikované urikázy byla spočítána z plochy pod křivkou v grafu.

Obrázek 6 zobrazuje farmakokinetické profily PEGylované (9x 10kDa) prasečí KS- Δ N urikázy u králíků následně po IM (intramuskulární), SC (podkožní) a IV (intravenózní) injekci, stanovené sledováním enzymové aktivity v krevních vzorcích. Urikázová aktivita ve vzorcích plazmy, odebraných ve vyznačených časových úsecích, je stanovena s pomocí kolorimetrické analýzy. Hodnoty aktivity (mAU = jednotky miliabsorbance) představují rychlost enzymatické reakce v 1 μ l vzorku plazmy. Biodostupnost (množství léku v oběhu ve srovnání s IV injekcí) IV aplikované urikázy byla spočítána z plochy pod křivkou v grafu.

Obrázek 7 zobrazuje farmakokinetické profily PEGylované (9x10kDa) prasečí KS- Δ N urikázy u psů následně po IM (intramuskulární), SC (podkožní) a IV (intravenózní) injekci stanovené sledováním enzymové aktivity v krevních vzorcích. Urikázová aktivita ve vzorcích plazmy, odebraných ve vyznačených časových úsecích, je stanovena s pomocí kolorimetrické

analýzy. Hodnoty aktivity (mAU = jednotky miliabsorbance) představují rychlost enzymatické reakce v 1 µl vzorku plazmy. Biodostupnost (množství léku v oběhu ve srovnání s IV injekcí) IV aplikované urikázy byla spočítána z plochy pod křivkou v grafu.

Obrázek 8 zobrazuje farmakokinetické profily PEGylované (9x10kDa) prasečí KS-ΔN urikázy u prasat následně po IM (intramuskulární), SC (podkožní) a IV (intravenózní) injekci stanovené sledováním enzymové aktivity v krevních vzorcích. Urikázová aktivita ve vzorcích plazmy, odebraných ve vyznačených časových úsecích, je stanovena s pomocí kolorimetrické analýzy. Hodnoty aktivity (mAU = jednotky miliabsorbance) představují rychlost enzymatické reakce v 1 µl vzorku plazmy. Biodostupnost (množství léku v oběhu ve srovnání s IV injekcí) IV aplikované urikázy byla spočítána z plochy pod křivkou v grafu.

Detailní popis vynálezu

Předchozí studie uvádějí, že pokud podstatný pokles imunogenity a/nebo antigenity urikázy je dosažen pomocí PEGylace, je to vždy spojeno se značnou ztrátou urikolytické aktivity. Negativním dopadem bezpečnosti, výhodnosti a rentability bioléciv je vždy pokles jejich síly a výsledná potřeba zvýšit podávanou dávku. Proto jsou zapotřebí bezpečné účinné alternativní způsoby pro snížení zvýšených hladin kyseliny močové v tělesných tekutinách včetně krve. Předkládaný vynález poskytuje mutantní rekombinantní urikázu obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID č. 7, SEQ ID č.8, SEQ ID č. 12 nebo SEQ ID č. 13.

Pokud není stanoveno jinak, zde používaná urikáza zahrnuje jednotlivé podjednotky i tetramer.

V konkrétním provedení urikáza obsahuje na aminovém konci methionin. Tento methionin lze odstranit posttranslační modifikací. V konkrétních provedeních se methionin na aminovém konci odstraní po přípravě urikázy. V konkrétním provedení se methionin odstraní endogenní bakteriální aminopeptidázou. Předposlední aminokyselina umožňuje odstranění N-koncového methioninu bakteriální methionin-aminopeptidázou (MAP). Aminokyselinami umožňujícími co nejúplnější odstranění N-koncového methioninu jsou alanin, glycin, prolin, serin a threonin. V konkrétním provedení urikáza na aminové konci obsahuje dvě aminokyseliny, kterými jsou methionin následovaný aminokyselinou vybranou ze skupiny skládající se z alaninu, glycinu, prolinu, serinu a threoninu.

Vynález poskytuje sekvenci nukleových kyselin kódující urikázu.

Vynález poskytuje vektor obsahující sekvenci nukleových kyselin.

V konkrétním provedení se urikáza izoluje. V dalším provedení se urikáza čistí. V dalších provedeních se urikáza izoluje a čistí.

Vynález poskytuje hostitelskou buňku obsahující vektor, který obsahuje sekvenci nukleových kyselin kódující urikázu.

Vynález poskytuje způsob přípravy sekvence nukleových kyselin kódující urikázu, kdy se sekvence nukleových kyselin kódující urikázu modifikuje pomocí techniky PCR (polymerázová řetězová reakce). Odborník v oboru ví, že požadovaná sekvence nukleových kyselin se připravuje pomocí PCR přes syntetické oligonukleotidové primery, které jsou komplementární k oblastem cílové DNA (jeden pro každé vlákno), které mají být amplifikovány. Primery se přidávají k cílové DNA (nemusí být čištěná), v přítomnosti nadbytku deoxynukleotidů a Taq polymerázy, tepelně stálé DNA polymerázy. V sérii teplotních cyklů (typicky 30) se cílová DNA opakovaně denaturuje (při 90 °C), aneluje k primerům (typicky při 50-60 °C) a dceřiné vlákno se prodlužuje od primerů (72 °C). Dceřiná vlákna sama o sobě působí jako templáty pro následné cykly, a tak jsou DNA fragmenty odpovídající oběma primerům amplifikované spíše exponenciálně než lineárně.

Vynález poskytuje způsob přípravy mutantní rekombinantní urikázy, kdy se hostitelská buňka transfektuje vektorem, přičemž hostitelská buňka exprimuje urikázu, mutantní rekombinantní urikáza se izoluje z hostitelské buňky, čištěná mutantní rekombinantní urikáza se izoluje s použitím chromatografických technik a mutantní rekombinantní urikáza se čistí. Urikázu lze připravit způsoby popsány například v mezinárodní patentové publikaci č. WO 00/08196 a US přihlášce č. 60/095 489, jejichž úplné znění je zde začleněno formou odkazu.

Ve výhodném provedení se hostitelská buňka upraví tak, aby exprimovala mutantní rekombinantní urikázu. Odborník v oboru ví, že transfekce buněk vektorem se obvykle provádí s použitím DNA vysrážené vápenatými ionty, ačkoliv mohou být použité i jiné metody (např. elektroporace).

Urikázu lze izolovat a/nebo čistit libovolným způsobem známým odborníkům v oboru. Exprimované polypeptidy podle vynálezu jsou obecně izolované v podstatě v čisté formě. Výhodně jsou polypeptidy izolované v čistotě nejméně 80 % hmotnostních, výhodněji v čistotě nejméně 95 % hmotnostních a nejvýhodněji v čistotě nejméně 99 % hmotnostních. Čištění se obecně provádí s použitím standardních technik, například frakcionace síranem amonným, SDS-PAGE elektroforézou a afinitní chromatografií. Urikáza se výhodně izoluje s použitím kationtového surfaktantu, například cetylpyridinium-chloridu (CPC), způsobem popsaným v kopendující US patentové přihlášce podané 11. dubna 2005 pod číslem 60/670,520, patentová přihláška č. 103864.146644, s názvem Čištění proteinů kationtovým surfaktantem, jejíž úplné znění je zde začleněno formou odkazu.

V dalším provedení vynálezu je vektor řízen promotorem citlivým k osmotickému tlaku. Promotor je oblast DNA, ke které se RNA polymerázy vážou před iniciací transkripce DNA na RNA. Promotor citlivý k osmotickému tlaku iniciuje transkripci jako výsledek zvýšeného osmotického tlaku zaznamenaného buňkou.

Urikáza podle vynálezu zahrnuje urikázu, která je konjugovaná s polymerem, například urikázu konjugovanou s polyethylenglykolem, tzn. PEGylovanou urikázu.

V jednom provedení vynález poskytuje farmaceutický přípravek obsahující urikázu. V dalším provedení je přípravek roztok urikázy. Ve výhodném provedení je roztok sterilní a vhodný pro injekci. V jednom provedení přípravek obsahuje urikázu ve formě fyziologického roztoku pufrovaného fosfátem. V dalším provedení vynález poskytuje přípravek ve vialce, výhodně s gumovou injekční zátkou. V konkrétních provedeních přípravek obsahuje urikázu v roztoku o koncentraci 2 až 16 mg urikázy na ml roztoku, 4 až 12 mg/ml nebo 6 až 10 mg/ml. Ve výhodném provedení přípravek obsahuje urikázu o koncentraci 8 mg/ml. Výhodně se množství urikázy měří vzhledem k množství proteinu.

Účinná schémata podávání přípravků podle vynálezu může určit odborník v oboru. Vhodné indikátory pro stanovení účinnosti daného schématu jsou odborníkům v oboru známe. Příklady takových indikátorů zahrnují normalizaci nebo snížení hladiny kyseliny močové v plazmě (PUA) a snížení nebo udržení PUA na hodnotě 6,8 mg/dl nebo nižší, výhodně 6 mg/dl nebo nižší. Ve výhodném provedení má subjekt léčený přípravkem podle vynálezu hodnotu PUA 6 mg/ml nebo nižší alespoň 70 %, alespoň 80 % nebo alespoň 90 % z celkové doby léčení. Například při 24-týdenní léčbě má subjekt výhodně hodnotu PUA 6 mg/ml nebo nižší alespoň po 80 % doby z 24-týdenní léčby, tzn. alespoň po dobu rovnou 134,4 dní (24 týdnů x 7 dní v týdnu x 0,8 = 134,4 dní).

V konkrétních provedeních se podává 0,5 až 24 mg urikázy v roztoku jedenkrát každé 2 až 4 týdny. Urikáza se podává libovolným vhodným způsobem, který odborník v oboru zná, například intravenózně, intramuskulárně nebo podkožně. Při intravenózním podávání se podává 0,5 mg až 12 mg urikázy. Při podkožním podávání se podávají až 24 mg urikázy. Ve výhodném provedení se urikáza podává intravenózní infuzí po dobu 30 až 240 minut. V jednom provedení se podává 8 mg urikázy jednou každé dva týdny. V konkrétních provedeních lze infuzi provádět s použitím 100 až 500 ml fyziologického roztoku. Ve výhodném provedení se podává 8 mg urikázy v roztoku po dobu 120 minut jednou každé dva týdny nebo jednou každé 4 týdny, výhodně se urikáza pro infuzi rozpustí ve 250 ml fyziologického roztoku. V konkrétních provedeních se urikáza podává po dobu léčení 3 měsíce, 6 měsíců, 8 měsíců nebo 12 měsíců. V dalších provedeních je doba léčení 12 týdnů,

24 týdnů, 36 týdnů nebo 48 týdnů. V konkrétním provedení je doba léčení prodloužená, např. na 2 roky nebo delší, až po celou dobu života léčeného subjektu. Kromě toho lze použít mnohonásobné doby léčení přerušované obdobím bez léčby, např. 6 měsíců léčby následovaných 3 měsíci bez léčby, následovaných 6 dalšími měsíci léčby, atd.

V některých provedeních mohou být pro odstranění nebo redukování výskytu reakcí na infuzi při podávání urikázy profylakticky podávané protizánětlivé sloučeniny. V jednom provedení se tak podává alespoň jeden kortikosteroid, alespoň jedno antihistaminikum, alespoň jeden NSAID nebo jejich kombinace. Užitečné kortikosteroidy zahrnují betamethason, budesonid, kortison, dexamethason, hydrokortison, methylprednisolon, prednisolon, prednison a triamcinolon. Užitečné NSAID zahrnují ibuprofen, indomethacin, naproxen, aspirin, acetaminofen, celecoxib a valdecoxib. Užitečná antihistaminika zahrnují azatadin, brompheniramin, cetirizin, chlorfeniramin, clemastin, cyproheptadin, desloratadin, dexchlorfeniramin, dimenhydrinat, difenhydramin, doxylamin, fexofenadin, hydroxyzin, loratadin a fenindamin.

Ve výhodném provedení je antihistaminikum fexofenadin, NSAID je acetaminofen a kortikosteroid je hydrokortison a/nebo prednison. Výhodně se kombinace všech tří (není nutno souběžně) podává před vlastní infuzí roztoku s urikázou. Ve výhodném provedení se NSAID a antihistaminikum podávají orálně 1 až 4 hodiny před infuzí urikázy. Vhodná dávka obsahuje 30 až 180 mg, 40 až 150 mg, 50 až 120 mg, 60 až 90 mg, 60 mg, výhodně 60 mg fexofenadinu. Vhodná dávka obsahuje 500 až 1500 mg, 700 až 1200 mg, 800 až 1100 mg, 1000 mg, výhodně 1000 mg acetaminofenu. Vhodná dávka obsahuje 100 až 500 mg, 150 až 300 mg, 200 mg, výhodně 200 mg hydrokortisonu. V jednom provedení není antihistaminikum difenhydramin. V dalším provedení NSAID není acetaminofen. Ve výhodném provedení se 60 mg fexofenadinu podává orálně noc před infuzí urikázy, 60 mg fexofenadinu a 1000 mg acetaminofenu se podává orálně příští ráno a konečně 200 mg hydrokortisonu se podává těsně před infuzí roztoku s urikázou. V jednom provedení se prednison podává den, výhodně večer, před podáním urikázy. Vhodná dávka obsahuje 5 až 50 mg, výhodně 20 mg prednisonu. V některých provedeních se tato profylaktická léčba pro odstranění nebo redukování výskytu reakcí na infuzi používá pro subjekty, které dostávají nebo budou dostávat urikázu, včetně PEGylované urikázy a nePEGylované urikázy. V konkrétních provedeních se tato profylaktická léčba používá pro subjekty, které dostávají nebo budou dostávat terapeutické peptidy jiné než urikáza, přičemž jiné terapeutické peptidy jsou PEGylované nebo nePEGylované.

V jednom provedení vynálezu obsahuje farmaceutický přípravek urikázu konjugovanou s polymerem a modifikovaná urikáza si zachovává urikolytickou aktivitu. Ve výhodném provedení je urikáza PEGylovaná urikáza.

V jednom provedení vynálezu obsahuje farmaceutický přípravek urikázu, která byla modifikovaná konjugací s polymerem a modifikovaná urikáza si zachovává urikolytickou aktivitu. V konkrétním provedení se konjugáty polymer-urikáza připravují způsobem popsáním v mezinárodní patentové publikaci č. WO 01/59078 a U.S. přihlášce č. 5 09/501730, jejichž plné znění je zde zahrnuto formou odkazu.

V jednom provedení vynálezu je polymer vybrán ze skupiny skládající se z polyethylenglykolu, dextranu, polypropylenglykolu, hydroxypropylmethylcelulózy, karboxymethylcelulózy, polyvinylpyrolidonu a polyvinylalkoholu. Ve výhodném provedení je polymer polyethylenglykol a urikáza je PEGylovaná urikáza.

V provedení vynálezu přípravek obsahuje 2-12 molekul polymeru na každou podjednotku urikázy, výhodně 3 až 10 molekul polymeru na podjednotku urikázy. V dalším provedení vynálezu má každá molekula polymeru molekulovou hmotnost v rozmezí 1 kDa až 100 kDa.

V dalším provedení vynálezu má každá molekula polymeru molekulovou hmotnost v rozmezí 1 kDa až 50 kDa. Ve výhodném provedení vynálezu má každá molekula polymeru molekulovou hmotnost v rozmezí 5 kDa až 20 kDa, 8 kDa až 15 kDa, 10 kDa až 12 kDa, výhodně 10 kDa. Ve výhodném provedení má každá molekula polymeru molekulovou hmotnost 5 kDa nebo 20 kDa. V obzvláště výhodném provedení vynálezu má každá molekula polymeru molekulovou hmotnost 10 kDa.

V dalším provedení vynálezu je přípravek vhodný pro opakované podávání.

Vynález poskytuje prostředek pro metabolizaci kyseliny močové s použitím urikázy.

Vynález poskytuje použití přípravku s urikázou pro snížení hladiny kyseliny močové v biologické tekutině.

V jednom provedení vynálezu se přípravek obsahující urikázu používá pro snížení hladiny kyseliny močové v biologické tekutině zahrnující krev.

Vynález dále poskytuje nové molekuly nukleových kyselin kódující urikázu podle vynálezu. Způsoby jejich přípravy jsou odborníkovi v oboru dobře známé. Sekvence nukleových kyselin urikázy mohou být modifikované libovolnou z mnoha strategií známých v oboru (Maniatis, T., 1990, Molecular Cloning, laboratorní manuál, 2. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.). Sekvence může být štěpena na příslušných místech restriční endonukleázou (endonukleázami), případně následuje další enzymatická

modifikace, izolace a ligace in vitro. Při přípravě genu kódujícího urikázu je zapotřebí zajistit, aby modifikovaný gen zůstal uvnitř příslušného čtecího rámce translace, nepřerušeny stop-signály translace.

Nukleotidová sekvence kódující urikázový protein může být vložena do příslušného expresního vektoru, tzn. vektoru, který obsahuje nezbytné prvky pro transkripci a translaci vložené sekvence kódující protein. Pro expresi sekvence kódující protein může být použito mnoho různých systémů hostitel-vektor. Tyto systémy zahrnují, ale nejsou omezeny na systémy savčích buněk infikovaných virem (např. virus vakcinie, adenovirus, atd.), systémy hmyzích buněk infikovaných virem (např. baculovirus), mikroorganismy, např. kvasinky obsahující vektory kvasinek nebo bakterie transformované bakteriofágovou DNA, plasmidovou DNA nebo kosmidovou DNA. Prvky exprese se u těchto vektorů liší v jejich síle a specifitě. V závislosti na použitém systému hostitel-vektor lze použít libovolný z mnoha vhodných prvků transkripce a translace.

Ke konstruování expresních vektorů obsahujících chimérní gen, který se skládá z příslušných regulačních signálů pro transkripci/translaci a sekvencí kódujících protein, lze použít libovolný způsob známý pro inzerci DNA fragmentů do vektoru. Tyto způsoby mohou zahrnovat in vitro DNA rekombinantní a syntetické techniky a rekombinace in vivo (genetické rekombinace). Exprese sekvence nukleových kyselin kódující urikázový protein může být řízena druhou aminokyselinovou sekvencí, takže urikázový protein je exprimovaný v hostiteli transformovaném molekulou rekombinantní DNA. Exprese urikázy může být řízena libovolným elementem promotor/enhancer, který je v oboru známý. Promotory, které lze použít pro řízení exprese urikázy, zahrnují, ale nejsou omezeny na, oblast SV40 raného promotoru (Bernoist a Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310), promotor obsažený v dlouhé 3'-koncové repetici Rous sarkoma viru (Yamamoto et al., (1980, *Cell* 22:787-797), promotor herpes thymidinkinázy (Wagner et al., (1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:144-1445), regulátorové sekvence genu metallothioninu (Brinster et al., (1982, *Nature* 296:39-42); prokaryotické expresní vektory, například promotor 3-laktamázy (Villa-Kamaroff et al., (1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-3731), promotor tac (DeBoer et al., (1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25) a promotor osmB. V konkrétních provedeních nukleová kyselina zahrnuje sekvenci nukleových kyselin kódující urikázu operativně připojenou k heterolognímu promotoru.

Jakmile se připraví a izoluje konkrétní molekula rekombinantní DNA obsahující kódující sekvenci nukleových kyselin, lze k její propagaci použít různé způsoby v oboru známé. Jakmile je ustaven vhodný hostitelský systém a vhodné podmínky růstu, mohou být

rekombinantní expresní vektory propagovány a připraveny ve velkém množství. Jak bylo výše vysvětleno, použitelné expresní vektory zahrnují, ale nejsou omezeny na následující vektory nebo jejich deriváty: lidské nebo zvířecí viry, např. virus vakcinie nebo adenovirus, hmyzí viry, např. baculovirus, kvasinkové vektory, bakteriofágové vektory (např. lambda) a plasmidové a kosmidové DNA vektory a další.

Kromě toho lze vybrat kmen hostitelské buňky, který moduluje expresi vložených sekvencí nebo modifikuje a požadovaným způsobem genový produkt upravuje. Expres u určitých promotorů může být zvýšena v přítomnosti některých induktorů, takže lze kontrolovat expresi geneticky zkonstruovaného urikázového proteinu. Různé hostitelské buňky dále mají charakteristické a specifické mechanismy pro translační a posttranslační úpravy a modifikaci proteinů (např. glykosylace, štěpení). K zajištění požadované modifikace a úpravy exprimovaného cizího proteinu mohou být vybrány vhodné buněčné linie nebo hostitelské systémy. Různé systémy exprese vektor/hostitel mohou různou měrou ovlivnit reakce probíhající při úpravě, například proteolytické štěpení.

V konkrétních provedeních vynálezu se exprese urikázy *E. coli* výhodně provádí s použitím vektorů obsahujících promotor *osmB*.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Konstrukce genu a expresního plasmidu pro expresi urikázy

Rekombinantní prasečí urikáza (urát oxidáza), prasečí KS- Δ N (protein prasečí urikázy zkrácený na aminovém konci nahrazující aminokyseliny v poloze 291 a 301 lysinem a serinem) byla exprimovaná na *E. coli*, K-12 kmen W3110 F-. Byla konstruována série plasmidů s výslednou pOUR-P- Δ N-ks-l, která po transformaci hostitelské buňky *E. coli* byla schopna řídit účinnou expresi urikázy.

Izolace a subklonování urikázy cDNA z prasečích a paviáních jater

Z prasečích a paviáních jater byly izolací a subklonováním relevantní RNA připraveny urikázové cDNA. Z prasečích a paviáních jater byla extrahována veškerá buněčná RNA (viz Erlich, H. A. (1989), PCR Technologie, principy a aplikace pro DNA amplifikaci, Sambrook, J. et al. (1989), Molekulární klonování: Laboratorní manuál, 2. vydání, Ausubel, F. M. et al. (1998), Současné protokoly v molekulární biologii), poté se provedla reverzní transkripce s

použitím First-Strand cDNA Synthesis Kit (Pharmacia Biotech). PCR amplifikace byla provedena s použitím Taq DNA polymerázy (Gibco BRL, Life Technologies).

V Tabulce 1 jsou uvedeny syntetické oligonukleotidové primery použité pro PCR amplifikaci prasečí a paviání urát oxidázy (urikázy).

Tabulka 1. Primery pro PCR Amplifikaci Urikázy cDNA

Prasečí jaterní urikáza	
sensní (SEQ ID č. 1)	5' gcgcgaattccATGGCTCATTACCGTAATGACTACA 3'
anti-sensní (SEQ ID č. 2)	5' gcgctctagaagcttccatggTCACAGCCTTGAAGTCAGC 3'
Paviání (D3H) jaterní urikáza	
sensní (SEQ ID č. 3)	5' gcgcgaattccATGGCCCACTACCATAACA ACTAT 3'
anti-sensní (SEQ ID č. 4)	5' gcgcccatggtctagaTCACAGTCTTGAAGACA ACTTCCT 3'

Sekvence restričních enzymů, zavedené na konce primerů a v Tabulce 1 označené malými písmeny, byly sensní EcoRI a NcoI (prasečí a paviání) a anti-sensní NcoI, HindIII 5 a XbaI (prasečí), XbaI a NcoI (paviání). U paviáního sensního primeru byl třetí kodon GAC (aspartamová kyselina), přítomný v paviání urikáze, nahrazen kodonem CAC (histidin), který je v této poloze přítomný v kódující sekvenci pseudogenu lidské urát oxidázy. Rekombinantní konstrukt paviání urikázy generovaný s použitím těchto primerů je nazván D3H Paviání urikáza.

PCR produkt prasečí urikázy byl natráven EcoRI a HindIII a klonování do pUC 18 za vzniku pUC 18 - Prasečí urikáza. PCR produkt D3H paviání urikázy byl naklonován přímo do vektoru pCRTMII, použil se TA CloningTM (Invitrogen, Carlsbad, CA), za vzniku paviání urikázy pCRTMII -D3H.

Pro transformaci kmene E. coli XLI-Blue (Stratagene, La Jolla, CA) byly použity ligované cDNA. Byla připravena plasmidová DNA obsahující klonovanou cDNA urikázu a byly selektovány a izolovány klony, které obsahují kódující sekvence DNA publikované urikázy (s výjimkou substituce D3H v paviání urikáze, viz Tabulka 1). Ve vybraném klonu paviání urikázy pCRTMII - D3H byly, v důsledku delece sekvencí zavedených PCR, sekvence pCRTMII vedle stop-kodonu urikázy. V důsledku toho byla z 3'-netranslatované oblasti

eliminována restrikční místa XbaI a NcoI, což na 5'-konci produktu PCR umožnilo poziční klonování s použitím NcoI a BamHI, který je odvozený od vektoru pCRTMII.

Subklonování urikázové cDNA do expresních vektorů pET

Subklonování paviání urikázy

Do expresního vektoru pET-3d (Novagen, Madison, WI) byla zavedena D3H paviání cDNA obsahující celou kódující sekvenci urikázy. pCRTMII - D3H paviání urikáza byla natrávena NcoI a BamHI a izoloval se fragment 960 bp. Expresní plasmid pET-3d byl natráven NcoI a BamHI a izoloval se fragment 4600 bp. Ligací těchto dvou fragmentů byla vytvořena paviání pET-3d-D3H.

Subklonování chiméřní urikázy prase-pavián

Pro získání vyšší exprese, stability a aktivity rekombinantního genu byla konstruována chiméřní urikáza prase-pavián (PBC). PBC byla konstruována izolováním 4936 bp fragmentu NcoI-ApaI z klonu paviání pET-3d-D3H a ligací izolovaného fragmentu s 624 bp fragmentem NcoI-ApaI izolovaným z pUC 18 prasečí urikázy, čímž se vytvoří pET-3d-PBC. Urikázová PBC cDNA se skládá z kodonů 1-225 prasečí urikázy spojených do rámce s kodony 226-304 paviání urikázy.

Subklonování prasečí KS urikázy

Pro vložení jednoho lysinového zbytku, který může poskytnout další místo pro PEGylaci, byla konstruována prasečí KS urikáza. KS znamená vložení aminokyseliny lysinu do prasečí urikázy v poloze 291, namísto argininu (R291K). Navíc byl threonin v poloze 301 nahrazen serinem (T301 S). Plasmid prasečí KS urikázy byl konstruován izolováním 4696 bp NcoI-NdeI fragmentu paviání pET-3d-D3H a následnou ligací s 864 bp NcoI-NdeI fragmentem izolovaným z prasečí urikázy pUC18, za vzniku pET-3d prasečí KS. Výsledná sekvence prasečí KS urikázy se skládá z kodonů 1-288 prasečí urikázy spojených do rámce s kodony 289-304 paviání urikázy.

Subklonování urikázové sekvence regulované promotorem osmB

Gen urikázy byl subklonován do expresního vektoru obsahujícího promotor osmB (podle postupu z US patentu č. 5 795 776, jehož plné znění je zde zahrnuto formou odkazu). Tento vektor umožňuje indukci exprese proteinu jako odpověď na vysoký osmotický tlak nebo stárnutí kultury. Expresní plasmid pMFOA-18 obsahoval promotor osmB, sekvenci pro

místo navázání rybozomu (rbs) a sekvenci pro terminátor transkripce (ter). Dodává rezistenci na ampicilin (AmpR) a exprimuje rekombinantní lidskou acetylcholinu-esterázu (AChE).

Subklonování paviání D3H urikázy

Plasmid pMFOA-18 byl natráven NcoI a BamHI a izoloval se velký fragment. Konstrukt paviání pET-3d-D3H byl natráven NcoI a BamHI a izoloval se 960 bp fragment obsahující gen D3H paviání urikázy. Tyto dva fragmenty byly ligovány za vytvoření pMFOU18.

Expresní plasmid pMFXT133 obsahuje promotor *osmB*, rbs (deo operon *E. coli*), *ter* (*TrypA E. coli*), rekombinantní polypeptidový inhibitor faktoru Xa (*FxaI*) a dodává gen rezistence na tetracyklin (*TetR*). Kvůli změně genů rezistence na antibiotika byl do tohoto plasmidu vložen gen paviání urikázy. Plasmid pMFOU18 byl natráven NcoI, vyplněn, poté natráven XhoI a izoloval se fragment 1030 bp. Plasmid pMFXT133 byl natráven NdeI, vyplněn, poté natráven XhoI a izoloval se velký fragment. Tyto dva fragmenty byly ligovány pro vytvoření expresního vektoru paviání urikázy pURBA16.

Subklonování chimérické urikázy prase-pavián

Plasmid pURBA16 byl natráven ApaI a AlwNI a izoloval se fragment 2320 bp. Plasmid pMFXT133 byl natráven NdeI, vyplněn, poté natráven AlwNI a izoloval se fragment 620 bp. Konstrukt pET-3d-PBC byl natráven XbaI, vyplněn, poté natráven ApaI a izoloval se fragment 710 bp. Tyto tři fragmenty byly ligovány pro vytvoření pUR-PB, plasmidu exprimujícího PBC urikázu pod kontrolou promotoru *osmB* a rbs i T7 rbs, který byl odvozen z vektoru pET-3d.

V dalším kroku byl T7 rbs odstraněn. pUR-PB byl natráven NcoI, vyplněn, poté digestován AlwNI a izoloval se fragment 3000 bp. Plasmid pMFXT133 byl natráven NdeI, vyplněn a poté natráven AlwNI a izoloval se fragment 620 bp. Tyto dva fragmenty byly ligovány za vzniku pDUR-PB, který exprimuje PBC pod kontrolou promotoru *osmB*.

Konstrukce pOUR-PB-ΔNC

Do urikázy cDNA bylo zavedeno několik změn, které vedly k podstatnému nárůstu stability rekombinantního enzymu. Byl konstruován plasmid pOUR-PBC-ΔNC, u kterého byly odstraněny N-koncový maturovaný peptid se šesti zbytky a tripeptid na C-konci, které působí *in vivo* jako peroxyzomální cílový signál. Toto se provedlo s použitím PCR

amplifikace PBC sekvenční z plasmidu pDUR-PB a specifických oligonukleotidových primerů uvedených v Tabulce 2.

Tabulka 2. Primery pro PCR amplifikaci urikázy PBC- Δ NC

Urikáza PBC- Δ NC:
Sensní
5' gcgcat ATGACTTACAAAAAGAATGATGAGGTAGAG 3' (SEQ ID č. 5)
Antisensní
5' ccgtctaga TTAAGACAACCTCCTCTTGACTGTACCAGTAATTTTCCG <u>T</u> ATGG 3' (SEQ ID č. 6)

Zvýrazněné sekvenční restrikčních enzymů zavedené na konce primerů nekódující oblasti jsou v Tabulce 2 označeny malými písmeny. NdeI je sensní a XbaI je antisensní. Antisensní primer byl použit také pro eliminaci vnitřního místa restrikce NdeI zavedením bodové mutace (podtržené), která neovlivňuje aminokyselinovou sekvenci, a tak usnadňuje subklonování s použitím NdeI.

Fragment 900 bp (base-pair, spárovaných bazí), generovaný PCR amplifikací pDUR-PB, byl štěpen NdeI a XbaI a izolován. Získaný fragment byl poté vložen do deo-expressního plasmidu pDBAST-RAT-N, který obsahuje deo-P1P2 promotor a rbs odvozený z E. coli a konstitutivně exprimuje lidský rekombinantní prekurzor insulinu. Plasmid byl natráven NdeI a XbaI, fragment 4035 bp se izoloval a ligoval do PCR produktu PBC urikázy. Výsledný konstrukt pDUR-PB- Δ NC byl použit pro transformaci E. coli K 12 S ϕ 733 (F- cytR strA), který exprimoval vyšší hladinu aktivní zkrácené urikázy.

Také dvojité zkrácené sekvenční PBC- Δ NC byly exprimované pod kontrolou promotoru osmB. Plasmid pDUR-PB- Δ NC byl natráven AlwNI - NdeI a izoloval se fragment 3459 bp. Výše popsáný plasmid pMFXT133 byl natráven NdeI AlwNI a izoloval se fragment 660 bp. Fragmenty byly poté ligovaly pro vytvoření pOUR PB- Δ NC, který byl zaveden do E. coli K-12 kmene W3110 F⁻ a exprimoval vyšší hladinu aktivní zkrácené urikázy.

Konstrukce expresního plasmidu urikázy pOUR-P-ΔN-ks-1

Tento plasmid byl konstruován pro vylepšení aktivity a stability rekombinantního enzymu. Prasečí urikáza KS-ΔN byla zkrácená pouze na N-konci (ΔN), kde byl odstraněn N-koncový maturovaný peptid se šesti zbytky, a obsahovala mutace S46T, R291K a T301S. V poloze 46 byl kvůli konzervativní mutaci, ke které došlo během PCR amplifikace a klonování, namísto serinu zbytek threoninový. Lysin v poloze 291 nahradil arginin a v poloze 301 byl namísto threoninu vložen serin. Obě záměny byly odvozené ze sekvence paviání urikázy. Modifikace R291 K a T301 S jsou označené KS a diskutované výše. Extra lysinový zbytek poskytl další místo pro potenciální PEGylaci.

Pro konstrukci pOUR-P-ΔN-ks-1 (Obrázek 1) byl plasmid pOUR-PB-ΔNC natráven ApaI - XbaI a izoloval se fragment 3873 bp. Plasmid pET-3d-PKS (konstrukce uvedena na Obrázku 4) byl natráven ApaI - SpeI a izoloval se fragment 270 bp. Štěpení SpeI zanechalo extenzi 5' CTAG, která byla účinně ligovaná s fragmenty DNA generovanými XbaI. Tyto dva fragmenty byly ligovány pro vytvoření pOUR-P-ON-ks-1. Po ligaci zanikla místa rekognice SpeI a XbaI (jejich umístění je na Obrázku 9 uvedeno v závorkách). Konstrukt pOUR-P-ΔN-ks-1 byl zaveden do *E. coli* K-12 kmene W3110 F⁻, prototrofní, ATCC # 27325. Výsledná prasečí urikáza KS-ΔN, exprimovaná pod kontrolou promotoru *osmB*, poskytla vysoké hladiny rekombinantního enzymu s vyšší aktivitou a stabilitou.

Obrázek 1 ukazuje strukturu plasmidu pOUR-P-ΔN-ks-1. Čísla u restrikčních míst ukazují polohu nukleotidu vzhledem k místu HaeII, označenému jako 1. Restrikční místa, která zanikla během klonování, jsou uvedena v závorkách. Plasmid pOUR-P-ΔN-ks-1, kódující prasečí urikázu KS-ΔN, je dlouhý 4143 párů bazí (bp) a zahrnuje následující prvky:

1. fragment DNA o délce 113 bp, sahající od nukleotidu číslo 1 do místa NdeI (v poloze 113), který zahrnuje promotor *osmB* a vazebné místo pro ribozom (rbs).
2. Fragment DNA o délce 932 bp, sahající od NdeI (v poloze 113) do spojky SpeI/XbaI (v poloze 1045), který zahrnuje: kódující oblast 900 bp prasečí KS-ΔN (sekvence nukleových kyselin proteinu prasečí urikázy zkráceného na aminovém konci, kde jsou aminokyseliny v poloze 291 a 301 nahrazeny lysinem a serinem) a 32 bp boční sekvenci odvozenou z pCRTM II, od místa klonování TA v protisměru do místa restrikce SpeI/XbaI.
3. 25 bp sekvenci místa vícečetného klonování (MCS) od spojky SpeI/XbaI (v poloze 1045) do HindIII (v poloze 1070).
4. Syntetický 40 bp oligonukleotid obsahující TrpA terminátor transkripce (ter) s konci HindIII (v poloze 1070) a AatII (v poloze 1110).

5. Fragment DNA o délce 1519 bp, sahající z místa AatII (v poloze 1110) do MscI/Scal (v poloze 2629) na pBR322, který obsahuje gen rezistence na tetracyklin (TetR).
6. Fragment DNA o délce 1514 bp, sahající z místa Scal (v poloze 2629) do HaeII (v poloze 4143) na pBR322, který obsahuje počátek replikace DNA.

Obrázek 2 ukazuje DNA a odvozené aminokyselinové sekvence prasečí urikázy KS-ΔN. V tomto obrázku je číslování aminokyselin provedeno podle úplné sekvence prasečí urikázy. Za iniciačním methioninovým zbytkem byl namísto kyseliny aspartamové ze sekvence prasečí urikázy vložen threonin. Tento threoninový zbytek umožňuje odstranění methioninu bakteriální aminopeptidázou. Mezera v aminokyselinové sekvenci ukazuje odstraněný N-koncový maturovaný peptid. Vyznačená jsou restrikční místa, která byla použita pro různé kroky subklonování různých sekvencí urikázy (ApaI, NdeI, BamHI, EcoRI a SpeI). 3'-Netranslatovaná sekvence, označená malými písmeny, byla odvozena ze sekvence pCRTMII. Hvězdička označuje stop kodon translace.

Obrázek 3 ukazuje uspořádání aminokyselinových sekvencí různých rekombinantních sekvencí urikázy. Vrchní řada představuje prasečí urikázu s úplnou aminokyselinovou sekvencí. Druhá řádka je sekvence dvojité zkrácené prasečí-pavián chimérní urikázy (PBC-ΔNC). Třetí řádka ukazuje sekvenci prasečí urikázy KS-ΔN, která je zkrácená pouze na N-konci a obsahuje mutace S46T a změny aminokyselin R291 K a T301 S, obě reflektující paviání původ karboxylového konce sekvence kódující urikázu. Hvězdička označuje polohy, kde jsou rozdíly v aminokyselinách u prasečí KS-ΔN ve srovnání s publikovanou sekvencí prasečí urikázy, kroužky označují polohy, kde jsou rozdíly v aminokyselinách v prasečí KS-ΔN ve srovnání s prasečí-paviání chimérou PBC-ΔN, a čárkovaně jsou vyznačené delece aminokyselin.

Pro klonování do *E. coli* byly konstruovány cDNA nativní urikázy, paviání, prasečí a králíčí, s mutací Y97H a prasečí-paviání chiméra (PBC). Byly konstruovány klony exprimující vysoké hladiny urikázových variant a vybrány všechny *E. coli* W3110 F⁻, u kterých je exprese regulovaná osmB. Izolovaly se plasmidové DNA, ověřily DNA sekvenční analýzou pomocí restrikčních enzymů a kultivovaly se buňky.

Konstrukce zkrácené urikázy, včetně prasečí-ΔN a prasečí KS-ΔN, byla provedena křížovou ligací mezi PBC-ΔNC a prasečí KS, následným štěpením restrikčními endonukleázami ApaI a XbaI a ApaI plus SpeI. Lze odůvodněně předpokládat, že si tyto zkrácené mutanty zachovají svou aktivitu, neboť šest N-koncových zbytků, „maturovaný peptid“ (1-2) a C-koncový tripeptid, „peroxyzomální cílový signál“ (3-5), nemají funkce,

které by podstatně ovlivnily enzymovou aktivitu, a že tyto sekvence budou imunogenní. Vybraly se klony exprimující velmi vysoké hladiny variantních urikáz.

Příklad 2

Transformace expresního plasmidu do bakteriální hostitelské buňky A

Expresní plasmid pOUR-P- Δ N-ks-1 byl zaveden do *E. coli* K-12 kmene W3110 F⁻. Bakteriální buňky byly připraveny pro růst spojený s transformací do fáze mid log u Luria broth (LB), poté byly buňky odděleny centrifugací, promyty ve studené vodě, a suspendovány v 10% glycerolu ve vodě o koncentraci 3×10^{10} buňky/ml. Buňky byly uchovávány v alikvotech při -70 °C. Plasmidová DNA byla vysrážena v ethanolu a rozpuštěna ve vodě.

Bakteriální buňky a plasmidová DNA byly smíchány a transformace byla provedena vysokonapěťovou elektroporační metodou s použitím Gene Pulser II z BIO-RAD (Trevors et al (1992). Electrotransformace bakterie plasmidovou DNA, viz Průvodce Elektroporace a Elektrofúze (D.C. Chang, B. M. Chassy, J. A. Saunders a A. E. Sowers, eds.), str. 265-290, Academic Press Inc., San Diego, Hanahan et al (1991) Meth. Enzymol., 204, 63-113). Transformované buňky byly suspendované v médiu SOC (2% trypton, 0,5% kvasinkový extrakt, 10 mM NaCl, 2,5mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glukóza), inkubované 1 hodinu při 37°C, a vytríděné podle rezistence na tetracyklin. Byl vybrán klon s vysokou expresí.

Příklad 3

Příprava rekombinantní urikázy

Bakterie stejného typu jako ty výše popsané transformované byly kultivovány v médiu obsahujícím glukózu, pH bylo udržováno na hodnotě $7,2 \pm 0,2$, při 37 °C.

Pro posledních 5-6 hodin kultivace byl do média přidán KCl na konečnou koncentraci 0,3 M. Kultivace pokračovala, aby se umožnila akumulace urikázy.

Rekombinantní urikáza se akumulovala uvnitř bakteriálních buněk jako nerozpustný precipitát podobný inkluzním tělískům (IBs). Buněčná suspenze byla promytá centrifugací a suspendovaná v 50mM pufru Tris při pH 8,0 a 10 mM EDTA na konečný objem odpovídající 40-násobku suché hmotnosti buněk.

IBs obsahující rekombinantní urikázu byly izolované centrifugací a následným rozrušením bakteriálních buněk s použitím lysozymu a vysokého tlaku. Reakce s lysozymem (2000-3000 jednotek/ml) byla provedena za míchání při pH 8,0 a $7 \pm 3^\circ \text{C}$ po dobu 16-20 hodin. Peleta byla promyta vodou a uchovávána při -20°C až do použití.

Obohacené IBs byly po suspendování dále zpracovávány v 50 mM NaHCO_3 pufru při pH $10,3 \pm 0,1$. Kvůli solubilizaci urikázy odvozené od IB byla suspenze přes noc inkubovaná při teplotě místnosti, a následně vyčištěná centrifugací.

Urikáza byla dále čištěná několika chromatografickými kroky. Nejprve byla chromatografie provedena na koloně Q-Sepharose FF. Kolona s látkou byla promyta bikarbonátovým puftrem obsahujícím 150 mM NaCl a urikáza byla eluovaná bikarbonátovým puftrem obsahujícím 250 mM NaCl. Pro odstranění minoritních nečistot z urikázového preparátu byla poté použita xanthin-agarózová pryskyřice (Sigma). Eluát po Q-Sepharose FF byl naředěn 50mM glycinovým puftrem o pH $10,3 \pm 0,1$ na koncentraci proteinu 0,25 mg/ml a nanesen na kolonu. Kolona byla promyta bikarbonátovým puftrem při pH $10,3 \pm 0,1$ obsahujícím 100mM NaCl a urikáza byla eluovaná stejným puftrem doplněným 60 μM xanthinu. V tomto stádiu byla urikáza pro odstranění agregovaných forem přečištěná chromatografií na Q-Sepharose.

Čistota všech urikázových přípravků je vyšší než 95 %, jak bylo stanoveno velikostně vylučující chromatografií. Při použití kolony Superdex 200 bylo ve všech přípravech detekováno méně než 0,5 % agregovaných forem.

Tabulka 3 podává souhrn čištění prasečí urikázy KSΔN z IBs získaných z fermentační půdy 25 L.

Tabulka 3. Čištění prasečí KSΔN urikázy

Krok čištění	Protein (mg)	Aktivita (U)	Specifická aktivita (U/mg)
Rozpuštění IB	12 748	47 226	3,7
Vyčištěný roztok	11 045	44 858	4,1
Q-Sepharose I - hlavní podíl	7 590	32 316	4,3
Xanthin-Agaróza - hlavní podíl	4 860	26 361	5,4
Q-Sepharose II - hlavní podíl	4 438	22 982	5,2
Retentát 30 kDa UF	4 262	27 556	6,5

Příklad 4

Charakteristiky rekombinantní urikázy

SDS-PAGE

SDS-PAGE analýza vysoce čištěné variantní urikázy (Obrázek 4) odhalila charakteristický profil. Vzorky byly uchovávány při 4 °C v uhličitanovém pufru při pH 10,3 až po dobu několika měsíců. Úplné prasečí, prasečí KS a PBC varianty vykazují akumulaci dvou hlavních degradačních produktů s molekulovou hmotností 20 a 15 kDa. Toto pozorování naznačuje, že alespoň jeden nick štěpí molekulu podjednotky urikázy. Rozdílný degradační profil je detekován u klonů zkrácených na aminovém konci a v nižší míře také u králičí urikázy. N-konec králičí urikázy připomíná N-konec zkrácených klonů. Určeny byly N-koncové sekvence fragmentů urikázy generovaných během čištění a skladování.

Sekvencování peptidů

Dlouhé urikázové přípravky byly sekvenovány od N-konce s použitím Edmanovy degradace. Provedlo se deset cyklů. Rekombinantní prasečí urikáza (úplný klon) generovala větší množství degradačních fragmentů ve srovnání s prasečí KS- Δ N. Byla vyvozena tato místa štěpení vedoucí k degradačním fragmentům:

1) Majoritní místo v poloze 168 se sekvencí:

--QSG ↓ FEGFI--

2) Minoritní místo v poloze 142 se sekvencí:

--IRN ↓ GPPVI--

Výše uvedené sekvence nepřipomínají žádné známé proteolytické štěpení. Přesto ke štěpení mohlo dojít buď proteolýzou, nebo nějakou chemickou reakcí. Urikázy zkrácené na N-konci jsou překvapivě stabilnější než urikázy na N-konci nezkrácené. Také PBC- Δ NC měla stabilitu podobnou dalším Δ N molekulám a nižší než u PBC na N-konci nezkrácené.

Účinnost

Aktivita urikázy byla měřena pomocí UV. Rychlost enzymatické reakce byla určena z měření poklesu absorpance při 292 nm následkem oxidace kyseliny močové na alantoin. Jednotka aktivity je definovaná jako množství urikázy nutné k oxidaci jednoho mikromolu

kyseliny močové za minutu při 25 °C při specifikovaných podmínkách. Účinnost urikázy je vyjádřena v jednotkách aktivity na mg proteinu (U/mg).

Extinkční koeficient 1mM kyseliny močové při 292 nm je $12,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Proto oxidace 1 mikromolu kyseliny močové na ml reakční směsi vedla k poklesu absorbance $12,2 \text{ mA}_{292}$. Změna v absorbanci s časem (ΔA_{292} za minutu) byla odvozená z lineárního úseku křivky.

Koncentrace proteinu byla stanovena s použitím modifikované Bradfordovy metody (Macart a Gerbaut, (1982) Clin Chim Acta 122, 93-101). Specifická aktivita (účinnost) urikázy byla vypočítána vydělením aktivity v U/ml koncentrací proteinu v mg/ml. Výsledky enzymové aktivity různých rekombinantních urikáz jsou shrnuty v Tabulce 4. Jako referenční hodnoty jsou v této tabulce použity výsledky u komerčních přípravků. Z těchto výsledků je zřejmé, že zkrácení urikázových proteinů jejich enzymatickou aktivitu významně neovlivňuje.

Tabulka 4. Souhrn kinetických parametrů rekombinantních a nativních urikáz

Urikázy	Koncentrace ⁽¹⁾ zásobního roztoku (mg/ml)	Specifická aktivita (U/mg) ⁽²⁾	K _m ⁽⁴⁾ (μM kyseliny močové)	K _{cat} ⁽⁵⁾ (l/min)
Rekombinantní				
Prasečí	0,49	7,41	4,39	905
Prasečí-ΔN	0,54	7,68	4,04	822
Prasečí KS	0,33	7,16	5,27	1085
Prasečí KS-ΔN	1,14	6,20	3,98	972
PBC	0,76	3,86	4,87	662
PBC-ΔNC	0,55	3,85	4,3	580
Králičí	0,44	3,07	4,14	522
Nativní				
Prasečí (Sigma)	2,70	3,26	5,85	901
A. flavus (Merck)	1,95	0,97	23,54	671

Poznámky k Tabulce 4:

(1) Koncentrace proteinu byla stanovena z absorbance měřené při 278 nm, s použitím extinkčního koeficientu 11,3 pro roztok urikázy 10 mg/ml (Mahler, 1963).

(2) 1 jednotka aktivity urikázy je definovaná jako množství enzymu, které oxiduje 1 mikromol kyseliny močové na alantoin za minutu při 25 °C.

(3) Hodnoty specifické aktivity byly odvozené z Lineweaverovy a Burkovy rovnice, při koncentraci substrátu ekvivalentní 60 μM .

(4) Reakční směsi byly složené z různých kombinací následujících zásobních roztoků

100mM sodnaboritanový pufr, pH 9,2

300 μM kyselina močová v 50 mM sodnaboritanovém pufru, pH 9,2

1 mg/ml BSA v 50mM sodnaboritanovém pufru, pH 9,2

(5) K_{cat} byla vypočítaná vydělením V_{max} (vypočítaná z odpovídajících Lineweaverových a Burkových rovnic) koncentrací urikázy v reakční směsi (vyjádřené v molárních ekvivalentech, na základě tetramerní molekulové hmotnosti urikázy).

Příklad 5

Konjugace urikázy s m-PEG (PEGylace)

Prasečí KS- ΔN urikáza byl konjugovaná s použitím m-PEG-NPC (monomethoxy poly(ethylenglykol)nitrofenyl karbonátu). Byly stanovené podmínky, při kterých vznikalo 2 až 12 vláken 5kDa, 10kDa, nebo 20kDa PEG na podjednotce urikázy. Do roztoku proteinu byl postupně přidáván m-PEG-NPC. Po ukončení přidávání byla reakční směs PEG urikáza / m-PEG-NPC inkubovaná při 2-8 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 16-18 hodin, aby se maximální počet volných vláken m-PEG konjugoval s urikázou.

Počet PEG vláken na monomer PEG-urikázy byl stanoven pomocí velikostně vylučující chromatografie na Superose 6 (SEC), s použitím standardů PEG a urikázy. Počet PEG vláken navázaných na podjednotku byl stanoven pomocí následujícího vztahu:

$$\text{PEG vláken/podjednotka} = \frac{3,42 \times \text{množství PEG v injikovaném vzorku } (\mu\text{g})}{\text{množství proteinu v injikovaném vzorku } (\mu\text{g})}$$

Koncentrace jednotek PEG a proteinu ve vzorku PEG-urikázy byla stanovena velikostně vylučující chromatografií (SEC) s použitím UV a sériově uspořádaných refrakčních (RI) detektorů (viz Kunitani et al., (1991)). Byly generované tři kalibrační křivky: křivka proteinu (absorpce měřená při 220 nm), křivka proteinu (měřená RI), a křivka PEG (měřená RI). Poté byly s použitím stejného systému analyzovány vzorky PEG-urikázy. Pro výpočet koncentrací PEG a proteinu bylo použito srovnání výsledných hodnot oblasti UV a RI maxim experimentálních vzorků s kalibračními křivkami. Index 3,42 je poměr mezi

molekulovou hmotností monomeru urikázy (34 192 Daltonů) a molekulovou hmotností 10kDa PEG.

Navázané PEG vylepšily rozpustnost urikázy v roztocích s fyziologickými hodnotami pH. Tabulka 5 ukazuje variabilitu mezi šaržemi produktu obsahujícího PEGylovanou prasečí urikázu KS-ΔN. Mezi počtem navázaných vláken PEG a uchovanou specifickou aktivitou (SA) enzymu je obecně inverzní vztah.

Tabulka 5. Enzymová aktivita konjugátů PEGylované prasečí KS-ΔN urikázy

Šarže konjugátu	PEG MW (kDa)	Vlákna PEG na podjednotku urikázy	Urikáza SA (U/mg)	SA procento kontroly
ΔN-prasečí KS			8,2	100
1-17 #	5	9,7	5,8	70,4
LP-17	10	2,3	7,8	94,6
1-15 #	10	5,1	6,4	77,9
13 #	10	6,4	6,3	76,9
14 #	10	6,5	6,4	77,5
5-15 #	10	8,8	5,4	65,3
5-17 #	10	11,3	4,5	55,3
4-17 #	10	11,8	4,4	53,9
1-18 #	20	11,5	4,5	54,4

Příklad 6

PEGylace urikázy s 1000D a 100 000D PEG

Prasečí urikáza KS-ΔN byla konjugovaná s použitím 1000D a 100 000D m-PEG-NPC postupem popsáným v Příkladu 5. Byly použity podmínky pro zavedení 2 až 11 vláken PEG na podjednotku urikázy. Po ukončení přidávání PEG byla reakční směs urikáza/m-PEG-NPC inkubovaná při 2-8 °C po dobu 16-18 hodin, aby se maximální počet volných vláken m-PEG konjugoval s urikázou.

Počet PEG vláken na monomer PEG-urikázy byl stanoven postupem popsáným výše.

Navázané PEG vylepšily rozpustnost urikázy v roztocích s fyziologickými hodnotami pH.

Příklad 7

Farmakokinetika konjugátu prasečí urikázy KS- Δ N s PEG

Pro stanovení optimálního rozsahu a velikosti PEGylace potřebné k poskytnutí terapeutického účinku byly provedeny biologické experimenty.

Při farmakokinetických studiích na krysách s použitím i.v. injekcí 0,4 mg (2U) na kg tělesné hmotnosti nemodifikované urikázy, podávaných v den 1 a den 8, byl poločas v cirkulaci 10 minut. Avšak studie rychlosti clearance na krysách u 2 až 11 x 10kDa PEGylované prasečí urikázy KS Δ N, i po 9 týdenních injekcích ukázaly, že clearance nezávisí na počtu PEG vláken (v tomto rozmezí) a zůstala během doby studie relativně konstantní (viz Tabulka 6, poločas 30 hodin). Rozdíly mezi týdny jsou v rámci experimentální chyby. Stejný profil je zřejmý po 9 injekcích 10 x 5kDa PEG a 10 x 20kDa PEG - urikázových konjugátů. Výsledky získané na krysím modelu ukazují, že biologické účinky byly podobné nezávisle na použitém rozsahu PEGylace urikázy.

Tabulka 6. Poločasy přípravků PEGylované prasečí KS-ΔN urikázy na kryších

	Rozsah modifikace (PEG vlákna na podjednotku urikázy)						
	5kDa PEG	10 kDa PEG					20kDa PEG
Týden	10x	2x	5x	7x	9x	11x	10x
1	25,7 ± 1,7 (5)	29,4 ± 3,4 (5)	37,7 ± 3,1 (5)	37,6 ± 3,9 (5)	36,9 ± 4,3 (5)	31,4 ± 4,3 (5)	21,6 ± 1,5 (5)
2	-	-	-	26,7 ± 3,0 (5)	28,4 ± 1,6 (5)	-	-
3	27,5 ± 3,8 (5)	29,0 ± 2,6 (5)	29,9 ± 11,7 (5)	32,7 ± 11,1 (5)	26,3 ± 4,7 (5)	11,8 ± 3,3 (5)	14,5 ± 2,7 (5)
4	-	-	27,1 ± 5,3 (5)	18,4 ± 2,2 (4)	19,7 ± 5,6 (4)	-	-
5	28,6 ± 1,7 (5)	22,5 ± 2,7 (5)	34,3 ± 3,9 (4)	37,3 ± 3,0 (5)	30,4 ± 3,6 (5)	30,5 ± 1,3 (5)	19,3 ± 2,5 (5)
6	-	-	35,4 ± 3,1 (14)	27,1 ± 3,6 (13)	30,7 ± 2,9 (13)	-	-
7	16,5 ± 4,9 (5)	32,5 ± 4,3 (5)	-	-	-	16,12 ± 2,7 (5)	25,8 ± 2,5 (5)
8	-	-	-	-	-	-	-
9	36,8 ± 4,0 (15)	28,7 ± 2,7 (15)	34,0 ± 2,4 (13)	24,2 ± 3,4 (13)	31,0 ± 2,6 (13)	29,3 ± 1,4 (15)	26,7 ± 0,5 (15)

Poznámky k Tabulce 6: Výsledky jsou vyznačené v hodinách ± střední chyba. Čísla v závorkách udávají počet testovaných zvířat.

Krysám byly týdně podávány i.v. injekce 0,4 mg/kilogram tělesné hmotnosti prasečí urikázy KS-ΔN, jejíž modifikace jsou vyznačené v tabulce. V každé skupině bylo nejprve 15 krys, které byly střídavě odebírané v podskupinách po 5. V průběhu studie kvůli anestezii několik krys zemřelo. Poločasy byly stanoveny měřením urikázové aktivity (kolorimetrické stanovení) ve vzorcích plazmy odebíraných po 5 minutách a 6, 24 a 48 hodin po injekci.

Tabulka 5 popisuje šarže PEGylované urikázy použité ve studii.

Studie biodostupnosti 6 x 5kDa PEGylované prasečí urikázy KS-ΔN u králíků naznačují, že po první injekci je poločas v cirkulaci $98,2 \pm 1,8$ hodiny (i.v.) a biodostupnost

po i.m. a podkožní (s.c.) injekci byla 71 % a 52 %. Po druhé i.m. a s.c. injekci byly však u všech králíků detekovány signifikantní titry protilátek, a po následných injekcích byla clearance zrychlená. Injekce stejného konjugátu u krys poskytla výsledný poločas $26 \pm 1,6$ hodiny (i.v.) a biodostupnost po i.m. a s.c. injekcích byla 33 % a 22 %.

Studie na krysách prováděné s 9 x 10kDa PEGylovanou prasečí urikázou KS-ΔN naznačují, že po první injekci je poločas v cirkulaci 42,4 hodiny (i.v.) a biodostupnost po i.m. a s.c. injekci byla 28,9 % a 14,5 % (viz Obrázek 5 a Tabulka 7). Po čtvrté injekci byl poločas v cirkulaci $32,1 \pm 2,4$ hodiny a biodostupnost po i.m. a s.c. injekci byla 26,1 % a 14,9 %.

Podobné farmakokinetické studie prováděné u králíků s 9 x 10kDa PEGylovanou prasečí urikázou KS-ΔN naznačují, že následně po injekci tohoto konjugátu (po dobu 4 týdnů byla podávána injekce dvakrát týdně) nebyla žádná zrychlená clearance pozorovaná. U těchto zvířat byl po první injekci poločas v cirkulaci 88,5 hodiny (i.v.) a biodostupnost po i.m. a s.c. injekci byla 98,3 % a 84,4 % (viz Obrázek 6 a Tabulka 7). Po čtvrté injekci byl poločas v cirkulaci $141,1 \pm 15,4$ hodiny a biodostupnost po i.m. a s.c. injekcích byla 85 % a 83 %.

Podobně byly provedeny studie s 9x10 kDa PEGylovanou prasečí urikázou KS-ΔN pro stanovení biodostupnosti u psů beagů (v každé skupině byli 2 samci a 2 samice). Po první i.v. injekci byl naměřen poločas v cirkulaci $70 \pm 11,7$ hodiny a biodostupnost po i.m. a s.c. injekcích byla 69,5 % a 50,4 % (viz Obrázek 7 a Tabulka 7).

Byly provedeny studie s přípravky obsahujícími 9 x 10kDa PEGylovanou prasečí urikázu KS-ΔN na prasatech. Pro i.v., s.c. a i.m. způsoby podávání byla použita tři zvířata ve skupině. Po první i.v. injekci byl naměřen poločas v cirkulaci 178 ± 24 hodiny a biodostupnost po i.m. a s.c. injekcích byla 71,6 % a 76,8 % (viz Obrázek 8 a Tabulka 7).

Tabulka 7. Farmakokinetická studie provedená s 9x10 kDa PEGylované prasečí KS- Δ N urikázou

Injekce #	Poločas (hodiny)	Biodostupnost	
	i.v.	i.m.	s.c.
Krissy			
1	42,4 $\pm$ 4,3	28,9 %	14,5 %
2	24,1 $\pm$ 5,0	28,9 %	14,5 %
4	32,1 $\pm$ 2,4	26,1 %	14,9 %
Králíci			
1	88,5 $\pm$ 8,9	98,3 %	84,4 %
2	45,7 $\pm$ 40,6	100 %	100 %
4	141,1 $\pm$ 15,4	85 %	83 %
Psi			
1	70,0 $\pm$ 11,7	69,5 %	50,4 %
Prasata			
1	178 $\pm$ 24	71,6 %	76,8 %

Studie absorpce, distribuce, metabolismu a vylučování (ADME) byly provedeny po podání 9 x 10kDa PEGylované prasečí urikázy KS- Δ N s použitím 125 I způsobem dle Boltana & Huntera. Značený konjugát byl injikován 7 skupinám po 4 krysách (2 samci a 2 samice). Distribuce radioaktivity byla analyzována po 1 hodině a každých 24 hodin po dobu 7 dní (s výjimkou pro den 5). Všechny skupiny byly postupně usmrceny a byly vyjmuty a analyzovány různé orgány. Sedmá skupina byla držena v metabolické kleci, ze které byla sbírána moč a výkaly. Distribuce látky ve zvířecím těle byla určena po změření celkové radioaktivity v každém orgánu a poměrné části (v ledvinách, játrech, plicích a slezině), která se srážela s TCA (tzn. navázaný protein, normalizováno na velikost orgánu). Žádný z vyjmutých orgánů neměl specifickou radioaktivitu vyšší než ostatní, takže žádná významná akumulace ani v játrech nebo ledvinách pozorována nebyla. Do 7. dne bylo vyloučeno 70 % radioaktivity.

Příklad 8

Výsledky klinické studie

Randomizovaná, otevřená, multicentrická studie s paralelní skupinou byla provedena za účelem získání urátové odezvy a farmakokinetického a bezpečnostního profilu PEG-urikázy (Purikase®, Safient Pharmaceuticals) u lidských pacientů s hyperurikémií a těžkou dnou, u kterých nebyla odezva na konvenční léčbu nebo k této léčbě nebyli tolerantní. Průměrná délka choroby byla 14 let a 70 % studované populace trpělo jedním nebo více tofy.

Při této studii bylo 41 pacientů (průměrný věk 58,1 let) randomizováno pro 12-týdenní léčbu intravenózní PEG-urikázou v jednom ze čtyř dávkovacích režimů: 4 mg každé dva týdny (7 pacientů), 8 mg každé dva týdny (8 pacientů), 8 mg každé čtyři týdny (13 pacientů), nebo 12 mg každé čtyři týdny (13 pacientů). V definovaných intervalech byla měřena aktivita urikázy v plazmě a hladiny urátů. Z analýzy aktivity urikázy a hladiny urátů byly odvozené farmakokinetické parametry, střední koncentrace urátů v plazmě a v procentech byla vyjádřena doba, po kterou byly uráty v plazmě nižší nebo rovné 6 mg/dl.

Největší pokles hladiny PUA pod 6 mg/dl po 92 % doby léčby byl zaznamenán u pacientů, kteří dostávali 8 mg PEG-urikázy každé dva týdny (před zahájením léčby byla koncentrace urátů v plazmě 9,1 mg/dl vs. střední koncentrace urátů v plazmě 1,4 mg/dl po 12 týdnech).

Také u dalších skupin léčených jinými dávkami PEG-urikázy bylo pozorováno podstatné a trvalé snížení hladiny urátů v plazmě: PUA nižší než 6 mg/ml po 86 % doby léčby ve skupině dostávající 8 mg každé čtyři týdny (koncentrace urátů v plazmě před zahájením léčby 9,1 mg/dl vs. průměrná koncentrace urátů v plazmě 2,6 mg/dl po 12 týdnech), PUA nižší než 6 mg/ml po 84 % doby léčby ve skupině dostávající 12 mg každé čtyři týdny (koncentrace urátů v plazmě před zahájením léčby 8,5 mg/dl vs. průměrná koncentrace urátů v plazmě 2,6 mg/dl po 12 týdnech), a PUA nižší než 6 mg/ml po 73 % doby léčby ve skupině dostávající 4 mg každé dva týdny (koncentrace urátů v plazmě před zahájením léčby 7,6 mg/dl vs. průměrná koncentrace urátů v plazmě 4,2 mg/dl po 12 týdnech).

Během prvních 24 hodin dávkování PEG-urikázy byl maximální procentuální pokles kyseliny močové v plazmě 72 % z výchozí hodnoty u subjektů, kterým byly podávány 4 mg / 2 týdny (p rovno .0002); 94 % u subjektů, kterým bylo podáváno 8 mg / 2 týdny (p menší než .0001), 87 % u subjektů, kterým bylo podáváno 8 mg / 4 týdny (p menší než .0001), a 93 % u subjektů, kterým bylo podáváno 12 mg / 4 týdny (p menší než .0001).

Během 12-týdenní léčby byl procentuální pokles kyseliny močové v plazmě z výchozí hodnoty 38 % u subjektů, kterým byly podávány 4 mg / 2 týdny (p rovno .0002), 86 % u subjektů, kterým bylo podáváno 8 mg / 2 týdny (p menší než .0001), 58 % u subjektů, kterým bylo podáváno 8 mg / 4 týdny (p rovno .0003) a 67 % u subjektů, kterým bylo podáváno 12 mg / 4 týdny (p menší než .0001).

Překvapivě se u některých subjektů, kterým byla podávána PEG-urikáza, projevil vedlejší účinek spojený s infuzí, tzn. reakce na infuzi. Tyto reakce se vyskytly u 14 % z celkového počtu infuzí.

Plné znění všech zde citovaných odkazů je zde zahrnuto formou odkazu ve smyslu stejného rozsahu, jako by zde bylo u každé individuální publikace nebo patentu nebo patentové přihlášky specificky uvedeno, že je začleněná formou odkazu ve smyslu plného znění.

Jak bude odborníkovi v oboru zřejmé, u předkládaného vynálezu lze provést mnoho modifikací a variací, aniž by se překročil jeho duch nebo rozsah. Zde popsaná specifická provedení jsou nabídnuta pouze jako ilustrativní příklad a vynález je limitován pouze přiloženými nároky společně s plným rozsahem analogie podstaty, na který jsou nároky vedeny.

Průmyslová využitelnost

Geneticky modifikované proteiny s urikolytickou aktivitou připravené podle předkládaného vynálezu jsou použitelné ke snížení hladiny kyseliny močové v biologické tekutině včetně krve.

Seznam sekvencí

<110> Savient Pharmaceuticals, Inc.

Hartman, Jacob

Mendelovitz, Simona

<120> Variantní formy urát oxidázy a jejich použití

<130> 103864-146638

<150> US 60/670 573

<151> 2005-04-11

<160> 16

<170> Patentní verze 3.3

<210> 1

<211> 36

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Urikáza z prasečích jater (sensní)

<400> 1

gcgcgaattc catggctcat taccgtaatg actaca

36

<210> 2

<211> 40

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Urikáza z prasečích jater (antisensní)

<400> 2

gcgctctaga agcttccatg gtcacagcct tgaagtcagc

40

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Urikáza z pavíáních jater DH3 (sensní)

<400> 3

gcgcgaattc catggccac taccataaca actat

35

<210> 4

<211> 40

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Urikáza z pavíáních jater DH3 (antisensní)

<400> 4

gcgcccattg tctagatcac agtcttgaag acaacttct

40

<210> 5

<211> 36

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> urikáza PBC- Δ NC (sensní)

<400> 5

gcgcatatga cttacaaaaa gaatgatgag gtagag

36

<210> 6

<211> 54

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> urikáza PBC- Δ NC (antisensní)

<400> 6

ccgtctagat taagacaact tcctcttgac tgtaccagta attttccgt atgg

54

<210> 7

<211> 299

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Prasečí-KS- Δ N

<400> 7

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

Thr Gln Ser Gly Phe Glu Gly Phe Ile Lys Asp Gln Phe Thr Thr Leu
165 170 175

Pro Glu Val Lys Asp Arg Cys Phe Ala Thr Gln Val Tyr Cys Lys Trp
180 185 190

Arg Tyr His Gln Gly Arg Asp Val Asp Phe Glu Ala Thr Trp Asp Thr
195 200 205

Val Arg Ser Ile Val Leu Gln Lys Phe Ala Gly Pro Tyr Asp Lys Gly
210 215 220

Glu Tyr Ser Pro Ser Val Gln Lys Thr Leu Tyr Asp Ile Gln Val Leu
225 230 235 240

Thr Leu Gly Gln Val Pro Glu Ile Glu Asp Met Glu Ile Ser Leu Pro
245 250 255

Asn Ile His Tyr Leu Asn Ile Asp Met Ser Lys Met Gly Leu Ile Asn
260 265 270

Lys Glu Glu Val Leu Leu Pro Leu Asp Asn Pro Tyr Gly Lys Ile Thr
275 280 285

Gly Thr Val Lys Arg Lys Leu Ser Ser Arg Leu
290 295

<210> 8

<211> 298

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Prasečí-KS-ΔN bez startovacího Met

<400> 8

Thr Tyr Lys Lys Asn Asp Glu Val Glu Phe Val Arg Thr Gly Tyr Gly
1 5 10 15

Lys Asp Met Ile Lys Val Leu His Ile Gln Arg Asp Gly Lys Tyr His
20 25 30

Ser Ile Lys Glu Val Ala Thr Thr Val Gln Leu Thr Leu Ser Ser Lys
35 40 45

Lys Asp Tyr Leu His Gly Asp Asn Ser Asp Val Ile Pro Thr Asp Thr
50 55 60

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

60

ataaaagttc tccatattca gcgagatgga aaatatcaca gcattaaaga ggtggcaact	120
acagtgaac tgactttgag ctccaaaaa gattacctgc atggagacaa ttcagatgtc	180
atccctacag acaccatcaa gaacacagtt aatgtcctgg cgaagttcaa aggcacaaa	240
agcatagaaa cttttgctgt gactatctgt gagcatttcc tttcttcctt caagcatgtc	300
atcagagctc aagtctatgt ggaagaagtt ccttgaagc gttttgaaa gaatggagtt	360
aagcatgtcc atgcatttat ttatactct actggaacgc acttctgtga ggttgaacag	420
ataaggaatg gacctccagt cattcattct ggaatcaaag acctaaaagt cttgaaaaca	480
acccagtctg gctttgaagg attcatcaag gaccagttca ccacctccc tgaggagaag	540
gaccggtgct ttgccacca agtggtactgc aaatggcgct accaccaggg cagagatgtg	600
gactttgagg ccacctggga cactgttagg agcattgtcc tgcagaaatt tgctgggccc	660
tatgacaaa gcgagtactc gccctctgtc cagaagacac tctatgacat ccagggtgtc	720
accctgggccc aggttcctga gatagaagat atggaaatca gcctgccaaa tattcactac	780
ttaaacaatg acatgtccaa aatgggactg atcaacaagg aagaggtctt gctaccttta	840
gacaatccat atggaaaaat tactggtaca gtcaagagga agttgtcttc aagactg	897

<210> 10

<211> 894

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Prasečí-KS-ΔNA bez startovacího ATG

<400> 10

acttacaaaa	agaatgatga	ggtagagttt	gtccgaactg	gctatgggaa	ggatatgata	60
aaagtctctc	atattcagcg	agatggaaaa	tatcacagca	ttaaagaggt	ggcaactaca	120
gtgcaactga	ctttgagctc	caaaaaagat	tacctgcatg	gagacaattc	agatgtcatc	180
cctacagaca	ccatcaagaa	cacagttaat	gtcctggcga	agttcaaagg	catcaaaagc	240
atagaaactt	ttgctgtgac	tatctgtgag	catttccttt	cttccttcaa	gcatgtcatc	300
agagctcaag	tctatgtgga	agaagttcct	tggaagcggt	ttgaaaagaa	tggagttaag	360
catgtccatg	catttattta	tactcctact	ggaacgcact	tctgtgaggt	tgaacagata	420
aggaatggac	ctccagtcac	tcattctgga	atcaaagacc	taaaagtctt	gaaaacaacc	480
cagtctggct	ttgaaggatt	catcaaggac	cagttcacca	ccctccctga	ggtgaaggac	540
cggtgctttg	ccaccaagt	gtactgcaaa	tggcgctacc	accagggcag	agatgtggac	600
tttgaggcca	cctgggacac	tgtaggagc	attgtcctgc	agaaatttgc	tgggccctat	660
gacaaaggcg	agtactcgcc	ctctgtccag	aagacactct	atgacatcca	ggtgctcacc	720
ctgggccagg	ttcctgagat	agaagatatg	gaaatcagcc	tgccaaatat	tcactactta	780
aacatagaca	tgtccaaaat	gggactgatc	aacaaggaag	aggtcttgct	acctttagac	840
aatccatatg	gaaaaattac	tggtacagtc	aagaggaagt	tgtcttcaag	actg	894

<210> 11

<211> 304

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 11

17.12.07

Met Ala His Tyr Arg Asn Asp Tyr Lys Lys Asn Asp Glu Val Glu Phe
 1 5 10 15
 Val Arg Thr Gly Tyr Gly Lys Asp Met Ile Lys Val Leu His Ile Gln
 20 25 30
 Arg Asp Gly Lys Tyr His Ser Ile Lys Glu Val Ala Thr Ser Val Gln
 35 40 45
 Leu Thr Leu Ser Ser Lys Lys Asp Tyr Leu His Gly Asp Asn Ser Asp
 50 55 60
 Val Ile Pro Thr Asp Thr Ile Lys Asn Thr Val Asn Val Leu Ala Lys
 65 70 75 80
 Phe Lys Gly Ile Lys Ser Ile Glu Thr Phe Ala Val Thr Ile Cys Glu
 85 90 95
 His Phe Leu Ser Ser Phe Lys His Val Ile Arg Ala Gln Val Tyr Val
 100 105 110
 Glu Glu Val Pro Trp Lys Arg Phe Glu Lys Asn Gly Val Lys His Val
 115 120 125
 His Ala Phe Ile Tyr Thr Pro Thr Gly Thr His Phe Cys Glu Val Glu
 130 135 140
 Gln Ile Arg Asn Gly Pro Pro Val Ile His Ser Gly Ile Lys Asp Leu
 145 150 155 160
 Lys Val Leu Lys Thr Thr Gln Ser Gly Phe Glu Gly Phe Ile Lys Asp
 165 170 175
 Gln Phe Thr Thr Leu Pro Glu Val Lys Asp Arg Cys Phe Ala Thr Gln
 180 185 190
 Val Tyr Cys Lys Trp Arg Tyr His Gln Gly Arg Asp Val Asp Phe Glu
 195 200 205
 Ala Thr Trp Asp Thr Val Arg Ser Ile Val Leu Gln Lys Phe Ala Gly
 210 215 220
 Pro Tyr Asp Lys Gly Glu Tyr Ser Pro Ser Val Gln Lys Thr Leu Tyr
 225 230 235 240

<400> 12

17.12.07

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

Pro Glu Val Lys Asp Arg Cys Phe Ala Thr Gln Val Tyr Cys Lys Trp
 180 185 190

Arg Tyr His Gln Gly Arg Asp Val Asp Phe Glu Ala Thr Trp Asp Thr
 195 200 205

Val Arg Ser Ile Val Leu Gln Lys Phe Ala Gly Pro Tyr Asp Lys Gly
 210 215 220

Glu Tyr Ser Pro Ser Val Gln Lys Thr Leu Tyr Asp Ile Gln Val Leu
 225 230 235 240

Ser Leu Ser Arg Val Pro Glu Ile Glu Asp Met Glu Ile Ser Leu Pro
 245 250 255

Asn Ile His Tyr Phe Asn Ile Asp Met Ser Lys Met Gly Leu Ile Asn
 260 265 270

Lys Glu Glu Val Leu Leu Pro Leu Asp Asn Pro Tyr Gly Lys Ile Thr
 275 280 285

Gly Thr Val Lys Arg Lys Leu Ser
 290 295

<210> 13

<211> 295

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> PBC-ΔNC bez startovacího Met

<400> 13

Thr Tyr Lys Lys Asn Asp Glu Val Glu Phe Val Arg Thr Gly Tyr Gly
 1 5 10 15

Lys Asp Met Ile Lys Val Leu His Ile Gln Arg Asp Gly Lys Tyr His
 20 25 30

Ser Ile Lys Glu Val Ala Thr Thr Val Gln Leu Thr Leu Ser Ser Lys
 35 40 45

Lys Asp Tyr Leu His Gly Asp Asn Ser Asp Val Ile Pro Thr Asp Thr
 50 55 60

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

Ile Glu Thr Phe Ala Val Thr Ile Cys Glu His Phe Leu Ser Ser Phe
 85 90 95

Lys His Val Ile Arg Ala Gln Val Tyr Val Glu Glu Val Pro Trp Lys
100 105 110

Arg Phe Glu Lys Asn Gly Val Lys His Val His Ala Phe Ile Tyr Thr
115 120 125

Pro Thr Gly Thr His Phe Cys Glu Val Glu Gln Ile Arg Asn Gly Pro
130 135 140

Pro Val Ile His Ser Gly Ile Lys Asp Leu Lys Val Leu Lys Thr Thr
145 150 155 160

Gln Ser Gly Phe Glu Gly Phe Ile Lys Asp Gln Phe Thr Thr Leu Pro
165 170 175

Glu Val Lys Asp Arg Cys Phe Ala Thr Gln Val Tyr Cys Lys Trp Arg
180 185 190

Tyr His Gln Gly Arg Asp Val Asp Phe Glu Ala Thr Trp Asp Thr Val
195 200 205

Arg Ser Ile Val Leu Gln Lys Phe Ala Gly Pro Tyr Asp Lys Gly Glu
210 215 220

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

Leu Ser Arg Val Pro Glu Ile Glu Asp Met Glu Ile Ser Leu Pro Asn
245 250 255

Ile His Tyr Phe Asn Ile Asp Met Ser Lys Met Gly Leu Ile Asn Lys
260 265 270

Glu Glu Val Leu Leu Pro Leu Asp Asn Pro Tyr Gly Lys Ile Thr Gly
275 280 285

Thr Val Lys Arg Lys Leu Ser
290 295

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> PBC-ΔNC (Fragment 44-56 PBC-ΔNC)

<400> 14

Ala Thr Thr Val Gln Leu Thr Leu Ser Ser Lys Lys Asp
1 5 10

<210> 15

<211> 936

<212> DNA

<213> Papio hamadryas (pavián hamadryas)

<400> 15

```

ccagaagaaa atggccgact accataacaa ctataaaaag aatgatgaat tggagtttgt      60
ccgaactggc tatgggaagg atatggtaaa agttctccat attcagcgag atggaaaata      120
tcacagcatt aaagagggtg caacttcagt gcaacttact ctgagttcca aaaaagatta      180
cctgcatgga gataattcag atatcatccc tacagacacc atcaagaaca cagttcatgt      240
cttggcaaag tttaagggaa tcaaaagcat agaagccttt ggtgtgaata tttgtgagta      300
ttttctttct tcttttaacc atgtaatccg agctcaagtc tacgtggaag aaatcccttg      360
gaagcgtctt gaaaagaatg gagttaagca tgtccatgca ttattcaca ctcccactgg      420
aacacacttc tgtgaagttg aacaactgag aagtggaccc cccgtcatta cttctggaat      480
caaagacctc aagggtcttg aaacaacaca gtctggattt gaaggtttca tcaaggacca      540
gttcaccacc ctccctgagg tgaaggaccg atgctttgcc acccaagtgt actgcaagtg      600
gcgctaccac cagtgcaggg atgtggactt cgaggctacc tggggcacca ttcgggacct      660
tgtcctggag aaatttgctg ggccctatga caaaggcgag tactaccct ctgtgcagaa      720
gaccctctat gatatccagg tgctctccct gagccgagtt cctgagatag aagatatgga      780
aatcagcctg ccaaacattc actacttcaa tatagacatg tccaaaatgg gtctgatcaa      840
caaggaagag gtcttgctgc cattagacaa tccatatgga aaaattactg gtacagtcaa      900
gaggaagttg tcttcaagac tgtgacattg tggcca                                936

```

<210> 16

<211> 304

<212> PRT

<213> Papio hamadryas (pavián hamadryas)

<400> 16

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

Val Arg Thr Gly Tyr Gly Lys Asp Met Val Lys Val Leu His Ile Gln
20 25 30

Arg Asp Gly Lys Tyr His Ser Ile Lys Glu Val Ala Thr Ser Val Gln
35 40 45

Leu Thr Leu Ser Ser Lys Lys Asp Tyr Leu His Gly Asp Asn Ser Asp
50 55 60

Ile Ile Pro Thr Asp Thr Ile Lys Asn Thr Val His Val Leu Ala Lys
65 70 75 80

Phe Lys Gly Ile Lys Ser Ile Glu Ala Phe Gly Val Asn Ile Cys Glu
85 90 95

17.12.07

Tyr Phe Leu Ser Ser Phe Asn His Val Ile Arg Ala Gln Val Tyr Val
 100 105 110

Glu Glu Ile Pro Trp Lys Arg Leu Glu Lys Asn Gly Val Lys His Val
 115 120 125

His Ala Phe Ile His Thr Pro Thr Gly Thr His Phe Cys Glu Val Glu
 130 135 140

Gln Leu Arg Ser Gly Pro Pro Val Ile Thr Ser Gly Ile Lys Asp Leu
 145 150 155 160

Lys Val Leu Lys Thr Thr Gln Ser Gly Phe Glu Gly Phe Ile Lys Asp
 165 170 175

Gln Phe Thr Thr Leu Pro Glu Val Lys Asp Arg Cys Phe Ala Thr Gln
 180 185 190

Val Tyr Cys Lys Trp Arg Tyr His Gln Cys Arg Asp Val Asp Phe Glu
 195 200 205

Ala Thr Trp Gly Thr Ile Arg Asp Leu Val Leu Glu Lys Phe Ala Gly
 210 215 220

Pro Tyr Asp Lys Gly Glu Tyr Ser Pro Ser Val Gln Lys Thr Leu Tyr
 225 230 235 240

Asp Ile Gln Val Leu Ser Leu Ser Arg Val Pro Glu Ile Glu Asp Met
 245 250 255

Glu Ile Ser Leu Pro Asn Ile His Tyr Phe Asn Ile Asp Met Ser Lys
 260 265 270

Met Gly Leu Ile Asn Lys Glu Glu Val Leu Leu Pro Leu Asp Asn Pro
 275 280 285

Tyr Gly Lys Ile Thr Gly Thr Val Lys Arg Lys Leu Ser Ser Arg Leu
 290 295 300

PATENTOVÉ NÁROKY

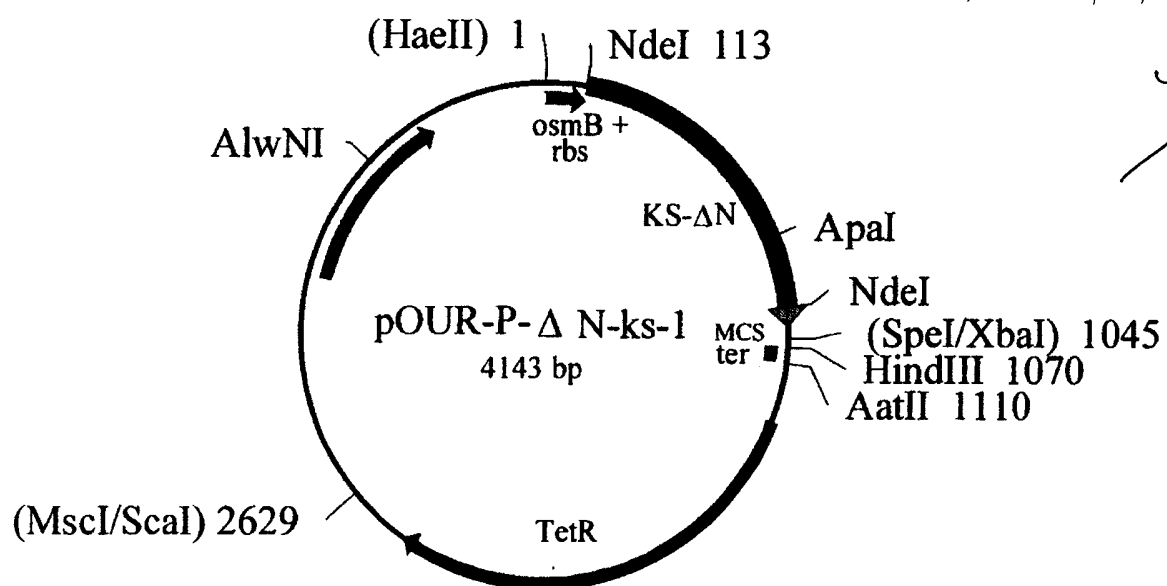
1. Izolovaná urikáza obsahující v poloze 8 až 287 aminokyselinovou sekvenci SEQ ID č. 7.
2. Urikáza podle nároku 1, obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID č. 8.
3. Urikáza podle nároku 1, která na aminovém konci dále obsahuje aminokyselinu, přičemž touto aminokyselinou je alanin, glycin, prolin, serin nebo threonin.
4. Urikáza podle nároku 1, která na aminovém konci dále obsahuje aminokyselinu, přičemž touto aminokyselinou je methionin.
5. Izolovaná urikáza obsahující v poloze 8 až 287 aminokyselinovou sekvenci SEQ ID č. 12.
6. Urikáza podle nároku 5, obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID č. 13.
7. Urikáza podle nároku 5, která na aminovém konci dále obsahuje aminokyselinu, přičemž touto aminokyselinou je alanin, glycin, prolin, serin nebo threonin.
8. Urikáza podle nároku 5, která na aminovém konci dále obsahuje aminokyselinu, přičemž touto aminokyselinou je methionin.
9. Urikáza podle nároku 1, kde urikáza je PEGylovaná urikáza.
10. Izolovaná nukleová kyselina obsahující aminokyselinovou sekvenci kódující urikázu vybranou ze skupiny skládající se z urikázy podle nároku 1, urikázy podle nároku 2, urikázy podle nároku 3, urikázy podle nároku 5, urikázy podle nároku 6 a urikázy podle nároku 7.
11. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 10, kde sekvence nukleových kyselin je operativně připojena k heterolognímu promotoru.

12. Nukleová kyselina podle nároku 10, kde promotor je promotor osmB.
13. Vektor obsahující nukleovou kyselinu podle nároku 11.
14. Hostitelská buňka obsahující vektor podle nároku 13.
15. Způsob přípravy urikázy, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se hostitelská buňka podle nároku 14 kultivuje za podmínek, kdy hostitelská buňka exprimuje sekvenci nukleových kyselin a exprimovaná urikáza se izoluje.

17.12.07

P 12007 700

~~75716~~



Obr. č. 1

```

1      ATG-----ACTTACAAAAGAATGATGAGGTAGAGTTTGTCCGAAGTGGC
1      M - - - - - T Y K K N D E V E F V R T G

61     TATGGGAAGGATATGATAAAAGTTCTCCATATTCAGCGAGATGGAAAATATCACAGCATT
21     Y G K D M I K V L H I Q R D G K Y H S I

121    AAAGAGGTGGCAACTACAGTGCAACTGACTTTGAGCTCCAAAAAGATTACCTGCATGGA
41     K E V A T T V Q L T L S S K K D Y L H G

181    GACAATTCAGATGTCATCCCTACAGACACCATCAAGAACACAGTTAATGTCCTGGCGAAG
61     D N S D V I P T D T I K N T V N V L A K

241    TTCAAAGGCATCAAAGCATAGAACTTTTGCTGTGACTATCTGTGAGCATTTCCTTTCT
81     F K G I K S I E T F A V T I C E H F L S

301    TCCTTCAAGCATGTCATCAGAGCTCAAGTCTATGTGGAAGAAGTTCCTTGAAGCGTTT
101    S F K H V I R A Q V Y V E E V P W K R F

361    GAAAAGAATGGAGTTAAGCATGTCCATGCATTTATTTATACTCCTACTGGAACGCACTTC
121    E K N G V K H V H A F I Y T P T G T H F

421    TGTGAGGTTGAACAGATAAGGAATGGACCTCCAGTCATTTCCTGGAATCAAAGACCTA
141    C E V E Q I R N G P P V I H S G I K D L

481    AAAGTCTTGAAAACAACCCAGTCTGGCTTTGAAGGATTCATCAAGGACCAGTTCACCACC
161    K V L K T T Q S G F E G F I K D Q F T T

541    CTCCCTGAGGTGAAGGACCGGTGCTTTGCCACCCAAGTGTACTGCAAATGGCGCTACCAC
181    L P E V K D R C F A T Q V Y C K W R Y H

601    CAGGGCAGAGATGTGGACTTTGAGGCCACCTGGGACACTGTTAGGAGCATTGTCTGCAAG
201    Q G R D V D F E A T W D T V R S I V L Q
      ApaI
      |
661    AAATTTGCTGGGCCCTATGACAAAGGCGAGTACTCGCCCTCTGTCCAGAAGACACTCTAT
221    K F A G P Y D K G E Y S P S V Q K T L Y

721    GACATCCAGGTGCTCACCCCTGGGCCAGGTTCTGAGATAGAAGATATGGAAATCAGCCTG
241    D I Q V L T L G Q V P E I E D M E I S L

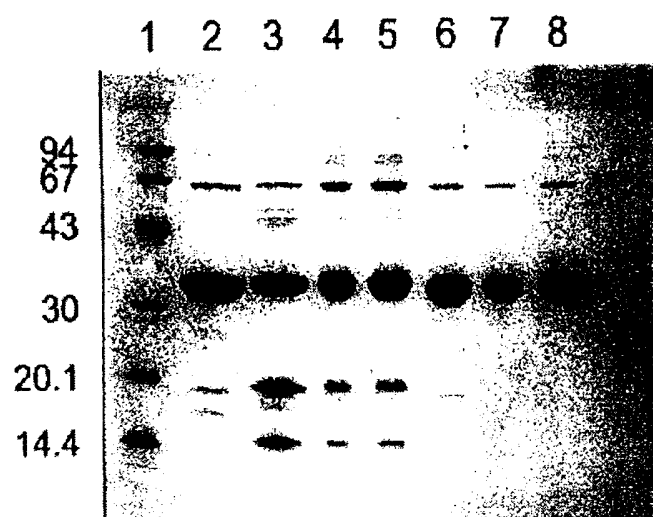
781    CCAAATATTCACACTTAAACATAGACATGTCCAAAATGGGACTGATCAACAAGGAAGAG
261    P N I H Y L N I D M S K M G L I N K E E
      NdeI
      |
841    GTCTTGCTACCTTTAGACAATCCATATGGAAAAATTACTGGTACAGTCAAGAGGAAGTTG
281    V L L P L D N P Y G K I T G T V K R K L
      EcoRI                               SpeI BamHI
      |                               | |
901    TCTTCAAGACTGTGAagccgaattccagcacactggcgccggttactagtggatcc
301    S S R L *

```

	20	40	60
Prasečí	MAHYRNDYKKNDEVEFVRTGYGKDMIKVLHIQRDGKYHSIKEVATSVQLTLSSKKDYLHG		
PBC-ΔNC	M-----TYKKNDEVEFVRTGYGKDMIKVLHIQRDGKYHSIKEVATTVQLTLSSKKDYLHG		
Prasečí-ks-ΔN	M-----TYKKNDEVEFVRTGYGKDMIKVLHIQRDGKYHSIKEVATTVQLTLSSKKDYLHG		
	*		*
	80	100	120
Prasečí	DNSDVIPTDTIKNTVNVLAKFKGIKSIETFAVTICEHFLSSFHKHVIRAQVYVEEVPWKRF		
PBC-ΔNC	DNSDVIPTDTIKNTVNVLAKFKGIKSIETFAVTICEHFLSSFHKHVIRAQVYVEEVPWKRF		
Prasečí-ks-ΔN	DNSDVIPTDTIKNTVNVLAKFKGIKSIETFAVTICEHFLSSFHKHVIRAQVYVEEVPWKRF		
	140	160	180
Prasečí	EKNGVKHVHAFIYTPGTGTHFCEVEQIRNGPPVIHSGIKDLKVLKTTQSGFEGFIKDQFTT		
PBC-ΔNC	EKNGVKHVHAFIYTPGTGTHFCEVEQIRNGPPVIHSGIKDLKVLKTTQSGFEGFIKDQFTT		
Prasečí-ks-ΔN	EKNGVKHVHAFIYTPGTGTHFCEVEQIRNGPPVIHSGIKDLKVLKTTQSGFEGFIKDQFTT		
	200	220	240
Prasečí	LPEVKDRCFATQVYCKWRYHQGRDVF EATWDTVRSIVLQKFAGPYDKGEYSPSVQKTLY		
PBC-ΔNC	LPEVKDRCFATQVYCKWRYHQGRDVF EATWDTVRSIVLQKFAGPYDKGEYSPSVQKTLY		
Prasečí-ks-ΔN	LPEVKDRCFATQVYCKWRYHQGRDVF EATWDTVRSIVLQKFAGPYDKGEYSPSVQKTLY		
	260	280	300
Prasečí	DIQVLTGQVPEIEDMEISLPNIHYLNIDMSKMGLINKEEVLLPLDNPYGRITGTVKRKL		
PBC-ΔNC	DIQVLSLSRVPEIEDMEISLPNIHYFNIDMSKMGLINKEEVLLPLDNPYGKITGTVKRKL		
Prasečí-ks-ΔN	DIQVLTGQVPEIEDMEISLPNIHYLNIDMSKMGLINKEEVLLPLDNPYGKITGTVKRKL		
	° °°	°	*
Prasečí	TSRL		
PBC-ΔNC	S---		
Prasečí-ks-ΔN	SSRL		
	*		

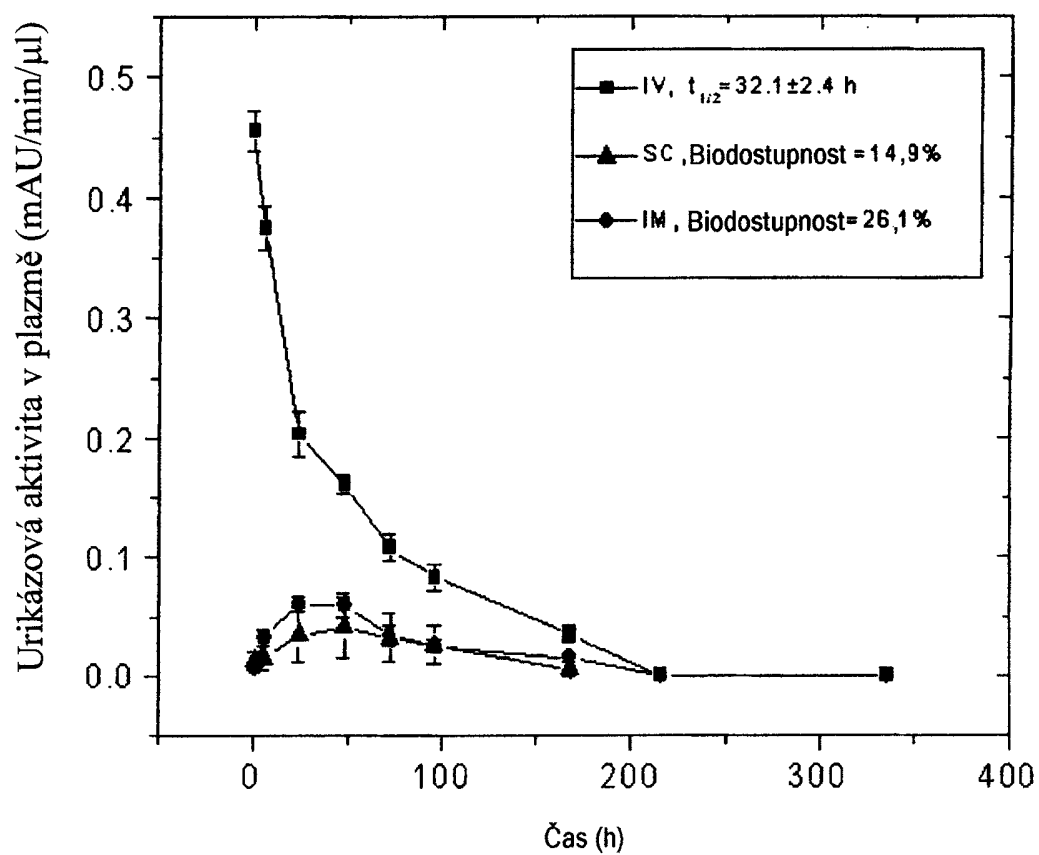
Obr. č. 3

17.12.07

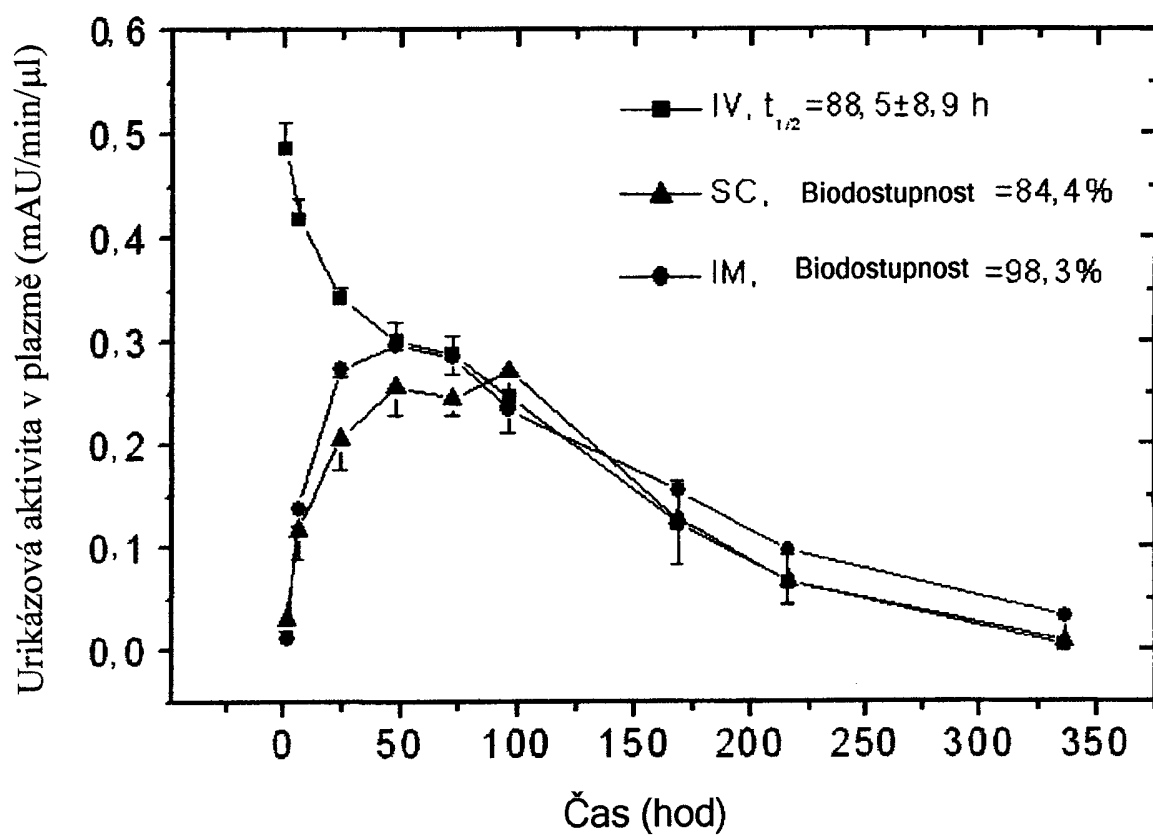


Obr. č. 4

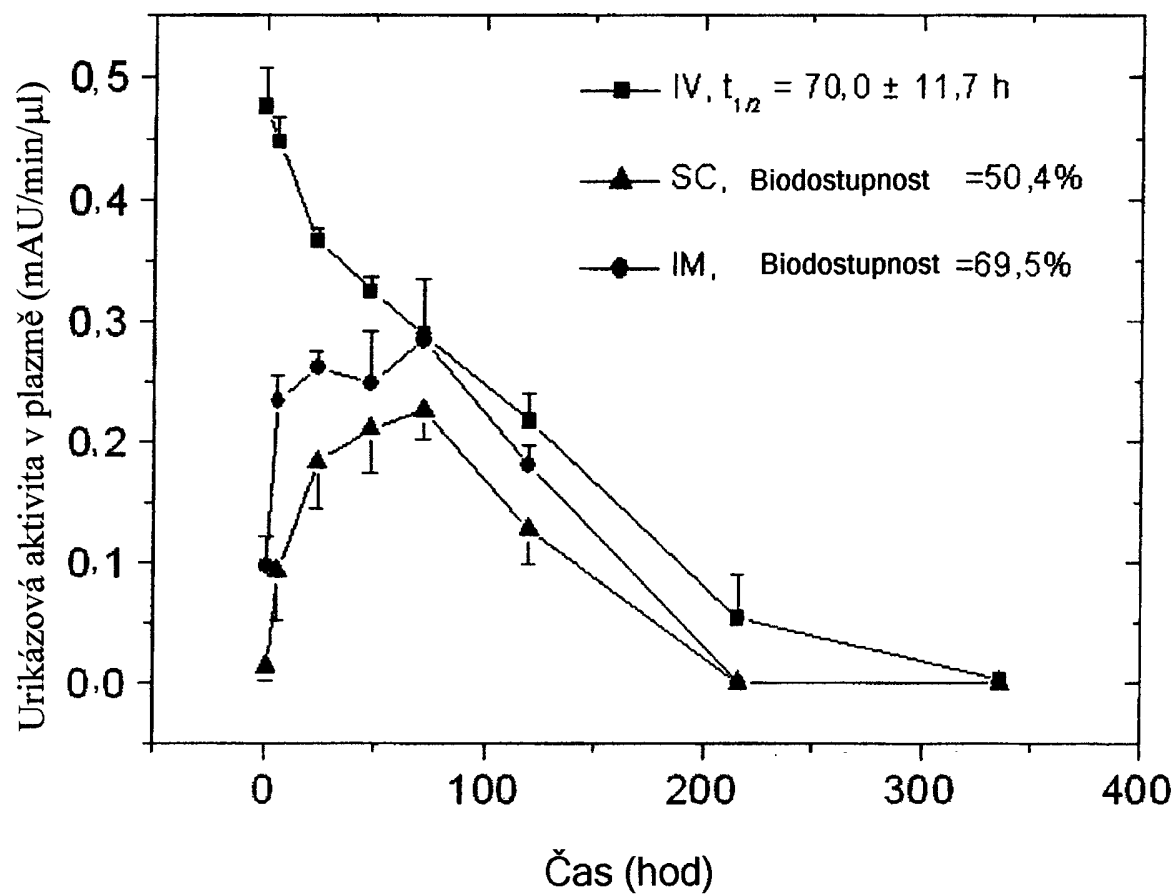
17.12.07



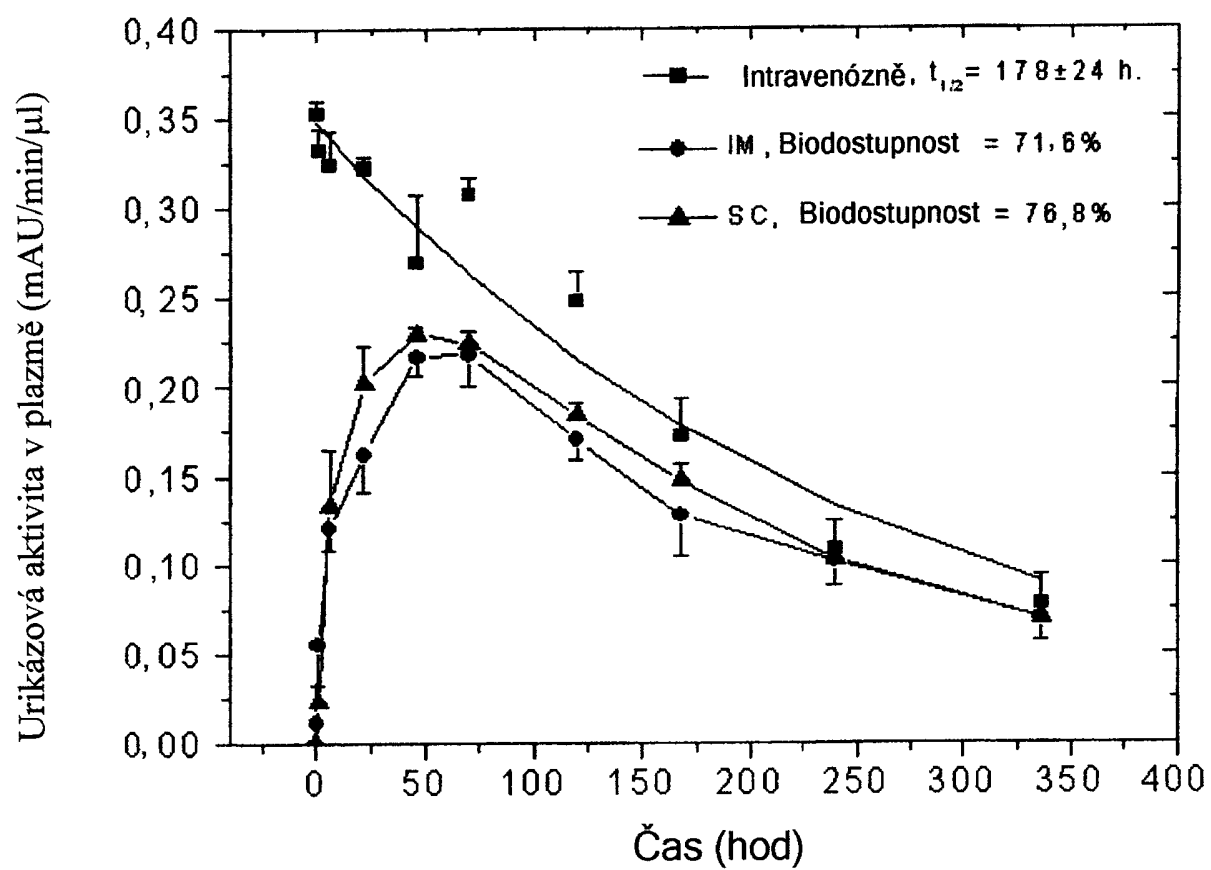
Obr. č. 5



Obr. č. 6



Obr. č. 7



Obr. č. 8