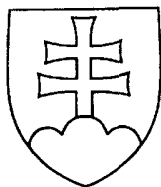


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

287687

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. (2011.01):

C12N 9/00
C12N 15/00
C07K 16/00
A61K 38/00

- (21) Číslo prihlášky: **753-99**
(22) Dátum podania prihlášky: **5. 12. 1997**
(24) Dátum nadobudnutia účinkov patentu: **6. 6. 2011**
Vestník ÚPV SR č.: **6/2011**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **60/032 254**
60/032 783
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **6. 12. 1996**
6. 12. 1996
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **US, US**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **12. 2. 2001**
Vestník ÚPV SR č.: **02/2001**
(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **23. 5. 2011**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(67) Číslo pôvodnej prihlášky úžitkového vzoru v prípade odbočenia:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/US97/22331**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO98/24888**
(96) Číslo podania európskej patentovej prihlášky:

(73) Majiteľ: **AVENTIS PHARMACEUTICALS INC., Collegeville, PA, US;**

(72) Pôvodca: **Jaye Michael C., Glenside, PA, US;**
Doan Kim-Anh Thi, Audubon, PA, US;
Krawiec John A., Gulph Mills, PA, US;
Lynch Kevin J., Gurnee, IL, US;
Amin Dilip V., Lansdale, PA, US;
South Victoria J., Collegeville, PA, US;

(74) Zástupca: **Tomeš Pavol, Ing., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Izolovaný polypeptid kódovaný génom podobným génu pre lipázu, prostriedok majúci fosfolipázovú účinnosť, farmaceutický prostriedok, antigénny fragment a izolovaná nukleová kyselina, biologicky aktívny prostriedok, vektor, rekombinovaná hostiteľská bunka, prostriedok využiteľný na transfekciu cieľovej bunky, spôsob výroby polypeptidu a polypeptid takto vyrobený, protilátka, hybridomná bunka, spôsob in vitro sceeningu, spôsob in vitro enzymatickej hydrolýzy, použitie polypeptidu a protilátky a transgénna myš**

(57) Anotácia:

Je opísaný izolovaný polypeptid kódovaný génom podobným génu pre lipázu (LLG), kde uvedený polypeptid (a) sa viaže na heparín, (b) má homológiu s ľudskou lipoproteínovou lipázou a pečeneovou lipázou a (c) obsahuje 39 kD katalytickú doménu triacylglycerol-lipázovej rodiny, kde (i) tento izolovaný polypeptid obsahuje aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO:8 a zdanlivú molekulovú hmotnosť približne 55 kD na 10 % SDS-PAGE gélu, aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO:8 a zdanlivú molekulovú hmotnosť približne 68 kD na 10 % SDS-PAGE gélu alebo aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO:6 a zdanlivú molekulovú hmotnosť približne 40 kD na 10 % SDS-PAGE gélu; alebo (ii) 39 kD katalytickú doménu obsahujúcu aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO:10; alebo (iii) je tento izolovaný polypeptid kráľičieho pôvodu a obsahuje aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO:12. Tiež je opísaný prostriedok majúci fosfolipázovú činnosť obsahujúci tento polypeptid, farmaceutický prostriedok, antigénny fragment, izolovaná nukleová kyselina, biologicky aktívny prostriedok a

farmaceutický prostriedok obsahujúci túto izolovanú nukleovú kyselinu, vektor obsahujúci túto izolovanú nukleovú kyselinu a rekombinantné bunky obsahujúce tento vektor, prostriedok využiteľný na transfekciu cieľovej bunky, farmaceutický prostriedok obsahujúci tento vektor. Spôsob výroby polypeptidu a polypeptid takto pripravený, protilátka schopná špecifickej väzby na vyššie špecifikovaný izolovaný polypeptid a hybridomná bunka produkujúca túto protilátku, prostriedok poskytujúci naviazanie izolovaného polypeptidu na protilátku, farmaceutický prostriedok obsahujúci túto protilátku, spôsob *in vitro* screeningu LLG agonistov alebo antagonistov, spôsob *in vitro* enzymatickej hydrolýzy fosfatidylcholinesteru, použitie polypeptidu a protilátky na výrobu liečiva na zlepšenie sérového lipidového profilu a transgénna myš exprimujúca izolovaný polypeptid.

SK 287687 B6

Oblasť techniky

Vynález sa týka izolovaného polypeptidu kódovaného génom podobným génu pre lipázu, prostriedku majúceho fosfolipázovú účinnosť, ktorý obsahuje tento polypeptid a antigénny fragment tohto izolovaného polypeptidu. Ďalej je vynález zameraný na izolovaný imunizačný peptid a izolovanú nukleovú kyselinu kódujúcu izolovaný polypeptid kódovaný génom podobným génu na lipázu. Ďalej sa vynález týka biologicky aktívneho prostriedku a farmaceutického prostriedku obsahujúceho uvedenú izolovanú nukleovú kyselinu. Ďalej sa vynález týka vektora obsahujúceho túto izolovanú nukleovú kyselinu a rekombinantnej bunky obsahujúcej tento vektor. Ďalej sa vynález týka prostriedku využiteľného na transfekáciu cieľovej bunky. Ďalej sa vynález týka farmaceutického prostriedku obsahujúceho vyššie špecifikovaný vektor. Ďalej sa vynález týka spôsobu výroby polypeptidu a polypeptidu takto pripraveného. Okrem toho sa vynález týka protilátky schopnej špecifickej väzby na vyššie špecifikovaný izolovaný polypeptid a hybridomné bunky produkujúce túto protilátku. Ďalej sa vynález týka prostriedku poskytujúceho naviazanie izolovaného polypeptidu podľa vynálezu na protilátku. Ďalej sa vynález týka farmaceutického prostriedku obsahujúceho vyššie špecifikovanú protilátku. Ďalej sa vynález týka spôsobu skríningu LLG (gén podobný génu na lipázu) agonistov alebo antagonistov. Ďalej sa vynález týka spôsobu *in vitro* enzymatickej hydrolýzy fosfatidylcholinesteru. Ďalej sa vynález týka použitia polypeptidu a použitia protilátky podľa vynálezu na výrobu liečiva na zlepšenie sérového lipidového profilu u ľudí a iných živočíchov. A konečne sa vynález týka izolovaného polypeptidu, ktorý je králičieho pôvodu a izolovanej nukleovej kyseliny kódujúcej tento polypeptid a transgénnej myši exprimujúcej izolovaný polypeptid podľa vynálezu.

Konkrétne je možné uviesť, že sa vynález sa týka polypeptidov rodiny triacylglycerol-lipázy, nukleových kyselín, kódujúcich uvedené polypeptidy, antisense sekvencií odvodených od uvedených nukleových kyselín a protilátok proti uvedeným polypeptidom. Rovnako do rozsahu vynálezu patrí príprava uvedených polypeptidov s použitím rekombinantnej technológie a použitie uvedených polypeptidov na vyhľadávanie agonistov a antagonistov uvedených polypeptidov. Vynález sa tiež týka spôsobov na terapeutické použitie takých polypeptidov a nukleových kyselín kódujúcich tieto polypeptidy vo farmaceutických prostriedkoch vrátane prostriedkov na génovú terapiu, na liečbu ochorení lipidového a lipoproteínového metabolizmu.

Doterajší stav techniky

A) Lipidy

Lipidy sú vo vode nerozpustné organické biomolekuly, ktoré sú základnými zložkami podieľajúcimi sa na rôznych biologických funkciách vrátane skladovania, transportu a metabolizmu energie a štruktúry a kvapalnosti membrán. Ľudia a iné živočíchy získavajú lipidy z dvoch zdrojov: niektoré lipidy sú prijímané potravou ako potravinové tuky a oleje a iné lipidy človek alebo živočích biosyntetizuje. U cicavcov tvoria lipidy najmenej 10 % telesnej hmotnosti, z ktorých väčšina je vo forme triacylglycerolov.

Triacylglyceroly, tiež známe ako triglyceridy alebo triacylglyceridy, sú tvorené tromi masťnými kyselinami esterifikovanými na glycerol. Potravinové triacylglyceroly sa skladujú v tukovom tkanive ako zdroj energie, alebo sa hydrolyzujú v tráviacej sústave triacylglycerol-lipázami, z ktorých najvýznamnejšia je pankreatická lipáza. Triacylglyceroly sa transportujú medzi tkanivami vo forme lipoproteínov.

Lipoproteíny sú micelovité zoskupenia, ktoré sa nachádzajú v plazme a obsahujú rôzne pomery rôznych typov lipidov a proteínov (nazývaných apoproteíny). Existuje päť hlavných tried plazmatických lipoproteínov, ktorých hlavnou funkciou je transport lipidov. Tieto triedy sú (podľa zvyšujúcej sa hustoty): chylomikróny, lipoproteíny s veľmi nízkou hustotou (VLDL), lipoproteíny so strednou hustotou (IDL), lipoproteíny s nízkou hustotou (LDL) a lipoproteíny s vysokou hustotou (HDL). Hoci sa spoločne s každou triedou lipoproteínov vyskytujú rôzne typy lipidov, transportuje každá trieda predovšetkým jeden typ lipidov: triacylglyceroly opísané skôr sa transportujú v chylomikrónoch, VLDL a IDL, zatiaľ čo fosfolipidy a estery cholesterolu sa transportujú v HDL a LDL, v príslušnom poradí.

Fosfolipidy sú diestery masťných kyselín s glycerofosfátom, ktoré tiež obsahujú polárnu skupinu naviazanú na fosfát. Fosfolipidy sú významnou štrukturálnou zložkou bunkových membrán. Fosfolipidy sa hydrolyzujú enzýmami nazývanými fosfolipázy. Fosfatidylcholín, príklad fosfolipidu, je hlavnou zložkou membrán väčšiny eukaryotických buniek.

Cholesterol je metabolický prekursor steroidných hormónov a žľových kyselín tak, ako je základnou zložkou bunkových membrán. Ľudia a iné živočíchy prijímajú cholesterol potravou a tiež sa syntetizuje v pečeni a v iných tkanivách. Cholesterol sa transportuje medzi tkanivami vo forme cholesteryl-esterov v LDL a iných lipoproteínoch.

Membrány obklopujú každú živú bunku a slúžia ako bariéra medzi intracelulárnym a extracelulárnym kompartmentom. Membrány tiež obklopujú jadro eukaryotických buniek, tvoria endoplazmatické retikulum a slúžia v špecializovaných funkciách, ako sú napríklad myelínové pošvy obklopujúce axóny. Typická mem-

brána obsahuje približne 40 % lipidov a 60 % proteínov, ale v tomto pomere existujú výrazné odchýlky. Hlavnými lipidovými zložkami sú fosfolipidy, zvlášť fosfatidylcholín a fosfatidyletanolamín, a cholesterol. Fyzikálno-chemické vlastnosti membrán, ako kvapalnosť, sa môžu zmeniť modifikáciou profilu fosfolipidov mastných kyselín alebo obsahu cholesterolu. Modulovanie zloženia a organizácie membránových lipidov tiež ovplyvňuje bunkové funkcie závislé od membrány, ako je aktivita receptorov, endocytóza a tok cholesterolu.

B) Enzýmy

Triacylglycerol-lipázy sú rodinou enzýmov, ktorá má veľa zásadných funkcií v metabolizme lipidov v tele. Boli opísané tri členy ľudskej rodiny triacylglycerol-lipáz: pankreatická lipáza, lipoproteínová lipáza a pečenej lipáza (Goldberg, I.J., Le, N.A., Ginsberg, H.N., Krauss, R.M. a Lindgren, F.T. (1988) *J. Clin. Invest.* 81: 561 - 568; Goldberg, I.J., Le, N., Paterniti, J.R., Ginsberg, H.N., Lindgren, F.T. a Brown, W.V. (1982) *J. Clin. Invest.* 70: 1184 - 1192; Hide, W.A., Chan, L., a Li, W.-H., (1992) *J. Lipid Res.* 33: 167 - 178). Pankreatická lipáza je primárne zodpovedná za hydrolyzu potravinových lipidov. Boli opísané varianty pankreatickej lipázy, ale ich fyziologická funkcia nebola určená (Giler, T., Buchwald, P., Blum-Kaelin, D. a Hunziker, W., (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 16509 - 16516). Lipoproteínová lipáza je hlavným enzýmom zodpovedným za distribúciu a využitie triacylglyceridov v tele. Lipoproteínová lipáza hydrolyzuje triglyceridy tak v chylomikrónoch, ako aj vo VLDL. Pečeňová lipáza tiež pôsobí ako fosfolipáza a hydrolyzuje fosfolipidy v HDL.

Fosfolipázy majú významnú úlohu v katabolizme a remodelovaní fosfolipidových zložiek lipoproteínov a fosfolipidov v membránach. Fosfolipázy majú taktiež funkciu v uvoľňovaní kyseliny arachidónovej a v následnej tvorbe prostaglandínov, leukotriénov a iných lipidov, ktoré sa zúčastňujú na rôznych zápalových procesoch.

Lipázové polypeptidy kódované týmito lipázovými génmi majú dĺžku približne 450 aminokyselín s vedúcimi signálnymi peptidmi na uľahčenie sekrecie. Lipázové proteíny sa skladajú z dvoch hlavných domén (Winkler, K., D'Arcy, A., a Hunziker, W., (1990), *Nature* 343: 771 - 774). Amino-koncová doména obsahuje katalytické miesto, zatiaľ čo o karboxy-koncovú doménu sa predpokladá, že je zodpovedná za väzbu substrátu, asociáciu s kofaktorom a za interakcie s bunkovými receptormi (Wong, H., Davis, R.C., Nikazy, J., Seebart, K.E. a Schotz, M.C. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 11290 - 11294; van Tilbeurgh, H., Roussel, A., Lalouel, J.M. a Cambillau, C., (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 4626 - 4633; Wong, H., Davis, R.C., Thuren, T., Goers, J.W., Nikazy, J., Waite, M., a Schotz, M.C. (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 10319 - 10323; Chappel, D.A., Inoue, I., Fry, G.L., Pladet, M.W., Bowen, S.L., Iverius, P.-H., Lalouel, J.M., a Strickland, D.K., (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 18001 - 18006). Celková úroveň aminokyselinovej homológie medzi členmi rodiny je 22 - 65 %, s lokálnymi regiónmi vysokej homológie zodpovedajúcim štruktúrnym homológiám, ktoré sú spojené s enzymatickou funkciou.

Prirodzený proteín lipoproteínovej lipázy je glykozylovaný a glykozylácia je nevyhnutná na enzymatickú aktivitu LPL (Semenkovich, C.F., Luo, C.-C., Nakanishi, M.K., Chen, S.-H., Smith, L.C. a Chan, L. (1990) *J. Biol. Chem.* 265: 5429 - 5433). Existujú tri miesta na N-viazanú glykozyláciu na pečenej a lipoproteínovej lipáze a jedno miesto na pankreatickej lipáze. Ďalej, štyri súpravy cysteínov tvoria disulfidové mostíky, ktoré sú nevyhnutné na zachovanie štruktúrnej integrity nevyhnutnej na enzymatickú aktivitu (Lo, J.-Y., Smith, L.C. a Chan, L. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206: 266 - 271; Brady, L., Brzozowski, A.M., Dereweda, Z.S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J.P., Christiansen, L., Høge-Jensen, B., Nor-skov, L., Thim, L. a Menge, U. (1990) *Nature* 343: 767 - 770).

Členovia skupiny triacylglycerol-lipáz majú spoločné mnohé štruktúrne charakteristiky. Jedným znakom je „GXSG“ motív, v ktorom je centrálny serínový zvyšok jedným z troch zvyškov obsahujúcich „katalytickú triádu“ (Winkler, K., D'Arcy, A. a Hunziker, W., (1990), *Nature* 343: 771 - 774; Faustinella, F., Smith, L.C. a Chan, L., (1992) *Biochemistry* 31: 7219 - 7223). Konzervované asparágové a histidínové zvyšky vytvárajú rovnováhu katalytickej triády. Krátky úsek s 19 až 23 aminokyselinami („viečkový región“) tvorí amfipatickú závitnicu a pokrýva katalytické „vrecko“ enzýmu (Winkler, K., D'Arcy, A. a Hunziker, W., (1990), *Nature* 343: 771 - 774). Tento región odlišuje členy rodiny a nedávno bolo zistené, že určuje substrátovú špecifitu enzýmu (Dugi, K.A., Dichek, H.L. a Santamarina-Fojo, S., (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 25396 - 25401). Porovnanie medzi pečenej a lipoproteínovou lipázou preukázalo, že rozdiely v triacylglycerol-lipázovej a fosfolipázovej aktivite enzýmov sú čiastočne spôsobené týmto „viečkovým“ regiónom (Dugi, K.A., Dichek, H.L. a Santamarina-Fojo, S., (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 25396 - 25401).

Triacylglycerolové-lipázy majú rôzny stupeň väzbovej aktivity k heparínu. Lipoproteínová lipáza má najvyššiu afinitu k heparínu a táto väzbová aktivita bola lokalizovaná na reťazce pozitívne nabitých zvyškov v amino-koncovú doménu (Ma, Y., Henderson, H.E., Liu, M.S., Zhyng, H., Forsythe, I.J., Clarke-Lewis, I., Hayden, M.R. a Brunzell, J.D., *J. Lipid Res.*, 35: 2049 - 2059). Lokalizácia lipoproteínovej lipázy na povrch endotelu (Cheng, C.F., Oosta, G.M., Bensadoun, A., a Rosenberg, R.D. (1981) *J. Biol. Chem.* 256: 12893 - 12896) je primárne sprostredkovaná väzbou na povrchové proteoglykány (Shimada, K., Gill, P.J., Silbert, J.E., Douglas, W.H.J. a Fanburg, B.L., (1981) *J. Clin. Invest.* 68: 995 - 1002; Saxena, U., Klein, M.G. a Gol-

dborg, I.J., (1991) *J. Biol. Chem.* 266: 17516 - 17521; Eisenberg, S., Sehayek, E., Olivecrona, T. a Vlodavsky, I. (1992) *J. Clin. Invest.* 90: 2013 - 2021). Táto väzbová aktivita umožňuje enzýmu akcelarovat' vychytávanie LDL tým, že pôsobí ako mostík medzi LDL a povrchom buniek (Mulder, M., Lombardi, P., Jansen, H., vanBerkel, T.J., Frants, R.R. a Havekes, L.M. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 185: 582 - 587; Rutledge, J.C., a Goldberg, I.J. (1994) *J. Lipid Res.* 35: 1152 - 1160; Tsuchia, S., Yamabe, M., Yamaguchi, T., Kobayashi, Y., Konno, T. a Tada, K. (1980) *Int. J. Cancer* 26: 171 - 176).

O lipoproteínovej lipáze a pečenej lipáze je známe, že pôsobia spolu s ko-aktívnymi proteínmi: apolipoproteínom CII pre lipoproteínovú lipázu a ko-lipázou pre pankreatickú lipázu.

V publikáciách podľa doterajšieho stavu techniky boli opísané tieto génové sekvencie kódujúce ľudskú pankreatickú lipázu, pečenej lipázu a lipoproteínovú lipázu boli opísané (Genbank prírastkové č. M93285, J03540 a M15856, v príslušnom poradí). Mediátorová RNA ľudskej pečenej lipázy a pankreatickej lipázy majú dĺžku približne 1,7 a 1,8 kilobáz, v príslušnom poradí. Dva mRNA transkripty s 3,6 a 3,2 kB sa produkujú z ľudského génu pre lipoproteínovú lipázu. Tieto dva transkripty využívajú alternatívne polyadenylačné signály a líšia sa vo svojej transkripčnej účinnosti (Ranganathan, G., Ong, J.M., Yukht, A., Saghizadeh, M., Simsolo, R.B., Pauer, A. a Kern, P.A., (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 7149 - 7155).

C) Fyziologické procesy

Metabolizmus lipidov zahŕňa interakcie lipidov, apoproteínov, lipoproteínov a enzýmov.

Pečenej lipáza a lipoproteínová lipáza sú multifunkčné proteíny, ktoré sprostredkujú väzbu, vychytávanie, katabolizmus a remodelovanie lipoproteínov a fosfolipidov. Lipoproteínová lipáza a pečenej lipáza sú funkčné pri naviazaní na lumenálny povrch endotelových buniek v periférnom tkanive a v pečeni, v príslušnom poradí. Oba enzýmy sa zúčastňujú na reverznom transporte cholesterolu, čo je presun cholesterolu z periférnych tkanív do pečene, buď z dôvodov exkrécie z tela alebo recyklácie. Genetické defekty v pečenej lipáze a lipoproteínovej lipáze sú známe a sú príčinou dedičných ochorení lipoproteínového metabolizmu. Defekty v metabolizme lipoproteínov vedú k závažným metabolickým ochoreniam vrátane hypercholesterolémie, hyperlipidémie a aterosklerózy.

Ateroskleróza je komplexné, polygénne ochorenie, ktoré je histologicky definované depozitmi (lipidovými alebo fibrolipidovými plakmi) lipidov a iných krvných derivátov v stene ciev, obzvlášť veľkých artérií (aorte, koronárnych artériách, karotídach). Tieto plaky, ktoré sú viac či menej kalcifikované, podľa stupňa progresie aterosklerotického procesu, môžu byť spojené s léziami a sú asociované s akumuláciou tukových depozit v cievach, kde sa tieto depozity skladajú hlavne z esterov cholesterolu. Tieto plaky sú sprevádzané zhrubnutím steny ciev, hypertrofiou hladkého svalstva, výskytom penitých buniek (bunky obsahujúce lipidy vzniknuté z makrofágov nekontrolovane vychytávajúcich cholesterol) a akumuláciou väzivového tkaniva. Aterómový plak presahuje stenu, vytvára stenózu, ktorá je zodpovedná za oklúziu cievy aterómom, trombom, alebo embolom, k čomu dochádza u najviac postihnutých pacientov. Takéto lézie môžu viesť k vzniku závažných kardiovaskulárnych patologických stavov, ako je infarkt, náhla smrť, srdcová insuficiencia a mŕtvica.

Funkcia triacylglycerol-lipáz pri vaskulárnych patologických stavoch, ako je ateroskleróza, bola intenzívne skúmaná (prehľad je uvedený v Olivecrona, G. a Olivecrona, T. (1995) *Curr. Opin. Lipid.* 6: 291 - 305). Všeobecne sa usudzuje, že účinok triacylglycerol-lipáz je antiaterogénny, pretože tieto enzýmy znižujú hladiny sérových triacylglycerolov a podporujú tvorbu HDL. Transgénne zvieratá exprimujúce ľudskú lipoproteínovú lipázu a pečenej lipázu majú znížené koncentrácie plazmatických triglyceridov a zvýšené hladiny lipoproteínov s vysokou hustotou (HDL) (Shimada, M., Shimano, H., Gotoda, T., Yamamoto, K., Kawamura, M., Inaba, T., Yazaki, T. a Yamada, N. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 17924 - 17929; Liu, M.-S., Jirik, F.R., LeBoeuf, R.C., Henderson, H., Castellani, L.W., Lusa, A.J., Ma, Y., Forsythe, I.J., Zhang, H., Kirk, E., Brunzell, J.D. a Hayden, M.R. (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 11417 - 11424). Bolo zistené, že ľudia s genetickými defektmi vedúcimi k zníženej aktivite lipoproteínovej lipázy majú hypertriglyceridémiu, ale nemajú vyššie riziko koronárnych ochorení. Je opísané, že táto skutočnosť je spôsobená tým, že chýba produkcia stredne veľkých, aterogénnych lipoproteínov, ktoré sa môžu akumulovať v subendotelovom priestore (Zilversmit, D.B. (1973) *Circ. Res.* 33: 633 - 638).

V lokalizovanej oblasti aterosklerotickej lézie sa napriek tomu predpokladá, že zvýšená lipázová aktivita akceleruje aterogénny proces (Zilversmit, D.B. (1995) *Clin. Chem.* 41: 153 - 158; Zamboni, A., Torres, A., Bijvoet, S., Gagne, C., Moojani, S., Lupien, P.J., Hayden, M.R. a Brunzell, J.D. (1993) *Lancet* 341: 1119 - 1121). Toto môže byť spôsobené vyššou väzbou a vychytávaním lipoproteínov cievnyim tkanivom, ktoré je spôsobené lipázami (Eisenberg, S., Sehayek, E., Olivecrona, T. a Vlodavsky, I. (1992) *J. Clin. Invest.* 90: 2013 - 2021; Tabas, I., Li, I., Brocia, R.W., Xu, S.W., Swenson, T.L., Williams, K.J. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 20419 - 20432; Nordestgaard, B.G. a Nielsen, A.G. (1994) *Curr. Opin. Lipid.* 5: 252 - 257; Williams, K.J. a Tabas, I. (1995) *Art. Thromb. and Vasc. Biol.* 15: 551 - 561). Ďalej, vysoká lokálna hladina lipázovej aktivity môže viesť k cytotoxickým koncentráciám mastných kyselín a lyzofosfatidylcholínu v prekurzorových aterosklerotických léziách.

Napriek znalosti funkcie lipázovej aktivity v homeostáze lipidov neboli v odbore identifikované ďalšie gény kódujúce proteíny, ktoré regulujú metabolizmus lipidov.

5 Podstata vynálezu

Podstatou riešenia podľa predmetného vynálezu je izolovaný polypeptid kódovaný génom podobným génu pre lipázu (LLG), kde uvedený polypeptid:

- a) sa viaže na heparín,
 - 10 b) má homológiu s ľudskou lipoproteínovou lipázou a pečňovou lipázou, a
 - c) obsahuje 39 kD katalytickú doménu triacylglycerol-lipázovej rodiny,
- kde:
- (i) tento izolovaný polypeptid obsahuje aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 8 a zdanlivú molekulovú hmotnosť približne 55 kD na 10 % SDS-PAGE gélu, aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 8 a zdanlivú molekulovú hmotnosť približne 68 kD na 10 % SDS-PAGE gélu alebo aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 6 a zdanlivú molekulovú hmotnosť približne 40 kD na 10 % SDS-PAGE gélu; alebo
 - 15 (ii) 39 kD katalytickú doménu obsahujúcu aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 10; alebo
 - (iii) je tento izolovaný polypeptid králičieho pôvodu a obsahuje aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 12;
- Vo výhodnom uskutočnení má tento izolovaný polypeptid aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 8 a molekulovú hmotnosť približne 55 kD na 10 % SDS-PAGE gélu.
- Podľa ďalšieho výhodného uskutočnenia má tento izolovaný polypeptid aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 8 a molekulovú hmotnosť približne 68 kD na 10 % SDS-PAGE gélu.
- Výhodne má tento izolovaný polypeptid aktivitu fosfolipázy A.
- Podľa ďalšieho výhodného uskutočnenia má tento izolovaný polypeptid aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 6 a molekulovú hmotnosť približne 40 kD na 10 % SDS-PAGE gélu.
- 25 Výhodne je tento izolovaný polypeptid ľudského pôvodu.
- Výhodne v prípade tohto izolovaného polypeptidu podľa vynálezu 39 kD katalytická doména obsahuje aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 10.
- Do rozsahu predmetného vynálezu rovnako patrí prostriedok majúci fosfolipázovú účinnosť, ktorého podstata spočíva v tom, že obsahuje niektorý zo špecifikovaných polypeptidov a biologicky kompatibilný roztok.
- Do rozsahu predmetného vynálezu rovnako patrí farmaceutický prostriedok, ktorého podstata spočíva v tom, že obsahuje niektorý zo špecifikovaných polypeptidov a farmaceuticky prijateľný nosič.
- Do rozsahu predmetného vynálezu rovnako patrí antigénny fragment izolovaného polypeptidu podľa vynálezu obsahujúci SEQ ID NO: 16.
- 35 Do rozsahu predmetného vynálezu rovnako patrí izolovaná nukleová kyselina kódujúca niektorý zo špecifikovaných polypeptidov.
- Vo výhodnom uskutočnení je touto izolovanou nukleovou kyselinou cDNA. Výhodne je jej nukleotidová sekvencia vybratá zo skupiny zahrnujúcej SEQ ID NO: 5, 7 a 9. Výhodne obsahuje nukleotidy 252 až 1754 SEQ ID NO: 7.
- 40 Do rozsahu predmetného vynálezu rovnako patrí izolovaná nukleová kyselina, ktorá hybridizuje za vysoko stringentných podmienok na nukleovú kyselinu majúcu sekvenciu vybranú zo skupiny zahrnujúcej SEQ ID NO: 3, 5 a 7. Výhodne táto izolovaná nukleová kyselina obsahuje 20 po sebe idúcich nukleotidov. Výhodne je touto izolovanou nukleovou kyselinou antisense nukleová kyselina. Výhodne je sekvencia tejto antisense nukleovej kyseliny operatívne naviazaná na regulačný región na génovú expresiu.
- 45 Podľa ďalšieho výhodného uskutočnenia je touto izolovanou nukleovou kyselinou kyselina, ktorá hybridizuje za vysoko stringentných podmienok na cieľovú sekvenciu vybranú zo skupiny zahrnujúcej nukleotidy 44 až 79 SEQ ID NO: 3 a nukleotidy 1036 až 1065 SEQ ID NO: 5.
- Do rozsahu predmetného vynálezu rovnako patrí biologicky aktívny prostriedok, ktorý obsahuje špecifikovanú nukleovú kyselinu a biologicky kompatibilný roztok.
- 50 Do rozsahu predmetného vynálezu rovnako patrí farmaceutický prostriedok, ktorého podstata spočíva v tom, že obsahuje špecifikovanú nukleovú kyselinu a farmaceuticky prijateľný nosič.
- Do rozsahu predmetného vynálezu rovnako patrí vektor obsahujúci špecifikovanú izolovanú nukleovú kyselinu operatívne naviazanú na regulačný región.
- 55 Vo výhodnom uskutočnení je v prípade tohto vektora regulačný región z heterológneho zdroja. Rovnako je výhodné, ak je týmto vektorom podľa vynálezu vírusový vektor. Najvýhodnejšie je týmto vektorom adenovírusový vektor.
- Do rozsahu predmetného vynálezu rovnako patrí rekombinantná hostiteľská bunka obsahujúca špecifikovaný vektor.
- 60 Vo výhodnom uskutočnení podľa predmetného vynálezu je touto rekombinantnou bunkou eukaryotická

bunka, ešte výhodnejšie je touto bunkou COS-7 bunka.

Do rozsahu predmetného vynálezu rovnako patrí prostriedok využiteľný na transfekáciu cieľovej bunky, ktorého podstata spočíva v tom, že obsahuje špecifikovaný vektor a biologicky kompatibilný roztok.

Do rozsahu predmetného vynálezu rovnako patrí farmaceutický prostriedok, ktorého podstata spočíva v tom, že obsahuje špecifikovaný vektor a farmaceuticky prijateľný nosič.

Do rozsahu predmetného vynálezu rovnako patrí spôsob výroby polypeptidu, ktorého podstata spočíva v tom, že zahrnuje kultiváciu skôr špecifikovaných rekombinantných buniek za podmienok umožňujúcich expresiu polypeptidu.

Do rozsahu predmetného vynálezu rovnako patrí polypeptid pripravený týmto spôsobom podľa vynálezu.

Do rozsahu predmetného vynálezu rovnako patrí protilátka schopná špecifickej väzby na polypeptid podľa vynálezu.

Do rozsahu predmetného vynálezu rovnako patrí protilátka schopná špecifickej väzby na polypeptid podľa vynálezu a neutralizujúca fosfolipázovú aktivitu polypeptidu.

Vo výhodnom uskutočnení podľa vynálezu je touto protilátkou monoklonálna protilátka. Podľa ďalšieho výhodného uskutočnenia je touto protilátkou monoklonálna protilátka alebo polyklonálna protilátka.

Do rozsahu predmetného vynálezu rovnako patrí hybridómna bunka, ktorá produkuje protilátku podľa predmetného vynálezu.

Do rozsahu predmetného vynálezu rovnako patrí prostriedok poskytujúci naviazanie izolovaného polypeptidu podľa predmetného vynálezu na protilátku, ktorého podstata spočíva v tom, že obsahuje skôr špecifikovanú protilátku podľa vynálezu a biologicky kompatibilný roztok.

Do rozsahu predmetného vynálezu rovnako patrí farmaceutický prostriedok, ktorého podstata spočíva v tom, že obsahuje skôr špecifikovanú protilátku podľa vynálezu a farmaceuticky prijateľný nosič.

Do rozsahu predmetného vynálezu rovnako patrí spôsob *in vitro* skríningu aktivity agonistov alebo antagonistov enzymatickej aktivity polypeptidu kódovaného génom podobným génu pre lipázu (LLG), ktorého podstata spočíva v tom, že zahŕňa:

a) kontaktovanie potenciálnych agonistov alebo antagonistov génu podobnému génu pre lipázu a substrátu génu podobnému génu pre lipázu, a

b) meranie schopnosti potenciálnych agonistov alebo antagonistov potenciovat' alebo inhibovat' aktivitu génu podobnému génu pre lipázu (LLG), kde LLG je polypeptid podľa vynálezu.

Do rozsahu predmetného vynálezu rovnako patrí spôsob *in vitro* enzymatickej hydrolýzy fosfatidylcholínesteru, ktorého podstata spočíva v tom, že zahrnuje kontaktovanie uvedeného fosfatidylcholínesteru so špecifikovaným polypeptidom podľa vynálezu.

Do rozsahu predmetného vynálezu rovnako patrí použitie polypeptidu alebo protilátky podľa vynálezu na výrobu liečiva na zlepšenie sérového lipidového profilu u ľudí a iných živočíchov, ktorí majú nežiaduci lipidový profil.

Do rozsahu predmetného vynálezu rovnako patrí izolovaný polypeptid podľa vynálezu, ktorý je kráľíčieho pôvodu a obsahuje aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 12.

Do rozsahu predmetného vynálezu rovnako patrí izolovaná nukleová kyselina kódujúca tento polypeptid.

Do rozsahu predmetného vynálezu rovnako patrí nukleová kyselina skôr špecifikovaná, ktorá má nukleotidovú sekvenciu SEQ ID NO: 11.

Do rozsahu predmetného vynálezu rovnako patrí transgénna myš exprimujúca izolovaný polypeptid podľa predmetného vynálezu.

Predmetný vynález sa týka objavu lipáze-podobného génu (LLP), jeho exprimovaného polypeptidového produktu a prostriedkov a spôsobov na jeho použitie. LLP polypeptid sa viaže na heparín, má homológiu s ľudskou lipoproteínovou lipázou a pečňovou lipázou a obsahuje 39 kD katalytickú doménu prináležiacu do skupiny triacylglycerol-lipáz. V ďalšom uskutočnení má polypeptid aktivitu fosfolipázy A.

Ďalšie aspekty a výhody predkladaného vynálezu budú zrejmé z priložených obrázkov a z nasledujúceho podrobného opisu vhodných uskutočnení predkladaného vynálezu.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Na obr. 1 je znázornená sekvencia (SEQ ID NO: 17 - 31) primérov použitých v príkladných PCR amplifikáciách.

Na obr. 2 je znázornená sekvencia nukleovej kyseliny (SEQ ID NO: 1) a vydedukované aminokyselinové sekvencie (SEQ ID NO: 2) RT-PCR produktu diferenciálneho zobrazenia obsahujúceho LLG cDNA. Sekvencie zodpovedajúce dvom primérom použitým v amplifikácii sú podčiarknuté. Terminálny kodón a polyadenylačný signál sú orámované. GAATTC motívy a susediace sekvencie sú z pCRII vektora, do ktorého bol produkt klonovaný.

Na obr. 3 je znázornená sekvencia nukleovej kyseliny (SEQ ID NO: 3) a vydedukované aminokyselinové

sekvencie (SEQ ID NO: 4) 5'-RACE extenzia LLG cDNA. Sekvencie zodpovedajúce dvom primérom použitým v amplifikácii sú podčiarknuté. GAATTC motívy a susediace sekvencie sú z pCRII vektora, do ktorého bol produkt klonovaný.

Na obr. 4 je znázornená sekvencia (SEQ ID NO: 7) cDNA obsahujúca kompletný otvorený „reading frame“ génu podobného génu na lipázu, LLGXL. Štartovací kodón (ATG) a terminálny kodón (TGA) sú orámované. DraI miesto (TTTAAA) a SrfI miesto (GCCCCGGGC) použité pri konštrukcii expresných vektorov sú podčiarknuté.

Na obr. 5 je znázornená vydedukovaná aminokyselinová sekvencia (SEQ ID NO: 8) LLGXL proteínu. Predpokladaná signálna sekvencia je podčiarknutá.

Na obr. 6 je znázornené priradenie proteínovej sekvencie členov triacylglycerol-lipázovej génovej skupiny (SEQ ID NO: 13 - 15). Zvyšky v rámci sú identické s LLGXL proteínom (SEQ ID NO: 8). Medzery boli vložené do sekvencií kvôli maximalizácii priradení s použitím CLUSTAL programu.

Na obr. 7 je znázornená Northern analýza LLG mRNA v THP-1 bunkách. Bunky boli stimulované buď PMA alebo PMA a oxidovaným LDL (PMA + oxLDL). Číslo vľavo ukazuje pozície RNA štandardov (v kilobázach).

Na obr. 8 je znázornená Northern analýza mRNA z viacerých ľudských tkanív, ktoré boli sondované LLG, lipoproteínovou lipázou (LPL) a ľudským beta-aktínom. Pozícia 4,4 kB RNA štandardu je uvedená vľavo na LLG a LPL paneloch.

Na obr. 9 je znázornená Northern analýza LLG a LPL exprese v kultivovaných ľudských endotelových bunkách a v THP-1 bunkách. Bunky boli buď nestimulované (nevystavené PMA), alebo stimulované PMA.

Na obr. 10 je ilustrovaná sekvencia imunizujúceho peptidu (SEQ ID NO: 16) a jej vzťah k sekvencii LLGXL proteínu. Peptid je uvedený v rámci. Terminálny cystein bol vložený na uľahčenie väzby peptidu na proteínový nosič.

Na obr. 11 je ilustrovaná Western analýza proteínov naviazaných na heparín-Sepharosu kondicionovaného média kultivovaných endotelových buniek. Škvŕna bola sondovaná anti-LLG antisérom. Číslo vľavo ukazuje pozíciu proteínových štandardov v kilodaltonoch.

Na obr. 12 je ilustrovaná Western analýza proteínov naviazaných na heparín-Sepharosu v kondicionovanom médiu COS-7 buniek dočasne transfektovaných expresným vektorom obsahujúcim cDNA pre LLGN alebo LLGXL alebo neobsahujúcom DNA (Mock). Proteíny z endotelových buniek stimulovaných PMA (HCAEC + PMA) boli použité na kontrolu veľkosti. Číslo vľavo uvádza zreteľné molekulové hmotnosti hlavných imunoreaktívnych proteínov, ako boli určené porovnaním s proteínovými štandardmi.

Na obr. 13 je ilustrovaná nukleotidová sekvencia králičieho LLG PCR produktu (RELLG, SEQ, SEQ ID NO: 11) a priradenie sekvencie medzi králičím LLG PCR produktom a zodpovedajúcou sekvenciou v ľudskej cDNA (LLG7742A). Identické nukleotidy sú v rámci.

Na obr. 14 je ilustrovaná aktivita fosfolipázy A u ľudského LPL, LLGN a LLGXL, s použitím fosfatidylcholinového substrátu.

Na obr. 15 je ilustrovaná aktivita triacylglycerid-lipázy u ľudského LPL, LLGN a LLGXL, s použitím trioleínového substrátu.

Na obr. 16 je ilustrovaná hybridizácia LLG a LPL sond na genómovej DNA z rôznych druhov.

Predkladaný vynález sa týka objavu génu podobného génu pre lipázu (LLP) a jeho exprimovaných polypeptidových produktov. Tieto polypeptidové produkty, patriace do skupiny triacylglycerol-lipáz, obsahujú 39 kD katalytickú doménu priradenú do skupiny triacylglycerol-lipáz, ktorá má napríklad sekvenciu SEQ ID NO: 10. Jedným uskutočnením predkladaného vynálezu je LLGN polypeptid, ktorý obsahuje 354 aminokyselín. Druhým uskutočnením predkladaného vynálezu je LLGXL polypeptid, ktorý obsahuje 500 aminokyselín a vykazuje 43 % podobnosť s ľudskou lipoproteínovou lipázou a 37 % podobnosť s ľudskou pečeneňovou lipázou. LLXGL polypeptid má aktivitu fosfolipázy A.

Podľa predmetného vynálezu bola izolovaná parciálna cDNA z mRNA THP-1 buniek, ktoré boli vystavené forbolesteru a oxidované LDL. Po 5'-RACE extenzii tejto parciálnej cDNA bola izolovaná menšia alternatívne zostrihnutá cDNA. Druhá, väčšia cDNA bola izolovaná z ľudskej placéntarnej cDNA knižnice.

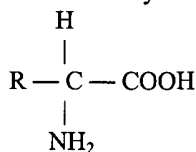
Northern analýzy preukázali, že LLG gén je exprimovaný v endotelových bunkách. Antisérum proti peptidu predpokladané odvodenému z otvoreného čítacieho rámca cDNA detegovalo proteíny predpokladanej veľkosti pre LLGN a LLGXL v kondicionovanom médiu z kultivovaných endotelových buniek. Spracovanie endotelových buniek forbolesterom viedlo k zvýšenej produkcii LLG tak na úrovni mRNA, ako aj na úrovni proteínov. Ide o prvého člena triacylglycerol-lipázovej skupiny, ktorého expresia bola zistená v endotelových bunkách.

A) Definícia

Nasledujúce definované termíny sú použité v predkladanom opise, pričom by mal napomôcť pochopeniu a uskutočneniu predkladaného vynálezu.

„Polypeptid“ je polymerická zlúčenina skladajúca sa z kovalentne viazaných aminokyselinových zvyš-

kov. Aminokyseliny majú nasledovnú všeobecnú štruktúru:



Aminokyseliny sú klasifikované do siedmich skupín podľa vedľajšieho reťazca R: (1) s alifatickým vedľajším reťazcom, (2) s vedľajším reťazcom obsahujúcim hydroxylovú (OH) skupinu, (3) s vedľajším reťazcom obsahujúcim atómy síry, (4) s vedľajším reťazcom obsahujúcim kyslú alebo amidovú skupinu, (5) s vedľajším reťazcom obsahujúcim bázickú skupinu, (6) s vedľajším reťazcom obsahujúcim aromatický kruh a (7) prolín, iminokyselinu, v ktorej je vedľajší reťazec kondenzovaný na aminoskupinu.

„Proteín“ je polypeptid, ktorý má štrukturálnu alebo funkčnú úlohu v živých bunkách.

Polypeptidy a proteíny podľa predkladaného vynálezu môžu byť glykozylované alebo neglykozylované.

„Homológia“ znamená podobnosť sekvencie, ktorá je dôsledkom spoločného evolučného pôvodu. O polypeptidoch a proteínoch sa uvádza, že majú homológiu alebo podobnosť, pokiaľ je významná časť ich aminokyselin bud' (1) identická, alebo (2) majú chemicky podobný vedľajší reťazec R. O nukleových kyselinách platí, že majú homológiu, pokiaľ je významné množstvo ich nukleotidov identické.

„Izolovaný polypeptid“ alebo „izolovaný proteín“ je polypeptid alebo proteín, ktorý v podstate neobsahuje tie zlúčeniny, ktoré obvykle obsahuje v prirodzenom stave (napríklad ďalšie proteíny alebo polypeptidy, nukleové kyseliny, sacharidy, lipidy). Termín „izolovaný“ nevylučuje umelé alebo syntetizované zmesi s inými zlúčeninami, alebo nevylučuje prítomnosť nečistôt, ktoré neovplyvňujú nepriaznivým spôsobom biologickú aktivitu, a ktoré môžu byť prítomné napríklad v dôsledku neúplného prečistenia, pridania stabilizačných činidiel, alebo spracovania do formy farmaceuticky prijateľného prostriedku.

Molekula je „antigénna“, pokiaľ je schopná špecifickej interakcie s molekulou rozpoznávajúcou antigén v imunitnom systéme, ako je imunoglobulín (protilátka) alebo antigénny receptor T buniek. Antigénny polypeptid obsahuje najmenej 5, lepšie aspoň 10 aminokyselin. Antigénna časť molekuly môže byť tá časť, ktorá je imunodominantná na rozpoznanie protilátkou alebo receptorom T buniek, alebo to môže byť časť použitá na vytvorenie protilátky k molekule pomocou konjugácie antigénnej časti na molekulu nosiča na imunizáciu. Molekula, ktorá je antigénna, nemusí byť sama osebe imunogénna, t. j. schopná vyvolať imunitnej odpovede bez nosiča.

„LLGN polypeptid“ a „LLGN proteín“ je polypeptid obsahujúci sekvenciu SEQ ID NO: 6, kde uvedený polypeptid môže byť glykozylovaný alebo neglykozylovaný.

„LLGXL polypeptid“ a „LLGXL proteín“ je polypeptid obsahujúci sekvenciu SEQ ID NO: 8, kde uvedený polypeptid môže byť glykozylovaný alebo neglykozylovaný.

„LLG polypeptid“ všeobecne označuje LLGN polypeptid a LLGXL polypeptid.

LLG polypeptid alebo proteín podľa predkladaného vynálezu zahŕňa akýkoľvek analóg, fragment, derivát alebo mutant odvodený od LLG polypeptidu, ktorý si zachováva aspoň jednu biologickú vlastnosť LLG polypeptidu. V prírode existujú rôzne varianty LLG polypeptidu. Tieto varianty môžu byť alelické varianty charakterizované rozdielmi v nukleotidových sekvenciách štrukturálneho génu kódujúceho proteín, alebo môžu obsahovať odlišný zostrih alebo post-translačné modifikácie. Odborníci v odbore môžu vyrobiť varianty majúce jednu alebo viac aminokyselinových substitúcií, delcií, adícií alebo náhradou. Tieto varianty môžu zahŕňať okrem iného: (a) varianty, v ktorých je jeden alebo viac aminokyselinových zvyškov substituovaných konzervatívnou alebo nekonzervatívnou aminokyselinou, (b) varianty, v ktorých je jedna alebo viac aminokyselin adovaná na LLG polypeptid, (c) varianty, v ktorých jedna alebo viac aminokyselin obsahuje substituent a (d) varianty, v ktorých je LLG polypeptid kondenzovaný s iným polypeptidom, ako je sérový albumín. Medzi ďalšie LLG polypeptidy podľa predkladaného vynálezu patria varianty, v ktorých sú aminokyselinové zvyšky od jedného druhu substituované za zodpovedajúcim zvyškom iného druhu, buď v zachovanej, alebo v nezachovanej pozícii. V inom uskutočnení sú aminokyselinové zvyšky v nezachovaných pozíciách substituované konzervatívnymi alebo nekonzervatívnymi zvyškami. Technické metódy na získanie týchto variantov vrátane genetických (supresia, delécia, mutácia atď.), chemických a enzymatických techník, sú odborníkom v odbore známe.

Pokiaľ takéto alelické varianty, analógy, fragmenty, deriváty, mutanty a modifikácie vrátane foriem vzniknutých alternatívnym zostrihom mRNA a foriem vzniknutých alternatívnou post-translačnou modifikáciou, vedú k vzniku derivátov LLG polypeptidu, ktorý si zachováva biologické vlastnosti LLG polypeptidu, potom patria do rozsahu predkladaného vynálezu.

„Nukleová kyselina“ je polymerická zlúčenina zložená z kovalentne naviazaných podjednotiek, ktoré sa nazývajú nukleotidy. Medzi nukleové kyseliny patrí polyribonukleovú kyselinu (RNA) a polydeoxyribonukleovú kyselinu (DNA), ktoré môžu byť obe jednoreťazcové alebo dvojreťazcové. Medzi DNA patrí cDNA, genómová DNA, syntetická DNA a semi-syntetická DNA. Sekvencia nukleotidov, ktorá kóduje proteín, sa

nazýva kódujúca sekvencia.

„Antisense nukleová kyselina“ je sekvencia nukleotidov, ktorá je komplementárna ku kódujúcej sekvencii. Antisense nukleové kyseliny môžu byť použité na zníženie alebo blokádu exprese polypeptidu kódujúceho kódujúcim reťazcom.

5 „Izolovaná nukleová kyselina“ je nukleová kyselina, ktorá v podstate neobsahuje tie zlúčeniny, ktoré obvykle obsahuje v prirodzenom stave. Termín „izolovaná“ nevylučuje umelé alebo syntetizované zmesi s inými zlúčeninami, alebo nevylučuje prítomnosť nečistôt, ktoré neovplyvňujú nepriaznivým spôsobom biologickú aktivitu, a ktoré môžu byť prítomné napríklad v dôsledku neúplného prečistenia, pridania stabilizačných činidiel, alebo spracovania do formy farmaceuticky prijateľného prostriedku.

10 Termín „nukleová kyselina, ktorá hybridizuje za vysoko stringentných podmienok“ (pri vysoko náročných podmienkach), znamená, že hybridizované nukleové kyseliny odolávajú premývaniu v podmienkach vysokej stringentnosti. Príkladom vysoko stringentných premývacích podmienok pre DNA-DNA hybridy je 0,1 X SSC, 0,5 % SDS pri 68 °C. Iné vysoko stringentné premývacie podmienky sú odborníkom v odbore známe.

15 „Regulačný región“ označuje sekvenciu nukleovej kyseliny, ktorá reguluje expresiu nukleovej kyseliny. Regulačný región môže obsahovať sekvencie, ktoré sú prirodzene zodpovedné za expresiu určitej nukleovej kyseliny (homológny región) alebo môže obsahovať sekvencie iného pôvodu (zodpovedné za expresiu iných proteínov alebo aj syntetických proteínov). Konkrétne môžu byť týmito sekvenciami sekvencie eukaryotických alebo vírusových génov, alebo odvodené sekvencie, ktoré stimulujú alebo potláčajú transkripciu génu 20 špecifickým alebo nešpecifickým spôsobom a indukovateľným alebo neindukovateľným spôsobom. Regulačné regióny zahŕňajú elementy rozpoznávajúce počiatok replikácie, miesta pre zostrih RNA, zosilňovače transkripcie, transkripčné terminačné sekvencie, signálne sekvencie, ktoré smerujú polypeptid do sekrečnej dráhy cieľovej bunky a promótory.

Regulačný región z „heterológneho zdroja“ je regulačný región, ktorý nie je prirodzene asociovaný s exprimovanou nukleovou kyselinou. Medzi tieto heterológne regulačné regióny patria regulačné regióny z iných druhov, regulačné regióny z iných génov, hybridné regulačné sekvencie a regulačné sekvencie, ktoré sa prirodzene nevyskytujú, ale sú navrhnuté odborníkmi.

„Vektor“ je akýkoľvek prostriedok na prenos nukleovej kyseliny podľa predkladaného vynálezu do hostiteľskej bunky. Termín „vektor“ zahŕňa tak vírusové, ako aj nevírusové prostriedky na vloženie nukleovej kyseliny do prokaryotických alebo eukaryotických buniek *in vivo*, *ex vivo* alebo *in vitro*. Nevírusové vektory zahŕňajú plazmidy, lipozómy, elektricky nabitý lipidy (cytofektíny), komplexy DNA-proteín a biopolyméry. Medzi vírusové vektory patria retrovírus, adeno-asociovaný vírus, pox-vírus, bakulovírus, vírus vakcínie, herpes simplex vírus, vírus Epstein-Barrovej a adenovírus. Okrem nukleovej kyseliny podľa predkladaného vynálezu môže vektor tiež obsahovať jeden alebo viac regulačných regiónov a/alebo selektovateľných markerov použiteľných pri selekcii, meraní a monitorovaní výsledkov prenosu nukleovej kyseliny (prenosu do 35 určitých tkanív, trvania exprese a podobne).

„Rekombinantná bunka“ je bunka, ktorá obsahuje nukleovú kyselinu, ktorá sa prirodzene nevyskytuje v bunke. Termín „rekombinantná bunka“ zahŕňa vyššie eukaryotické bunky, ako je bunka cicavcov, nižšia eukaryotická bunka, ako je kvasinka, prokaryotické bunky a archaebakteriálne bunky.

40 Termín „farmaceuticky prijateľný nosič“ označuje rozpúšťadlá a plniva, ktoré sú farmaceuticky prijateľné na spôsob podávania a ktoré sú sterilné, pričom týmito nosičovými látkami môžu byť vodné alebo olejové suspenzie vyrobené s použitím vhodných dispergačných alebo zmáčavých činidiel a suspenzačných činidiel. Konkrétny farmaceuticky prijateľný nosič a pomer aktívnej zlúčeniny k nosičovej látke sa určia podľa rozpustnosti a chemických vlastností týchto látok, podľa stanoveného spôsobu podania a podľa znalostí zo štandardnej farmaceutickej praxe.

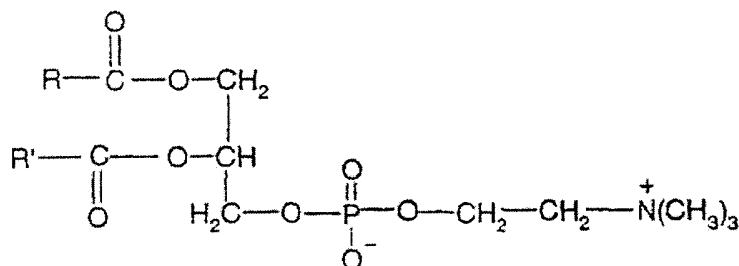
„Lipáza“ je proteín, ktorý enzymaticky štiepi lipidový substrát.

„Fosfolipáza“ je proteín, ktorý enzymaticky štiepi fosfolipidový substrát.

„Triacylglycerol-lipáza“ je proteín, ktorý enzymaticky štiepi triacylglyceridový substrát.

„Fosfatidylcholin“ je glycerolový fosfolipid majúci nasledovnú štruktúru:

50



kde R a R' sú uhľovodíkové vedľajšie reťazce mastných kyselín. Fosfatidylcholín je tiež známy ako lecitín.

Termín „lipidový profil“ označuje súbor koncentrácií cholesterolu, triglyceridov, lipoproteínového cholesterolu a iných lipidov v ľudskom tele alebo v tele iného živočicha.

„Nežiaduci lipidový profil“ je stav, pri ktorom sú koncentrácie cholesterolu, triglyceridov alebo lipoproteínového cholesterolu mimo referenčných hraníc pre vek a pohlavie. Všeobecne sú koncentrácie celkového cholesterolu > 200 mg/dl, plazmatických triacylglyceridov > 200 mg/dl, LDL cholesterolu > 130 mg/dl, HDL cholesterolu < 39 mg/ml alebo pomer celkového cholesterolu k HDL cholesterolu > 4,0 považované za nežiaduci lipidový profil. Nežiaduci lipidový profil je asociovaný s mnohými patologickými stavmi vrátane hyperlipidémie, diabetickej hypercholesterolémie, aterosklerózy a iných foriem ochorení koronárnych artérií.

B) Polypeptidy

Predkladaný vynález obsahuje polypeptidy, ktoré patria do triacylglycerol-lipázovej skupiny a ktoré obsahujú 39 kD katalytickú doménu triacylglycerol-lipázovej skupiny, napríklad tú, ktorá má sekvenciu SEQ ID NO: 10. Podľa jedného z uskutočnení podľa predmetného vynálezu je týmto polypeptidom izolovaný LLG polypeptid obsahujúci SEQ ID NO: 6 a majúci zdanlivú relatívnu molekulovú hmotnosť približne 40 kDa na 10 % SDS-PAGE gélu. Podľa ďalšieho uskutočnenia podľa predmetného vynálezu je týmto polypeptidom izolovaný LLG polypeptid obsahujúci SEQ ID NO: 8, ktorý má zdanlivú relatívnu molekulovú hmotnosť približne 55 kDa alebo 68 kDa na 10 % SDS-PAGE gélu.

Polypeptidy a proteíny podľa predkladaného vynálezu môžu byť rekombinantné polypeptidy, v prírode sa vyskytujúce polypeptidy alebo syntetické polypeptidy a ich zdrojom môžu byť ľudia, králiky alebo iné živočichy. Polypeptidy sú charakterizované reprodukovateľnou jednou molekulovou hmotnosťou a/alebo súborom viacerých molekulových hmotností, chromatografickou odozvou a elučnými profilmi, aminokyselínovým zložením a sekvenciou a biologickou aktivitou.

Polypeptidy podľa predkladaného vynálezu môžu byť izolované z prirodzených zdrojov, ako sú extrakty z placenty, ľudskej plazmy alebo z kondicionovaného média kultivovaných buniek, ako sú makrofágy alebo endotelové bunky, s použitím techník prečistenia, ktoré sú v odbore známe.

Alternatívne môžu byť polypeptidy podľa predkladaného vynálezu pripravené pomocou rekombinantnej DNA technológie, ktorá zahŕňa skombinovanie nukleovej kyseliny kódujúcej jej polypeptid s vhodným vektorom, inzerciu výsledného vektora do vhodnej hostiteľskej bunky, získanie polypeptidu produkovaného výslednou hostiteľskou bunkou a prečistenie získaného polypeptidu.

C) Nukleové kyseliny

Predkladaný vynález obsahuje izolované nukleové kyseliny, ktoré kódujú LLG polypeptid.

Predkladaný vynález rovnako poskytuje antisense nukleovej kyseliny, ktoré môžu byť použité na zníženie alebo blokádu expresie LLG polypeptidov *in vitro*, *in vivo* alebo *ex vivo*.

Techniky rekombinantnej DNA technológie sú v odbore známe. Všeobecné metódy na klonovanie a expresiu rekombinantných molekúl sú opísané v Maniatis (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratories, 1982) a v Ausubel (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley and Sons, 1987), ktoré sú tu uvedené ako odkazové materiály.

Nukleové kyseliny podľa predkladaného vynálezu môžu byť naviazané na jeden alebo viac regulačných regiónov. Výber vhodného regulačného regiónu alebo regiónov je pre odborníkov v odbore ľahký. Regulačné regióny zahŕňajú promótor a môžu zahŕňať zosilňovače transkripcie, supresory a podobne.

Medzi promótor, ktoré môžu byť použité v predkladanom vynáleze, patria tak konštitutívne promótor, ako aj regulovateľné (indukovateľné) promótor. Promótor môžu byť eukaryotické alebo prokaryotické, podľa hostiteľa. Medzi prokaryotické (vrátane bakteriofágových) promótor použiteľné v predkladanom vynáleze patria lacI, lacZ, T3, T7, lambda P_L, P_R, a trp promótor. Medzi eukaryotické (vrátane vírusových) promótor použiteľné pri praktickom uplatnení predkladaného vynálezu patria ubikvitné promótor (napríklad pre desmín, neurofilamenty, keratín, GFAP), terapeutické génové promótor (napríklad pre MDR typ, CFTR, faktor VIII), tkanivovo-spezifické promótor (napríklad aktínový promótor v bunkách hladkého svala, alebo Flt a Flk promótor aktívne v endotelových bunkách), promótor, ktoré sú prednostne aktivované v deliacich sa bunkách, promótor, ktoré reagujú na stimuly (napríklad pre receptor steroidných hormónov, receptor kyseliny retinovej), tetracyklínom regulované transkripčné modulátory, cytomegalovírusový bezprostredný skorý promótor, retrovírusový LTR promótor, metallothioneínový promótor, SV-40 promótor, E1a promótor a MPL promótor. Tetracyklínom regulované transkripčné modulátory a CMV promótor sú opísané v WO 96/01313, US 5168062 a 5385839, ich obsah je tu uvedený ako odkaz.

Výhodne sú vírusové vektory použité v génovej terapii replikačne defektné, to znamená, že nie sú schopné autonómnej replikácie v cieľových bunkách. Všeobecne, génom replikačne-defektných vírusových vektorov, ktoré sú použité v rozsahu predkladaného vynálezu, chýba aspoň jeden región, ktorý je nutný na replikáciu vírusu v infikovanej bunke. Tieto regióny môžu byť buď eliminované (úplne alebo čiastočne), alebo

zmenené na nefunkčné technikami, ktoré sú v odbore známe. Medzi tieto techniky patrí úplné odstránenie, substitúcia (inou sekvenciou, najmä inzertovanou nukleovou kyselinou), čiastočná delécia alebo adícia jednej alebo niekoľkých báz k základnému (na replikáciu) regiónu. Takéto techniky môžu byť vykonané *in vitro* (na izolovanej DNA) alebo *in situ*, s použitím techník genetickej manipulácie alebo spracovaním mutagénymi činidlami.

Výhodne sú v replikačne-defektnom víruse zachované genómové sekvencie, ktoré sú nevyhnutné na enkapsidáciu vírusových častíc.

Retrovírusy sú integrujúce víruses, ktoré infikujú deliace sa bunky. Genóm retrovírusu obsahuje dva LTR, sekvenciu na enkapsidáciu a tri kódujúce regióny (gag, pol a env). Konštrukcia rekombinantných retrovírusových vektorov bola opísaná, pozri napríklad EP 453242, EP 178220, Bernstein et al., Genet. Eng. 7 (1985) 235; McCormick, BioTechnology 3 (1985) 689 atď. V rekombinantných vírusových vektoroch sú gag, pol a env gény obvykle deletované, úplne alebo čiastočne, a sú nahradené požadovanou heterológnou sekvenciou nukleovej kyseliny. Tieto vektory môžu byť vyrobené z rôznych typov retrovírusov, napríklad z MoMuL („Moloneyov vírus myšej leukémie“), MSV („Moloneyov vírus myšieho sarkómu“), HaSV („vírus Harveyho sarkómu“), SNV („vírus nekrozy sleziny“), RSV („vírus Rousovho sarkómu“) a Friend vírusu.

Všeobecne je na konštrukciu rekombinantných retrovírusov obsahujúcich sekvenciu kódujúcu LLG podľa predkladaného vynálezu konštruovaný plazmid, ktorý obsahuje LTR, enkapsidačnú sekvenciu a kódujúcu sekvenciu. Tento konštrukt je použitý na transfekciu nosičskej bunkovej línie, ktorá je schopná dodať „in trans“ retrovírusové funkcie, ktoré sú deficitné v plazmide. Všeobecne sú takto bloky bunkových línií schopné exprimovať gag, pol a env gény. Tieto bloky bunkových línií boli opísané v publikáciách podľa doterajšieho stavu techniky, napríklad bunková línia PA317 (patent USA č. 4861719); PsiCRIP bunková línia (WO 90/02806) a GP+envAm-12 bunková línia (WO 89/07150). Okrem toho môžu rekombinantné retrovírusové vektory obsahovať modifikácie v LTR na potlačenie transkripčnej aktivity, rovnako ako extenzívne enkapsidačné sekvencie, ktoré môžu obsahovať časť gag génu (Bender et al., J Virol. 61 (1987) 1639). Rekombinantné retrovírusové vektory sa čistia štandardnými technikami známymi v odbore.

Adeno-asociované víruses (AAV) sú DNA víruses relatívne malej veľkosti, ktoré sa môžu integrovať, stabilným a miestne špecifickým spôsobom, do genómu buniek, ktoré infikujú. Tieto víruses sú schopné infikovať široké spektrum buniek bez spôsobenia akýchkoľvek efektov na bunkový rast, morfológiu alebo diferenciáciu, a preto sa nezdá, že by vyvolávali u ľudí patologické stavy. Genóm AAV bol klonovaný, sekvencovaný a charakterizovaný. Obsahuje približne 4700 báz a obsahuje invertovaný terminálny opakujúci sa (ITR) región s približne 145 bázami na každom konci, ktorý slúži ako zdroj replikácie pre vírus. Zvyšok genómu je rozdelený do dvoch základných regiónov, ktoré majú enkapsidačnú funkciu: ľavú časť genómu obsahuje rep gén, ktorý sa zúčastňuje vírusovej replikácie a exprese vírusových génov; a pravú časť genómu obsahuje cap gén kódujúci kapsidové proteíny vírusu.

Použitie vektorov odvodených od AAV na prenos génov *in vitro* a *in vivo* bolo opísané v publikáciách podľa doterajšieho stavu techniky (pozri WO 91/18088; US 4797368; US 5139941; EP 488528). Tieto publikácie opisujú rôzne konštrukty odvodené od AAV, v ktorých sú rep a/alebo cap gény deletované a sú nahradené požadovaným genómom, a ďalej opisujú použitie týchto konštruktov na prenos požadovaného génu *in vitro* (do kultivovaných buniek) alebo *in vivo* (priamo do organizmu). Replikačne-defektný rekombinantný AAV podľa predkladaného vynálezu môže byť pripravený súčasnou transfekciou plazmidu obsahujúceho požadovanú sekvenciu nukleovej kyseliny obklopenú dvoma invertovanými terminálnymi repetitívnymi (ITR) regiónmi a plazmidom obsahujúcim enkapsidačné gény AAV (rep a cap gény), do bunkovej línie, ktorá je infikovaná ľudským pomocným vírusom (napríklad adenovírusom). Produkované AAV rekombinanty sa potom čistia štandardnými technikami. Vynález sa aj preto týka rekombinantného vírusu odvodeného od AAV, ktorého genóm obsahuje sekvenciu kódujúcu LLG polypeptid, obklopenú ITR AAV. Vynález sa rovnako týka plazmidu obsahujúceho sekvenciu kódujúcu LLG polypeptid obklopenú dvoma ITR z AAV. Takýto plazmid môže byť použitý na prenos LLG sekvencie, kde plazmid je v prípade potreby inkorporovaný do lipozomálneho vektora (pseudo-vírus).

Vo výhodnom uskutočnení je vektorom adenovírusový vektor.

Adenovíruses sú eukaryotické víruses, ktoré môžu byť modifikované na účinné dodanie nukleovej kyseliny podľa predkladaného vynálezu do rôznych typov buniek.

Existujú rôzne sérotypy adenovírusu. Z týchto sérotypov sú v predkladanom vynáleze prednostne použité typ 2 alebo typ 5 ľudského adenovírusu (Ad 2 alebo Ad 5), alebo adenovírus zvieracieho pôvodu (pozri WO 94/26914). Medzi tieto adenovíruses zvieracieho pôvodu, ktoré môžu byť použité v predkladanom vynáleze, patria psie, hovädzie, myšie (napríklad Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovčie, prasačie, vtáčie a opičie (napríklad SAV) adenovíruses. Výhodne je zvieracím adenovírusom psí adenovírus, najlepší CAV2 adenovírus (napríklad Manhattan alebo kmeň A26/61 (ATCC VR-800)).

Výhodne obsahujú replikačne-defektné adenovírusové vektory podľa predkladaného vynálezu ITR, enkapsidačnú sekvenciu a požadovanú nukleovú kyselinu. Ešte lepšie je aspoň jeden E1 región adenovírusového vektora nefunkčný. Delécia v E1 regióne výhodne rozprestiera v rozsahu od nukleotidu 455 do nukleotidu

3329 v sekvencii adenovírusu Ad5. Ďalšie regióny môžu byť tiež modifikované, konkrétne E3 región (WO 95/02697), E2 región (WO 94/28938), E4 región (WO 94/28152 a WO 94/12649) alebo akýkoľvek z neskorých génov L1 - L5. Defektné retrovírusové vektory sú opísané v WO 95/02697.

Vo výhodnom uskutočnení má adenovírusový vektor delécie v E1 a E4 regiónoch. Podľa iného výhodného uskutočnenia má adenovírusový vektor deléciu v E1 regióne, do ktorého je inzertovaný E4 región a sekvencie kódujúce LLG (pozri FR94 13355).

Replikačne-defektné rekombinantné adenovírusy podľa predkladaného vynálezu môžu byť pripravené akoukoľvek technikou známou v odbore (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195; EP 185573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). Konkrétne môžu byť pripravené homológnu rekombináciou medzi adenovírusom a plazmidom, ktorý obsahuje, okrem iného, požadovanú DNA sekvenciu. Homológna rekombinácia je vykonaná po súčasnej transfekcii uvedeného adenovírusu a plazmidu do vhodnej bunkovej línie. Použitá bunková línia by mala byť (i) transformovateľná uvedenými elementmi, a (ii) mala by obsahovať sekvencie, ktoré sú schopné doplniť časť genómu replikačne-defektného adenovírusu, výhodne v integrovanej forme, aby sa predišlo riziku rekombinácie. Ako príklady bunkových línií, ktoré môžu byť použité, je možno uviesť bunkové línie ľudských embryonálnych ľadvín 293 (Graham et al., J. Genet. Virol. 36 (1977) 59), ktorá obsahuje ľavostrannú časť genómu Ad5 adenovírusu (12 %) integrovanú do svojho genómu, a bunkové línie, ktoré sú schopné doplniť funkcie E1 a E4, a ktoré sú opísané v publikovaných medzinárodných patentových prihláškach WO 94/26914 a WO 95/02679. Rekombinantné adenovírusy sú získané a prečistené s použitím štandardných techník molekulárnej biológie, ktoré sú v odbore dobre známe.

Zníženie génovej expresie s použitím antisense nukleových kyselín môže byť vykonané na translačnej alebo na transkripčnej úrovni. Antisense nukleovej kyseliny podľa predkladaného vynálezu sú výhodne fragmenty nukleovej kyseliny, ktoré sú schopné špecifickej hybridizácie s celou alebo s časťou nukleovej kyseliny kódujúcej LLG alebo so zodpovedajúcou messenger RNA. Tieto antisense nukleovej kyseliny môžu byť syntetické oligonukleotidy, prípadne modifikované na účely zlepšenia ich stability a selektivity. Môžu nimi byť tiež DNA sekvencie, ktorých expresia v bunkách vedie k produkcii RNA, ktorá je komplementárna k celej alebo k časti mRNA pre LLG. Antisense nukleové kyseliny môžu byť pripravené expresiou celej alebo časti sekvencie vybrané zo skupiny zahrnujúcej SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7 alebo SEQ ID NO: 11, v opačnej orientácii, ako je to opísané v EP 140308. Na praktické použitie v predmetnom vynáleze je vhodná akákoľvek dĺžka antisense sekvencie, pokiaľ je schopná zníženia alebo blokovania expresie LLG. Výhodne má antisense sekvencia dĺžku aspoň 20 nukleotidov. Príprava a použitie antisense nukleových kyselín, DNA kódujúcej antisense RNA a použitie oligo a genetických antisense sekvencií je opísané vo WO 92/15680, pričom obsahy týchto publikácií tu slúžia ako odkazové materiály.

D) Protilátky

Predkladaný vynález poskytuje protilátky proti LLG polypeptidu. Tieto protilátky môžu byť monoklonálne protilátky alebo polyklonálne protilátky. Predkladaný vynález obsahuje chimerické, jednoreťazcové a humanizované protilátky, rovnako ako Fab fragmenty a produkty Fab expresnej knižnice.

Polyklonálne protilátky môžu byť pripravené proti antigénnemu fragmentu LLG polypeptidu, ako je opísané v príklade 4A. Protilátky môžu byť tiež vyrobené proti intaktnému LLG proteínu alebo polypeptidu, alebo proti fragmentu, derivátu alebo epitopu proteínu alebo polypeptidu. Protilátky môžu byť získané po podaní proteínu, polypeptidu, fragmentu, derivátu alebo epitopu zvieratú, s použitím techník a postupov, ktoré sú v odbore známe.

Monoklonálne protilátky môžu byť pripravené podľa metódy, ktorú opísal v publikácii Mishell, B.B. et al., *Selected Methods in Cellular Immunology* (W.H. Freeman, ed.), San Francisco (1980). Stručne, polypeptid podľa predkladaného vynálezu sa použije na imunizáciu buniek sleziny Balb/c myši. Imunizované bunky sa fúzujú s myelómovými bunkami. Fúzané bunky obsahujúce charakteristiky slezinových a myelómových buniek sa izolujú rastom na HAT médiu, čo je médium, ktoré usmrcuje obidva pôvodné typy buniek, ale umožňuje prežitie a rast fúzovaných buniek.

Monoklonálne protilátky podľa predkladaného vynálezu môžu byť „humanizované“, aby sa zabránilo vyvolaniu imunitnej odpovede hostiteľa proti protilátkam. „Humanizovaná protilátka“ je taká protilátka, v ktorej sú komplementaritu určujúce regióny (CDR) a/alebo iné časti pracovného rámca variabilnej domény ľahkého a/alebo ťažkého reťazca odvodené od iného než ľudského imunoglobulínu, ale zostávajúce časti molekuly sú odvodené od jedného alebo viacerých ľudských imunoglobulínov. Medzi humanizované protilátky tiež patria protilátky charakterizované humanizovaným ťažkým reťazcom spojeným s donorovým alebo akceptorovým nemodifikovaným ľahkým reťazcom alebo chimerickým ľahkým reťazcom, alebo naopak. Humanizácia protilátok môže byť zrealizovaná technikami bežne známymi v tomto odbore (pozri napríklad G.E. Mark and E.A. Padlan, „Chapter 4, Humanization of Monoclonal Antibodies“, *The Handbook of Experimental Pharmacology*, zväzok 113, Springer-Verlag, New York, 1994). Na expresiu humanizovaných protilátok môžu byť použité transgénne zvieratá.

Techniky bežne známe v tomto odbore používané na získanie jednoreťazcových protilátok môžu byť

upravené na získanie jednoreťazcových protilátok k imunogénnym polypeptidom a proteínom podľa predkladaného vynálezu.

Anti-LLG protilátky sú užitočné v testoch na detekciu alebo kvantifikáciu hladín LLG. V jednom uskutočnení tieto testy umožňujú klinickú diagnostiku a hodnotenie LLG pri rôznych patologických stavoch a umožňujú testovanie účinnosti liečby.

E) Spôsoby skrínungu agonistov a antagonistov

Predkladaný vynález obsahuje spôsoby skrínungu knižníc malých molekúl alebo v prírode sa vyskytujúcich zlúčenín na agonistickú aktivitu (zosilňovaciu alebo ko-aktivačnú aktivitu vrátane proteínových ko-aktivátorov) alebo antagonistickú aktivitu (inhibičnú) vzhľadom na LLGXL. Potenciálny agonista alebo antagonista je kontaktovaný s LLGXL proteínom a substrátom LLGXL a meria sa schopnosť potenciálneho agonistu alebo antagonistu zosilňovať alebo inhibovať aktivitu LLGXL.

LLGXL proteín použitý v tejto technike môže byť produkovaný rekombinantne v rôznych hostiteľských bunkách vrátane buniek cicavcov (ako sú uvedené v príklade 7), bakulovírusom infikovaných hmyzích buniek, kvasiniek a baktérií. LLG expresia v stabilne transfektovaných CHO bunkách môže byť optimalizovaná metotrexátovou amplifikáciou buniek. LLGXL proteín môže byť tiež prečistený z prirodzených zdrojov, ako je ľudská plazma, extrakty z placenty, alebo z kondicionovaného média kultivovaných endotelových buniek, THP-1 buniek alebo makrofágov.

Optimalizácia parametrov testu vrátane pH, koncentrácií iónov, teploty, koncentrácií substrátu a emulzifikačných podmienok, určí odborník pracujúci v danom odbore.

Substituenty mastných kyselín substrátov sa môžu odlišovať v dĺžke reťazca, rovnako ako v množstve a pozícii nenasýtených väzieb. Substráty môžu byť rádioaktívne značené v niekoľkých pozíciách. Fosfolipidové substráty, ako je napríklad fosfatidylcholí, môžu byť rádioaktívne značené, napríklad v pozícii Sn-1 alebo Sn-2 mastnej kyseliny, alebo na glycerole, fosfáte alebo polárnej hlavnej skupine (cholín v prípade fosfatidylcholínu).

Ako alternatíva k rádioaktívnym značiacim substrátom môžu byť pri skrínungových metódach použité tiež iné triedy značkovacích substrátov, ako sú fluorescentné substráty alebo substráty obsahujúce tioskupinu.

Fluorescentné substráty sú obzvlášť užitočné na uskutočnenie skrínungových testov, pretože enzymatická katalýza môže byť meraná kontinuálne meraním intenzity fluorescence, bez fyzikálnej separácie (extrakcie) produktov od substrátu. Príkladom fluorescentného fosfatidylcholínového substrátu je C₆ NBD-BC{1-acyl-2-[6-(nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4yl)amino]kaproylfosfatidylcholín.

Substráty obsahujúce tio-skupinu zahŕňajú 1,2-bis(hexanoyltio)-1,2-dideoxy-sn-glycero-3-fosforylcholín (L.J. Reynolds, W.N. Washburn, R.A. Deems a E.A. Dennis, 1991, *Methods in Enzymology* 197: 3 - 23; L. Yu a E.A. Dennis, 1991, *Methods in Enzymology* 197: 65 - 75; L.A. Wittenauer, K. Shirai, R.L. Jackson a J.D. Johnson, 1984, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118: 894 - 901).

F) Hydrolyza fosfatidylcholínových esterov

Predkladaný vynález obsahuje spôsob enzymatickej hydrolyzy fosfatidylcholínových esterov, napríklad na priemyselné použitie alebo na potravinárske spracovanie, alebo na použitie v prácach prostriedkoch. Polypeptidy podľa predkladaného vynálezu môžu byť použité na hydrolyzu fosfatidylcholínových esterov v roztoku, alebo môžu byť enzýmy naviazané na pevný nosič, ktorý je potom uvedený do kontaktu so substrátom. Tento spôsob môže byť použitý na výrobu lyzofosfolipidov a voľných mastných kyselín.

G) Prostriedky

Predkladaný vynález obsahuje prostriedky v biologicky kompatibilnom (biokompatibilnom) roztoku, ktoré obsahujú polypeptidy, nukleové kyseliny, vektory a protilátky podľa predkladaného vynálezu. Biologicky kompatibilný roztok je roztok, v ktorom je polypeptid, nukleová kyselina, vektor alebo protilátka podľa predkladaného vynálezu udržiavaný v aktívnej forme, napríklad vo forme zachovávajúcej biologickú aktivitu. Napríklad polypeptid podľa predkladaného vynálezu bude mať fosfolipázovú aktivitu; nukleová kyselina bude schopná replikácie, translácie informácie alebo bude schopná hybridizácie na komplementárnu nukleovú kyselinu; vektor bude schopný transfekcie cieľových buniek; protilátka sa bude viazať na polypeptid podľa predkladaného vynálezu. Všeobecne bude takýto biologicky kompatibilný roztok vodný roztok pufru, napríklad Tris, fosfátového alebo HEPES pufru, obsahujúci ióny solí. Obvykle bude koncentrácia iónov solí podobná fyziologickým koncentráciám. Podľa jedného zo špecifických uskutočnení je biokompatibilný roztok farmaceuticky prijateľný prípravok. Biologicky kompatibilné roztoky môžu obsahovať stabilizačné a konzervačné činidlá.

Takéto prostriedky môžu byť pripravené na lokálny, orálny, parenterálny, intranazálny, podkožný a intraokulárny spôsob podania. Parenterálne podanie zahŕňa intravenóznú injekciu, intramuskulárnu injekciu, intraarteriálnu injekciu alebo infúziu. Prostriedok môže byť podaný parenterálne v jednotkovej dávke, obsahujúcej štandardné, dobre známe netoxické fyziologicky prijateľné nosiče, adjuvans a vehikula.

Výhodným sterilným prostriedkom na injekčné podanie môže byť roztok alebo suspenzia v netoxickom parenterálne prijateľnom rozpúšťadle alebo riedidle. Príklady farmaceuticky prijateľných nosičov sú fyziologický roztok, pufrovaný fyziologický roztok, izotonický fyziologický roztok (napríklad dihydrogén- alebo hydrogenufosforečnan sodný, chlorid sodný, draselný, vápenatý alebo horečnatý, alebo zmesi takýchto solí), Ringerov roztok, dextróza, voda, sterilná voda, glycerol, etanol, a ich kombinácie. Ako rozpúšťadlá alebo suspenzačné činidlá sú výhodne použité 1,3-butándiol a sterilné neprchavé oleje. Môže byť použitý akýkoľvek nedráždivý neprchavý olej vrátane syntetických mono- alebo diglyceridov. Mastné kyseliny, ako je kyselina olejová, sa môžu tiež použiť pri príprave injekčných roztokov.

Médiom použitým pre tento prostriedok môže byť tiež hydrogél, ktorý sa pripraví z akéhokoľvek biokompatibilného alebo netoxického (homo- alebo hetero-) polyméru, ako je hydrofilný polymér polyakrylovej kyseliny, ktorý môže slúžiť ako hubovitá substancie absorbujúca liečivo. Takéto polyméry boli opísané, napríklad, v medzinárodnej publikovanej patentovej prihláške WO 93/08845, ktorej celý obsah je tu uvedený ako odkazový materiál. Niektoré z týchto hydrogélů, obzvlášť tie, ktoré sú získané z etylénoxidu a/alebo propylénoxidu, sú bežne komerčne dostupné. Hydrogél môže byť umiestnený priamo na povrchu liečeného tkaniva, napríklad počas chirurgického zákroku.

Iným výhodným uskutočnením predkladaného vynálezu je farmaceutický prostriedok obsahujúci replikačne-defektný rekombinantný vírus a poloxamér. Presnejšie sa vynález týka prostriedku obsahujúceho replikačne-defektný rekombinantný vírus obsahujúci nukleovú kyselinu kódujúcu LLG polypeptid a poloxamér. Výhodným poloxamérom je Poloxamér 407, ktorý je bežne komerčne dostupný (BASF, Parsippany, NJ), pričom ide o netoxický, biokompatibilný polyol. Poloxamér impregnovaný rekombinantnými vírusmi môže byť umiestnený priamo na povrchu liečeného tkaniva, napríklad počas chirurgického zákroku. Poloxaméry majú v podstate rovnaké výhody ako hydrogély a majú menšiu viskozitu.

H) Spôsoby liečby

Predkladaný vynález je využiteľný na liečebné postupy, pri ktorých sa podáva účinné množstvo prostriedku podľa predkladaného vynálezu ľuďom alebo iným živočíchom.

Účinné množstvo sa môže líšiť, podľa veku, typu a závažnosti liečeného stavu, telesnej hmotnosti, požadovaného trvania liečby, spôsobu podania a iných parametrov. Účinné množstvo určuje lekár alebo iný kvalifikovaný zdravotník.

Polypeptidy podľa predkladaného vynálezu sú všeobecne podané v dávke od približne 0,01 mg/kg do približne 100 mg/kg, výhodne od približne 0,1 mg/kg do približne 50 mg/kg a najlepšie od približne 1 mg/kg do približne 10 mg/kg telesnej hmotnosti na deň.

Rekombinantné vírusy podľa predkladaného vynálezu sú obvyčajne pripravené a podané vo forme dávok medzi približne 10^4 pfu a približne 10^{14} pfu. V prípade AAV a adenovírusov sú výhodne použité dávky od približne 10^6 pfu a približne 10^{11} pfu. Termín pfu („plaky tvoriace jednotky“) zodpovedá infekčnému potenciálu suspenzie viriónov a je určený infikovaním vhodnej bunkovej kultúry a meraním počtu vytvorených plakov. Techniky na určenie pfu titra vírusového roztoku sú v odbore dobre známe.

Predkladaný vynález je použiteľný na liečbu aterosklerózy, kde uvedená ateroskleróza vzniká v dôsledku nadmernej, abnormálnej alebo neadekvátnej expresie aktivity LLG polypeptidu.

Predkladaný vynález je ďalej použiteľný na liečbu ľudí alebo zvierat majúcich nežiaduci lipidový profil, kde uvedený nežiaduci lipidový profil vzniká v dôsledku abnormálne vysokej alebo neadekvátnej expresie aktivity LLG polypeptidu.

Predkladaný vynález je ďalej použiteľný na liečbu diabetes mellitus, hyperlipidémie, intrahepatálnej cholestázy alebo iných metabolických ochorení, kde uvedený diabetes mellitus, hyperlipidémia, intrahepatálna cholestáza alebo iné metabolické ochorenia vznikajú v dôsledku abnormálne vysokej alebo neadekvátnej expresie aktivity LLG polypeptidu.

1) Liečba nežiaducich lipidových profilov spojených so zvýšenou expresiou LLG polypeptidu

Spôsoby zníženia expresie LLG polypeptidu pri liečbe stavov, pri ktorých aktivita LLG polypeptidu spôsobuje ochorenie alebo poruchu spojenú s nežiaducim lipidovým profilom zahŕňajú, bez akéhokoľvek obmedzenia, podanie prostriedku obsahujúceho antisense nukleovú kyselinu, podanie prostriedku obsahujúceho intracelulárny väzbový proteín, ako je protilátka, podanie prostriedku obsahujúceho LLGN polypeptid alebo iný fragment LLG a podanie prostriedku obsahujúceho nukleovú kyselinu, ktorá kóduje LLGN polypeptid alebo iný fragment LLG.

Podľa jedného uskutočnenia je prostriedok obsahujúci antisense nukleovú kyselinu použitý na zníženie alebo blokovanie expresie LLG. Podľa jedného z výhodných uskutočnení kóduje nukleová kyselina molekuly antisense RNA. V tomto uskutočnení je nukleová kyselina operatívne naviazaná na signálne sekvencie umožňujúce expresiu sekvencie nukleovej kyseliny a je zavedená do buniek, výhodne s použitím rekombinantných vektorov, ktoré exprimujú antisense nukleovú kyselinu po zavedení vektora do bunky. Ako príklady vhodných vektorov je možné uviesť plazmidy, adenovírusy, adeno-asociované vírusy, retrovírusy a herpes

vírusy. Výhodne je vektorom adenovírus. Najvýhodnejším vektorom je replikačne-defektný adenovírus obsahujúci deléciu v E1 a/alebo E3 regiónoch vírusu.

Podľa iného uskutočnenia je expresia LLG znížená alebo blokována expresiou sekvencie nukleovej kyseliny kódujúcej intracelulárny väzbový proteín, ktorý je schopný selektívnej interakcie s LLG. V publikovaných medzinárodných patentových prihláškach WO 94/29446 a WO 94/02610, ktorých obsahy sú tu uvedené ako odkazy, je opisovaná transfekcia buniek génmi, ktoré kódujú intracelulárne väzbové proteíny. Medzi intracelulárne väzbové proteíny patrí akýkoľvek proteín schopný selektívnej interakcie, alebo väzby, s LLG v bunkách, v ktorých je exprimovaný a ktorý je schopný neutralizovať funkciu naviazaného LLG. Výhodne je intracelulárnym väzbovým proteínom protilátka alebo fragment protilátky. Najvýhodnejšie je intracelulárnym väzbovým proteínom jednoreťazcová protilátka.

V publikovanej medzinárodnej patentovej prihláške WO 94/02610 sa opisuje príprava protilátok a identifikácia nukleovej kyseliny kódujúca určitú protilátku. S použitím LLG alebo jeho fragmentu je špecifická monoklonálna protilátka pripravená technikami, ktoré sú v tomto v odbore známe. Potom sa na použitie v spôsobe podľa predkladaného vynálezu pripraví vektor obsahujúci nukleovú kyselinu kódujúcu intracelulárny väzbový proteín, alebo jeho časť, ktorý je schopný expresse v hostiteľskej bunke.

Alternatívne môže byť aktivita LLG blokována podaním neutralizačnej protilátky do obehu. Takáto neutralizačná protilátka môže byť podaná priamo ako proteín, alebo môže byť exprimovaná z vektora (so sekrečným signálom).

Podľa ďalšieho uskutočnenia môže byť aktivita LLGXL inhibovaná podaním prostriedku obsahujúceho LLGN polypeptid alebo iný fragment LLG. Takýto prostriedok môže byť podaný vhodným spôsobom, ako je orálny, lokálny, intravenózný, intraperitoneálny, intramuskulárny, subkutánný, intranazálny alebo intradermálny spôsob podania. Prostriedok môže byť podaný priamo alebo môže byť enkapsulovaný (napríklad v lipidovom systéme, aminokyselinových mikrosférach alebo v globulárnych dendriméroch). Polypeptid môže byť v niektorých prípadoch naviazaný na iný polymér, ako je sérový albumín alebo polyvinylpyrolidón.

Podľa ďalšieho uskutočnenia je aktivita LLGXL inhibovaná pomocou zlúčenín s malou molekulovou hmotnosťou, ktoré interferujú s jeho enzymatickými vlastnosťami alebo ktoré bránia jeho rozpoznaniu vhodnými bunkovými väzbovými miestami.

Podľa ďalšieho uskutočnenia je aktivita LLGXL inhibovaná pomocou génovej terapie, to znamená pomocou podania prostriedku obsahujúceho nukleovú kyselinu, ktorá kóduje a riadi expresiu LLGN polypeptidu, alebo iného fragmentu LLG.

Podľa jedného zo špecifických uskutočnení má LLG gén podľa predkladaného vynálezu tiež afinitu na heparín. Väzba LLG polypeptidu na extracelulárny heparín v lúmene ciev umožňuje väzbu LLG na LDL a akceleráciu vychytávania LDL tým, že pôsobí ako mostík medzi LDL a extracelulárnym heparínom. Predpokladá sa, že v lokalizovanej oblasti aterosklerotickej lézie akceleruje zvýšená lipázová aktivita aterogénny proces (Zilversmit, D.B. (1995) Clin. Chem. 41: 153 - 158; Zambon, A., Torres, A., Bijvoet, S., Gagne, C., Moojani, S., Lupien, P.J., Hayden, M.R. a Brunzell, J.D. (1993) Lancet 341: 1119 - 1121). Toto môže byť spôsobené vyššou väzbou a vychytávaním lipoproteínov cievnych tkanív, ktoré je spôsobené lipázami (Eisenberg, S., Sehayek, E., Olivercon, T. a Vlodavsky, I. (1992) J. Clin. Invest. 90: 2013 - 2021; Tabas, I., Li, I., Brocia, R.W., Xu, S.W., Swenson, T.L., Williams, K.J. (1993) J. Biol. Chem. 268: 20419 - 20432; Nordestgaard, B.G. a Nielsen, A.G. (1994) Curr. Opin. Lipid. 5: 252 - 257; Williams, K.J. a Tabas, I. (1995) Art. Thomb. and Vasc. Biol. 15: 551 - 561). Ďalej, vysoká lokálna hladina lipázovej aktivity môže viesť k cytotoxickým koncentráciám mastných kyselín a lyzofosfatidylcholínu v prekurzorových aterosklerotických léziách. Táto jednotlivá aktivita LLG môže spôsobovať vývoj alebo progresiu aterosklerózy, obzvlášť v súvislosti s vysokými hladinami lipidov u subjektu, ktoré sú spôsobené diétnymi alebo genetickými faktormi. Týmto spôsobom predkladaný vynález umožňuje inhibíciu akumulácie lipoproteínu tým, že inhibuje expresiu LLG polypeptidu alebo jeho väzbu na lipoproteín (napríklad na LDL).

2) Liečba nežiaducich lipidových profilov spojených s nedostatočnou aktivitou LLG polypeptidu

Medzi spôsoby na zvýšenie expresse LLG na liečbu tých stavov, pri ktorých aktivita LLG polypeptidu spôsobuje ochorenie alebo poruchu spojenú s nežiaducim lipidovým profilom, patria bez akéhokoľvek obmedzenia, podávanie prostriedku obsahujúceho LLGXL polypeptid a podávanie prostriedku obsahujúceho nukleovú kyselinu, ktorá kóduje LLGXL polypeptid.

Podľa jedného z uskutočnení sa aktivita LLGXL zvýši podaním prostriedku obsahujúceho LLGXL polypeptid. Takýto prostriedok môže byť podaný ľubovoľným vhodným spôsobom, ako je orálny, lokálny, intravenózný, intraperitoneálny, intramuskulárny, subkutánný, intranazálny alebo intradermálny spôsob podania. Prostriedok môže byť podaný priamo, alebo môže byť enkapsulovaný (napríklad v lipidovom systéme, aminokyselinových mikrosférach alebo v globulárnych dendriméroch). Polypeptid môže byť, v niektorých prípadoch, naviazaný na iný polymér, ako je sérový albumín alebo polyvinylpyrolidón.

Podľa iného uskutočnenia sa aktivita LLGXL zvýši pomocou zlúčenín malej s molekulovou hmotnosťou, ktoré zvyšujú expresiu LLGXL na úroveň transkripcie, translácie alebo na post-translačnú úroveň.

Podľa iného uskutočnenia sa aktivita LLGXL zvýši pomocou génovej terapie, to znamená pomocou podania prostriedku obsahujúceho nukleovú kyselinu, ktorá kóduje a riadi expresiu LLGXL polypeptidu.

Intrahepatálna cholestáza môže byť charakterizovaná zvýšenou hladinou sérového cholesterolu a fosfolipidov. Novoopísaný krysi model intrahepatálnej cholestázy indukovanej faloidínom demonštruje signifikantné zvýšenie sérových hladín cholesterolu a fosfolipidov (Ishizaki, K., Kinbara, S., Miyazawa, N., Takeuchi, Y., Hirabayashi, N., Kasai, H. a Araki, T. (1997) *Toxicol. Letters* 90: 29 - 34). Prostriedky podľa predkladaného vynálezu môžu byť použité na liečbu intrahepatálnej cholestázy u pacientov, ktorí majú zvýšený sérový cholesterol a/alebo fosfolipidy. Okrem toho, tento model tiež vykazuje závažné zníženie exkretnej rýchlosti cholesterolu žľazou. LLG polypeptidy a nukleové kyseliny podľa predkladaného vynálezu môžu byť použité na liečbu pacientov s poruchou biliárneho vylučovacieho systému.

Intrahepatálna cholestáza je tiež charakterizovaná ako porušený odtok žlče z pečene. Novo boli miesta progresívnej familiárnej intrahepatálnej cholestázy (PFIC alebo Bylerova choroba) a benigne recidivujúce intrahepatálne cholestázy (BRIC) mapované na 18q21-q22 (Carlton, V.E.H., Knisely, A.S., a Freimer, N.B. (1995) *Hum. Mol. Genet.* 4: 1049 - 1053 a Houwen, R.H., Baharloo, S., Blankenship, K., Raeymaekers, P., Juyn, J., Sandkuijl, L.A. a Freimer, N.B., (1994) *Nature Genet.* 8: 380 - 386, v príslušnom poradí. Pretože je LLG gén lokalizovaný v tomto chromozomálnom regióne 18q21, môže byť LLG gén alebo prostriedok podľa predkladaného vynálezu použitý na liečbu pacientov s intrahepatálnou cholestázou, ktorá je spôsobená mutáciou alebo defektnou expresiou PFIC/BRIC génu.

Podľa ďalšieho uskutočnenia môže byť LLG gén alebo polypeptid podľa predkladaného vynálezu použitý na liečbu pacientov s intrahepatálnou cholestázou, ktorá nie je spôsobená defektom v PFIC/BRIC génoch v 18q21-q22. Nedávne štúdie naznačili, že iné miesto, lokalizované mimo 18q21-q22 región, môže tiež produkovať PFIC fenotyp (Strautnieks, S.S., Kagalwalla, A.F., Tanner, M.S., Gardiner, R.M. a Thompson, R.J. (1996) *J. Med. Genet.* 33: 833 - 836). Akokoľvek, podanie LLG polypeptidu, buď priame, alebo v génovej terapii, môže zmierniť túto formu ochorenia.

V génovej terapii je jedna alebo viac nukleových kyselín kódujúcich polypeptid, rovnako ako regulačných regiónov kontrolujúcich ich expresiu, prenesená do cieľových buniek človeka alebo zvierat. Tento prenos je vykonaný buď *ex vivo* postupom, pri ktorom sú nukleové kyseliny prenesené do buniek v laboratóriu a modifikované bunky sú potom podané ľuďom alebo iným živočíchom, alebo *in vivo* postupom, pri ktorom sú nukleové kyseliny prenesené priamo do buniek človeka alebo iného živočicha. Prenos nukleových kyselín môže byť vykonaný s použitím vírusových alebo nevírusových vektorov opísaných skôr.

Nevírusové vektory môžu byť prenesené do buniek s použitím metód bežne známych v odbore vrátane koprecipitácie fosforečnanom vápenatým, lipofekcie (s použitím syntetických aniónových alebo kationových lipozómov), receptormi sprostredkovaného génového prenosu, injekcie holej DNA, elektroporácie a biobalistiky alebo urýchlených častíc.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Nasledujúce príklady ilustrujú vynález. Tieto príklady sú iba ilustratívne a nijako neobmedzujú rozsah predkladaného vynálezu.

Príklad 1: Identifikácia diferenciálne exprimovanej cDNA

A) Príprava RNA

Ľudské monocyty THP-1 (Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., a Klenk, D.C. (1985) *Anal. Biochem.* 150: 76 - 85) sa kultivujú v RPMI-1640 médiu (GIBCO) s 25 mM HEPES, 10 % fetálnym hovädzím sérom, 100 jednotkami/ml penicilínu G, sodnej soli a 100 jednotkami/ml streptomycínsulfátu. Bunky sa umiestnia na 15 cm tkanivové kultivačné disky v koncentrácii $1,0 \times 10^7$ buniek/disk a spracujú sa 40 ng/ml forbol-12-myristat-13-acetátom (Sigma) počas 48 hodín kvôli indukcii diferenciácie buniek. Ľudské lipoproteíny s nízkou hustotou (LDL) sa zakúpia od Calbiochem a dialyzujú sa do vyčerpania proti PBS pri 4 °C. LDL sa potom riedi na 500 µg/ml a dialyzuje sa proti 5 µM CuSO₄ v PBS pri 37 °C počas 16 hodín. Po ukončení oxidácie sa LDL dôkladne dialyzuje proti 150 mM NaCl, 0,3 mM EDTA a potom sa sterilizuje filtráciou. Koncentrácia proteínu sa určí BCA metódou (Schuhm J., Fairclough, G.F. a Haschemeyer, R.H. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3173 - 3177) (Pierce). Stupeň oxidácie sa určí TBARS metódou (Chomczynski, P. (1993) *Biotechniques* 15: 532 - 537) a je medzi 25 - 30 nmol MDA ekvivalentov/mg proteínu. Diferencované THP-1 bunky sa vystavia na 24 hodín buď 50 µg/ml oxidovaného LDL, alebo NaCl-EDTA pufru v RPMI médiu s 10 % lipoprotein-deficientným fetálnym hovädzím sérom (Sigma). Na získanie RNA sa platne premyjú 10 ml PBS a potom sa do každej platne pridá 14 ml TRIZOL (Liang, P. a Pardee, A.B. (1992) *Science* 257: 967 - 971). Roztok sa niekoľkokrát pipetuje kvôli zmiešaniu, potom sa rovnaké vzorky zhromaždia do centrifugačných

skúmaviek a pridajú sa 3 ml chloroformu na platňu a zrealizuje sa miešanie. Skúmavky sa centrifugujú pri 12000 x g počas 15 minút. Po centrifugácii sa horná vrstva prenesie do novej skúmavky a pridá sa 7,5 ml izopropanolu na platňu a zrealizuje sa miešanie. Skúmavky sa centrifugujú pri 12000 x g počas 20 minút. Peleta sa premyje ľadovo chladným 70 % etanolom a suší sa pri laboratórnej teplote. Pelety sa resuspendujú v 500 µl TE (Tris-EDTA) a spracujú s 200 jednotkami DNAzy I bez RNAzy a 200 jednotkami RNazinového placentárneho inhibítora RNAzy (Promega) počas 30 minút pri 37 °C. RNA sa prečistí postupnými extraktami fenolom, fenol/chloroform/izoamylalkoholom (25 : 24 : 1) a chloroform/izoamylalkoholom (24 : 1) a potom sa zrealizuje zrážanie etanolom.

10 B) Syntéza DNA

Syntéza cDNA a PCR amplifikácia sa uskutoční podľa protokolu uvedeného v Differential Display Kite, verzia 1.0 (Display System Biotechnology, Inc.). Tento systém je založený na technike, ktorú pôvodne opísali Liang a Pardee (Mead, D.A., Pey, N.K., Herrnstadt, C., Marcil, R.A., a Smith, L.M. (1991) Bio/Technology 9: 657 - 663). Páry primérov, ktoré viedli k získaniu fragmentu cDNA obsahujúceho prvú informáciu o lipáze podobnom géne, boli „downstream“ primér 7 a „upstream“ primér 15. cDNA na amplifikáciu bola syntetizovaná nasledujúcim spôsobom, s použitím RNA získanej z THP-1 buniek ošetrovaných PMA vystavených buď pufru, alebo oxidovanému LDL: 3 µl 25 µM „downstream“ priméru 7 a 7,5 µl vody spracovanej dietylpyrouhličitanom (DEPC) sa pridá k 300 ng (3,0 µl) THP z každej vzorky THP-1 RNA. Táto zmes sa zohreje na 70 °C počas 10 minút a potom sa ochladí na ľade. Do tejto skúmavky sa pridajú 3 µl 5x PCR pufru (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl) (GIBCO), 3 µl 25 mM MgCl₂, 3 µl 0,1 M DTT, 1,2 µl 500 µM dNTP, 0,7 µl RNazínu a 5,6 µl vody spracovanej DEPC. Skúmavky sa inkubujú počas 2 minút pri laboratórnej teplote a potom sa pridá 1,5 µl (300 jednotiek) Superscript II RNAza H - reverznej transkriptázy (GIBCO). Skúmavky sa inkubujú postupne pri laboratórnej teplote počas 2 minút, pri 37 °C počas 60 minút a pri 95 °C počas 5 minút a potom sa ochladia na ľade. PCR amplifikácia sa vykoná s použitím „master“ zmesi obsahujúcej 117 µl 10x PCR pufru (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 15 mM MgCl₂ a 0,01 % (hmot./obj.) želatíny), 70,2 µl 25 mM MgCl₂, 5,9 µl α-³²P dATP (10 mCi/ml, DuPont NEN), 4,7 µl 500 µM zmesi dNTP, 11 µl Ampli-Taq DNA polymerázy (5 jednotiek/µl, Perkin-Elmer) a 493,3 µl vody spracovanej DEPC. Do každej reakčnej zmesi sa pridá 12 µl master zmesi do 2 µl „downstream“ priméru 7, 1 µl cDNA a 5 µl „upstream“ priméru 15. Reakčné zmesi sa zohrejú na 94 °C počas 1 minúty, potom sa vykoná 40 teplotných cyklov s denaturačným krokom 94 °C počas 15 sekúnd, krokom tepelného spracovania pri 40 °C počas 1 minúty a krokom extenzie pri 72 °C počas 30 sekúnd. Po 40 cykloch sa reakčné zmesi inkubujú pri 72 °C počas 5 minút a uskladnia sa pri 10 °C. PCR reakcie sa vykonávajú na Perkin-Elmer GeneAmp System 960 prístroji na teplotné cykly.

4 µl amplifikačnej reakčnej zmesi sa zmieša s rovnakým objemom zavádzacieho pufru (0,2 % brómfenolová modrá, 0,2 % Xylén cyanol, 10 mM EDTA, pH 8,0 a 20 % glycerol). 4 µl tejto zmesi sa nechajú prejsť 6 % nedenaturačným sekvenčným gélom počas 3 hodín pri 1200 V (konštantné napätie). Gél sa suší pri 80 °C počas 1,5 hodiny a exponuje sa na Kodak XAR filme. Produkt amplifikácie nájdený iba v reakčnej zmesi obsahujúcej cDNA z THP-1 buniek vystavených oxidovanému LDL sa identifikuje a exciduje z gélu. 100 µl vody spracovanej DEPC sa pridá do mikrocentrifúgovej skúmavky obsahujúcej excidovaný gélový fragment a inkubuje sa počas 30 minút pri laboratórnej teplote a potom pri 95 °C 15 min.

Na reamplifikáciu PCR produktu sa 26,5 µl eluovanej DNA použije v amplifikačnej reakčnej zmesi, ktorá tiež obsahuje 5 µl 10x PCR pufru, 3 µl 25 mM MgCl₂, 5 µl 500 µM dNTP, 5 µl 2 µM „downstream“ priméru 7, 7,5 µl „upstream“ priméru 15 a 0,5 µl Amplitaq polymerázy. Parametre cyklov pre PCR a prístroje sú rovnaké, ako bolo opísané. Po amplifikácii sa 20 µl reamplifikovaného produktu analyzuje na agarózovom géle a 4 µl sa použijú na subklonovanie PCR produktov do vektora pCRII s použitím TA klonovacieho systému (Frohman, M.A., Dush, M.K. a Martin, G.R. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8998 - 9002) (Invitrogen). Po ligácii počas noci pri 14 °C sa produkty ligácie použijú na transformáciu *E. coli*. Vzniknuté transformanty sa odoberú a 3 ml kultúr kultivovaných počas noci sa použijú v plazmidových miniprípravkoch. Veľkosti inzertov sa určia pomocou trávenia plazmidov EcoRI a klony obsahujúce inzerty približnej veľkosti pôvodného PCR produktu sa sekvencujú s použitím fluorescenčných farbív - terminačných činidiel (Prism, Applied Biosystems) a Applied Biosystems 373 DNA sekvenčného prístroja. Sekvencia produktu PCR je uvedená na obr. 2. Sekvencie amplifikačných primérov sú podčiarknuté.

C) 5'Race reakcia

55 Extenzia cDNA identifikovaná pomocou RT-PCR sa vykoná pomocou 5'RACE systému (Loh, E.Y., Eliot, J.F., Cwirla, S., Lanier, L.L., a Davis, M.M. (1989) Science 243: 217 - 219; Simms, D., Guan, N., a Sitarman, K., (1991) Focus 13: 99) (GIBCO). 1 µg THP-1 RNA (ošetrenej oxidovaným LDL) použitá najskôr v diferenciálnych zobrazovacích reakciách sa použije v 5'RACE postupe:

1 μ l (1 μ g) RNA sa zmieša s 3 μ l (3 pmol) priméru 2a a 11 μ l vody spracovanej DEPC a zohreje sa na 70 °C počas 10 minút, a potom sa chladí počas 1 minúty na ľade. Pridá sa 2,5 μ l 10x reakčného pufru (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 3 μ l 25 mM MgCl₂, 5 μ l 500 μ M zmesi dNTP, a 2,5 μ l 0,1 M DTT. Zmes sa inkubuje pri 42 °C počas 2 minút a potom sa pridá 1 μ l Superscript II reverznej transkriptázy. Reakčná zmes sa inkubuje počas ďalších 30 minút pri 42 °C, 15 minút pri 70 °C a na ľade počas 1 minúty. Pridá sa 1 μ l RNAzy H (2 jednotky) a zmes sa inkubuje pri 55 °C počas 10 minút. cDNA sa prečistí s použitím GlassMax kolón (Sambrook, J., Fritsch, E.F., a Maniatis, T. (1989) (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, druhé vydanie, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY) obsiahnutých v kite. cDNA sa eluuje z kolóny v 50 μ l dH₂O, lyofilizuje sa a resuspenduje sa v 21 μ l dH₂O. Pripojenie koncového úseku cDNA sa vykoná nasledujúcou reakciou: 7,5 μ l dH₂O, 2,5 μ l reakčného pufru (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 1,5 μ l 25 mM MgCl₂, 2,5 μ l 2 mM dCTP a 10 μ l cDNA sa inkubuje pri 94 °C počas 3 minút, potom 1 minútu na ľade. Pridá sa 1 μ l (10 jednotiek) terminálnej deoxynukleotidyltransferázy a zmes sa inkubuje počas 10 minút pri 37 °C. Enzým sa tepelne inaktivuje inkubáciou pri 70 °C počas 10 minút a zmes sa umiestni na ľad. PCR amplifikácia cDNA sa zrealizuje v nasledujúcich krokoch: 5 μ l cDNA s koncovým úsekom sa pridá do reakčnej zmesi, ktorá tiež obsahuje 5 μ l 10x PCR pufru (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 15 mM MgCl₂ a 0,01 % (hmotn./obj.) želatíny), 1 μ l 10 mM zmesi dNTP, 2 μ l (10 pmol) kotviaceho priméru a 35 μ l dH₂O. Táto reakčná zmes sa zohreje na 95 °C počas 1 minúty a potom sa pridá 0,9 μ l (4,5 jednotiek) Amplitaq polymerázy. Vykoná sa 40 reakčných cyklov za nasledujúcich podmienok: 94 °C počas 5 sekúnd, 50 °C počas 20 sekúnd a 72 °C počas 30 sekúnd. 1 μ l tejto reakčnej zmesi sa použije v skupinovej reamplifikácii na zvýšenie hladín špecifických produktov na nasledujúcu izoláciu. Reamplifikácia obsahuje: 1 μ l produktu primárnej amplifikácie, 5 μ l 10x PCR pufru, 1 μ l 10 mM zmesi dNTP, 2 μ l (20 pmol) univerzálneho amplifikačného priméru, 2 μ l (20 pmol) priméru 4a a 38 μ l dH₂O. Reakčná zmes sa zohreje na 95 °C počas 1 minúty a potom sa pridá 0,7 μ l (3,5 jednotiek) Amplitaq polymerázy. Vykoná sa 40 reakčných cyklov za nasledujúcich podmienok: 94 °C počas 5 sekúnd, 50 °C počas 20 sekúnd a 72 °C počas 30 sekúnd. Produkty amplifikácie sa analyzujú pomocou elektroforézy na 0,8 % agarózovom géli. Deteguje sa prevládajúci produkt veľkosti približne 1,2 kB. 2 μ l reakčného produktu sa klonujú do pCRII vektora z TA klonovacieho kitu (Invitrogen) a vykoná sa inkubácia pri 14 °C v priebehu noci. Produkty ligácie sa použijú na transformáciu *E. coli*. Veľkosti inzertov výsledných transformantov sa určia pomocou trávenia plazmidov EcoRI. Klony obsahujúce inzerty približnej veľkosti pôvodného PCR produktu sa sekvencujú s použitím fluorescenčných farbív - terminačných činidiel (Prism, Applied Biosystems) a Applied Biosystems 373 DNA sekvenčného prístroja. Sekvencie RACE produktu vrátane EcoRI miest z TA vektora sú uvedené na obr. 3. Sekvencie amplimérov (univerzálny amplifikačný primér a komplement k 5'RACE priméru 4a) sú podčiarknuté.

Príklad 2: Klonovanie a chromozomálna lokalizácia LLGXL génu

A) Vyšetrovanie cDNA knižnice

Ludská placentárna cDNA knižnica (Oligo dT a náhodne „primed“, katalógové č. 5014b, Lot č. 52033) sa získa od Clontech (Palo Alto, CA). Rádioaktívne značená sonda sa vytvorí excíziou inzertu plazmidu obsahujúceho reakčný produkt 5'RACE PCR opísaný skôr. Sonda sa rádioaktívne značí pomocou techniky náhodnej väzby: DNA fragment (50 - 100 ng) sa inkubuje s 1 μ g náhodných hexamérov (Gibco) pri 95 °C počas 10 minút a potom na ľade počas 1 minúty. Pri laboratórnej teplote sa pridá: 3 μ l 10x Klenow pufru (100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM MgCl₂, 57 mM ditiotritolu; New England Biolabs), 3 μ l 0,5 mM dATP, dGTP, dTTP), 100 μ Ci α -³²PdCTP (3000 Ci/mmol, New England Nuclear) a 1 μ l Klenowho fragmentu DNA polymerázy I (5 jednotiek, Gibco). Reakčná zmes sa inkubuje počas 2 - 3 hodín pri laboratórnej teplote a reakcia sa potom ukončí zvýšením objemu na 100 μ l pomocou TE, pH 8,0 a pridaním EDTA do konečnej koncentrácie 1 mM. Neinkorporované nukleotidy sa odstránia zvýšením reakčného objemu na 100 μ l a spracovaním na G-50 odstredivej kolóne (Boehringer Mannheim). Výsledné sondy majú špecifickú aktivitu vyššiu ako 5 x 10⁸ cpm/ μ g DNA.

Knižnica sa sonduje pomocou bežných techník (Walter, P., Gilmore, R. a Blobel, G. (1984) Cell 38: 5 - 8). Stručne, filtre sa hybridizujú počas 24 hodín pri 65 °C v 4,8x SSPE (20X SSPE = 3,6 M NaCl, 0,2 M NaH₂PO₄, 0,02 M EDTA, pH 7,7), 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 1X Denhartovom roztoku (100X = 2 % Ficoll 400, 2 % polyvinylpyrrolidón, 2 % BSA), 10 % dextránsiranu, 0,1 % SDS, 10 μ g/ml losovej spermatikovej DNA a 1 x 10⁶ cpm/ml rádioaktívne značenej sondy. Filtre sa potom premyjú 3x počas 15 minút pri laboratórnej teplote v 2X SSC (1X SSC = 150 mM NaCl, 15 mM citrát sodný, pH 7,0), 0,1 % dodecylsírane sodnom (SDS) a potom nasledujú tri premytia zakaždým počas 15 minút pri 65 °C v 0,5X SSC, 0,1 % SDS. Fág, ktorý hybridizuje na sondu, sa izoluje a amplifikuje. DNA sa prečistí z amplifikovaného fágu s použitím LambdaSorb činidla (Promega) podľa návodu výrobcu. Inzerty sa excidujú z fágovej DNA trávením EcoRI. Inzerty sa subklonujú do EcoRI miesta plazmidového vektora (Bluescript II SK, Stratagene). Sekvencia otvo-

reného čítacieho rámca v 2,6 kB EcoRI fragmente cDNA sa určí automatizovaným sekvencovaním, ako je opísané skôr. Sekvencia je uvedená na obr. 4. Aminokyselinová sekvencia predpokladaného proteínu kódovaného otvoreným čítacím rámcom je uvedená na obr. 5 a bola určená LLGXL. Predpokladá sa, že prvý metionín je kódovaný páromi nukleotidov 252 - 254. Predpokladaný proteín má dĺžku 500 aminokyselín. Prvých 18 aminokyselín tvorí sekvenciu pre sekrečný signálny peptid (Higgins, D.G. a Sharp, P.M. (1988) Gene 73: 237 - 244). Predpokladá sa, že propeptid má molekulovú hmotnosť 56800 Daltonov. Za predpokladu štiepenia signálneho peptidu v pozícii 18 má nemodifikovaný zrelý proteín molekulovú hmotnosť 54724 Daltonov.

Celková podobnosť medzi týmto proteínom a ďalšími známymi členmi triacylglycerol-lipázovej rodiny je uvedená na obr. 6 a v tabuľke 1. V usporiadaní uvedenom na obr. 6 je LLG polypeptid (SEQ ID NO: 6) kódovaný cDNA (SEQ ID NO: 5) opísanou v príklade 1 a je tu označený ako LLGN. Tento proteín je identický s LLGXL proteínom v amino-terminálnych 345 zvyškoch. 9 jedinečných zvyškov je nasledovaných terminálnym kodónom, za vzniku polypeptidu 39,3 kD a zrelého proteínu 37,3 kD. Sekvencie, ktoré sú spoločné LLGN a LLGXL sú sekvencie nukleovej kyseliny SEQ ID NO: 9 a aminokyselinová sekvencia SEQ ID NO: 10.

Zaujímavé je, že pozícia, v ktorej sa LLGN a LLGXL proteíny líšia, je v regióne, o ktorom je známe zo štruktúry iných lipáz, že je medzi amino- a karboxy-koncovými doménami proteínov. Preto sa zdá, že LLGN proteín obsahuje iba jednu z dvoch domén triacylglycerol-lipáz. Táto sekvencia obsahuje charakteristický „GXSG“ lipázový motív v pozícii 167 - 171, rovnako ako konzerváciu zvyškov katalytickej triády v Ser 169, Asp 193 a His 274. Konzervácia cysteínových zvyškov (pozícia 64, 77, 252, 272, 297, 308, 311, 316, 463 a 483), ktoré sa zúčastňujú disulfidových väzieb v iných lipázach naznačuje, že LLGXL proteín má štrukturálne podobnosti s inými enzýmami. Existuje tu päť predpokladaných miest na N-glykozyláciu: v aminokyselinových pozíciách 80, 136, 393, 469 a 491. Proteínové sekvencie použité na porovnanie sú ľudská lipoproteínová lipáza (LPL; Genbank prírastkové č. M15856, SEQ ID NO: 13), ľudská pečenná lipáza (HL; Genbank prírastkové č. J03540, SEQ ID NO: 14), ľudská pankreatická lipáza (PL; Genbank prírastkové č. M93285, SEQ ID NO: 15), ľudský proteín 1 príbuzný s pankreatickou lipázou (PLRP-1; Genbank prírastkové č. M93283) a ľudský proteín 2 príbuzný s pankreatickou lipázou (PLRP-2; Genbank prírastkové č. M93284).

Tabuľka 1: Podobnosť génov rodiny triacylglycerol-lipáz

	LLGXL	LPL	HL	PL	PLRP-1	PLRP -2
LLGXL	-	42,7	36,5	24,5	22,5	22,6
LPL	42,7	-	40,0	22,8	22,7	20,9
HL	36,5	40,0	-	22,8	24,0	22,0
PL	24,5	22,8	22,8	-	65,2	62,2
PLRP-1	22,5	22,7	24,0	65,2	-	61,7
PLRP -2	22,6	20,9	22,0	62,2	61,7	-

Percentuálna podobnosť sa určí na základe párového priradenia s použitím Clustal algoritmu (Camps, L., Reina, M., Llobera, M., Vilaro, S., a Olivercrona, T., (1990) Am. J. Physiol. 258: C673 - C681) v Megalign programe Lasergene Biocomputing Software Suite (Dnastar).

B) Chromozomálna lokalizácia

DNA z P1 klonu (Sternberg, N., Ruether, J. a De Riel, K. New Biologist 2: 151 - 62, 1990) obsahujúca genómovú LLG DNA sa označí digoxigenínom-UTP pomocou značkovacej translácie. Značená sonda sa zmieša s nastrihanou ľudskou DNA a hybridizuje na PHA stimulované lymfocyty periférnej krvi od mužského darcu v roztoku obsahujúcom 50 % formamid, 10 % dextránsíran a 2X SSC. Špecifické hybridizačné signály sa detegujú pomocou inkubácie hybridizovaných buniek s fluoresceinovanými protilátkami proti digoxigenínu, po ktorom nasleduje kontrastné farbenie DAPI. Tento prvý pokus vedie k špecifickému označeniu chromozómu skupiny E, o ktorom sa predpokladá podľa farbenia DAPI, že ide o chromozóm 18.

Uskutoční sa druhý pokus, v ktorom biotínom značená sonda špecifická pre centroméru chromozómu 18 hybridizuje súčasne s LLG sondou. Tento pokus vedie k špecifickému červenému značeniu centroméry chromozómu 18 a zelenému značeniu dlhého ramienka chromozómu 18. Meranie 11 špecificky značených hybridizovaných chromozómov 18 ukázalo, že LLG má Filter 0,67 (Frankovo meranie 0,38), čo zodpovedá prúžku 18q21. Predpokladá sa, že niekoľko genetických ochorení vrátane intrahepatálnej cholestázy, dystrofie tyčiniek sietnice a familiárnej expanzívnej osteolýzy, obsahuje defekty v tomto chromozomálnom regióne.

Príklad 3: Analýza LLG RNA

A) Expresia LLG RNA v THP-1 bunkách

Analýza mRNA, z ktorej bola odvodená cDNA, bola uskutočnená pomocou Northern analýzy THP-1 RNA. RNA z týchto buniek bola pripravená spôsobom opísaným skôr. mRNA bola prečistená z celkovej RNA s použitím systému poly-dT-magnetických korálikov (Polyattract system, Promega). 3 µg mRNA obsahujúce poly (A) sa podrobia elektroforéze na 1 % agarózovom-formaldehydovom géli. Gél sa premýva počas 30 minút v dH₂O. RNA sa vo vákuu prenesie na nylonové membrány s použitím alkalického prenosového pufru (3M NaCl, 8 mM NaOH, 2 mM sarkozyl). Po prenesení sa škvrny neutralizujú inkubáciou počas 5 minút v 200 mM fosfátovom pufru, pH 6,8. RNA sa naviaže na membrány s použitím prístroja na naviazanie využívajúceho ultrafialové žiarenie (Stratagene).

Sonda sa vyrobí excíziou inzertu plazmidu obsahujúceho reakčný produkt 5'RACE PCR, ako je uvedené. Sonda sa rádioaktívne označí s použitím techniky náhodného značenia, ako je uvedené v príklade 2.

Filtre sa prehybridizujú v QuickHyb roztoku na rýchlu hybridizáciu (Stratagene) počas 30 minút pri 65 °C. Rádioaktívne značená sonda (1-2 x 10⁶ cpm/ml) a sonikovaná lososia spermatická DNA (konečná koncentrácia 100 µg/ml) sa denaturujú zahriatím na 95 °C na 10 minút a rýchlo sa ochladia na ľade pred pridaním k filtru v QuickHyb. Hybridizácia sa uskutoční pri 65 °C počas 3 hodín. Nehybridizovaná sonda sa odstráni premytím filtra dvakrát počas 15 minút v 2X SSC, 0,1 % dodecylsírnanom sodným pri laboratórnej teplote a potom 2 x počas 15 min. v 0,1X SSC, 0,1 % SDS pri 62 °C. Po premytí sa filtre krátko sušia a potom sa exponujú na Kodak XAR-2 filme s intenzifikovaným snímaním pri -80 °C. Výsledky sú uvedené na obr. 7, ktorý ukazuje hlavný typ mRNA s približne 4,5 kB. Minoritné typy s 4,3 kB a 1,6 kB sú tiež prítomné. Očakávaná veľkosť LLGN cDNA je 1,6 kB. LLGXL sekvencia je pravdepodobne kódovaná hlavným detegovaným typom mRNA.

B) Expresia LLG RNA v rôznych ľudských tkanivách

Komerčne pripravený filter obsahujúci 3 µg každej mRNA z ľudských tkanív (srdce, mozog, placenta, pľúca, pečeň, kostrový sval, obličky a pankreas) sa získajú od Clontech (katalógové č. 7760-1). Tento filter sa sonduje a spracuje spôsobom opísaným skôr. Po sondovaní rádioaktívne označeným LLG fragmentom a autorádiografiou sa sonda odstráni premytím v horúcom 0,1X SSC, 0,1 % SDS počas 2 x 15 minút v inkubátore pri 65 °C. Membrány sa potom sondujú 1,4 kB DNA fragmentom kódujúcim ľudskú lipoproteínovú lipázu. Tento fragment sa získa RT-PCR RNA z THP-10 (ošetrených PMA a oxLDL) s použitím 5'LPL a 3'LPL primérov uvedených na obr. 1 a RT-PCR podmienok opísaných skôr. Po autorádiografii sa membrány znovu očistia a sondujú sa znova rádioaktívne označeným fragmentom cDNA ľudského β-aktínu na normalizáciu obsahu RNA. Výsledky týchto analýz sú uvedené na obr. 8. Najvyššie hladiny informácie pre LLG sa detegujú v placentárnej RNA a najnižšie hladiny sa detegujú v RNA z pľúc, pečene a obličiek. V súlade so skôr uvedenými štúdiami (Verhoeven, A.J.M., Jansen, H., (1994) Biochem. Biophys. Acta 1211: 121 - 124) sa informácia pre lipoproteínovú lipázu nachádza v mnohých tkanivách, s najvyššími koncentraciami v srdcových tkanivách a kostrovom svalu. Výsledky tejto analýzy naznačujú, že tkanivová distribúcia expresie LLG je veľmi odlišná od distribúcie LPL. Charakter expresie LLG je tiež odlišný od charakteru expresie tak pečenej lipázy, ako aj pankreatickej lipázy, ako je opísaný v iných štúdiách (Wang, C.-S., a Harstuck, J.A. (1993) Biochem. Biophys. Acta 1166: 1 - 19; Semenkovich, C.F., Chen, S.-W., Wims, M., Luo, C.-C., Li, W.-H., a Chan, L., (1989) J. Lipid. Res. 30: 423 - 431; Adams, M.D., Kerlavage, A.R., Fields, C., a Venter, C. (1993) Nature Genet. 4: 256 - 265).

Na určenie charakteru expresie v ďalších ľudských tkanivách sa iná komerčne dostupná membrána sonduje LLGXL cDNA. Tento „dot blot“ (Human RNA Master Blot, Clontech katalógové č. 7770-1) obsahuje 100 - 500 ng mRNA z 50 rôznych tkanív a je normalizovaný na ekvivalentnú prirodzenú génovú expresiu (Chen, L., a Morin, R. (1971) Biochim. Biophys. Acta 231: 194 - 197). 1,6 kB DraI-SrfI fragment LLGXL cDNA sa značí ³²PdCTP s použitím systému náhodných oligonukleotydov (Prime It II, Stratagene) podľa návodu výrobcu. Po 30 minútach prehybridizácie pri 65 °C sa sonda pridá do QuickHyb hybridizačného roztoku pri 1,3 x 10⁶ cpm/ml. Hybridizácia sa uskutoční pri 65 °C počas 2 hodín. Nehybridizovaná sonda sa odstráni premytím filtrov dvakrát počas 15 minút v 2X SSC, 0,1 % dodecylsírnanom sodným pri laboratórnej teplote a potom dvakrát počas 15 minút v 0,1X SSC, 0,1 % SDS pri 62 °C. Po premytí sa filtre krátko sušia a potom sa exponujú na Kodak XAR-2 filme s intenzifikovaným snímaním pri -80 °C, v rôznom čase. Záznam, ktorý vznikne sa kvalifikuje denzitometriou. Výsledky sú uvedené v tabuľke 2. Relatívne hladiny expresie v tkanivách zistené v Northern analýze viacerých tkanív a „dot blot“ analýze viacerých tkanív sú podobné, s najvyššími hladinami v placente a najnižšími hladinami v pľúcach, pečeni a obličkách. Vo fetálnej pečeni, obličkách a pľúcach je expresia približne rovnaká ako v tkanivách od dospelých jedincov. Hladiny expresie v tkanivách štítnej žľazy boli prekvapivo najvyššie zo všetkých testovaných tkanív, s expresiou 122 % expresie v placentárnom tkanive. Zatiaľ čo sa predpokladala expresia lipázy v placente (Rothwell, J.E., Elphick, M.C. (1982) J. Dev. Physiol. 4: 153 - 159; Verhoeven, A.J.M., Carling, D., a Jansen, H. (1994) J. Lipid Res.

35: 966 - 975; Burton, B.K., Mueller, H.W. (1980) Biochim. Biophys. Acta 618: 449 - 460), nebolo doteraz známe, že by bola v štítnej žľaze exprimovaná akákoľvek lipáza. Tieto výsledky naznačujú, že LLG expresia sa môže zúčastniť funkcie placenty, kde môže LLG slúžiť na uvoľnenie voľných mastných kyselín zo substrátov, ako sú fosfolipidy, ktoré sú potom zdrojom energie. LLG exprimovaný v štítnej žľaze môže vytvárať

5 prekursor na syntézu bioaktívnych molekúl štítnou žľazou.

Tabuľka 2: Expresia LLG mRNA v rôznych ľudských tkanivách

Celý mozog	N.D.	Substantia nigra	N.D.
Amygdala	N.D.	Temporálny lalok	N.D.
Nucleus caudatus	N.D.	Thalamus	N.D.
Cerebellum	4	Subtalamické jadro	N.D.
Mozgová kôra	N.D.	Miecha	N.D.
Frontálny lalok	N.D.	Srdce	N.D.
Hippocampus	N.D.	Aorta	N.D.
Medulla oblongata	N.D.	Kostrový sval	N.D.
Okcipitálny lalok	N.D.	Hrubé črevo	8
Putamen	N.D.	Močový mechúr	N.D.
Maternica	N.D.	Semenníky	9
Prostata	5	Vaječníky	N.D.
Žalúdok	N.D.	Pankreas	N.D.
Hypofýza	N.D.	Kostná dreň	N.D.
Nadobličky	N.D.	Apendix	7
Štítna žľaza	122	Pľúca	29
Slinné žľazy	N.D.	Priedušnica	12
Mliečna žľaza	N.D.	Placenta	100
Obličky	44	Fetálny mozog	5
Pečeň	61	Fetálne srdce	N.D.
Tenké črevo	6	Fetálna oblička	56
Slezina	N.D.	Fetálna pečeň	14
Týmus	N.D.	Fetálna slezina	N.D.
Periférny leukocyt	N.D.	Fetálny týmus	N.D.
Lymfatická uzlina	N.D.	Fetálne pľúca	8

Uvedené hodnoty sú percentá expresie proti expresii v placente, ktorá bola stanovená na 100 %. Hodnoty sú priemery denzitometrických meraní z dvoch autorádiografických meraní.

10 N.D. = nedetegovateľná hladina

C) Expresia LLG RNA v kultivovaných endotelových bunkách

15 Ľudské endotelové bunky pupočníkovej žily (HUVEC) a ľudské endotelové bunky koronárnej artérie (HCAEC) sa získajú od Clonetics. HUVEC sa propagujú v komerčne získanom kultivačnom médiu pre endotelové bunky (EGM, Clonetics) doplnenom 3 mg/ml extraktu z hovädzieho mozgu (Maciag, T., Cerunolo, J., Ilesley, S., Kelley, P.R. a Forand, R., (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5674 - 5678), Clonetics), zatiaľ čo HCAEC sa propagujú v EGM doplnenom 3 mg/ml extraktu z hovädzieho mozgu a 3 % fetálnym hovädzím sérom (5 % konečná koncentrácia). Bunky sa kultivujú do konfluencie a potom sa médium zamení za EGM bez extraktu z hovädzieho mozgu. Kultúry sa stimulujú pridaním 100 ng/ml forbolmyristatu (Sigma).

20 Po 24 hodinovej inkubácii sa RNA extrahuje z buniek s použitím Trizolovej metódy opísanej skôr. 20 µg celkovej RNA sa podrobí elektroforéze a prenesie sa na membrány na analýzu. Membrány sa sondujú LLG a LPL sondami, ako je opísané. Výsledky sú uvedené na obr. 9. Na 20 µg celkovej RNA z THP-1 buniek stimulovaných PMA sa vykoná analýza na škvrne kvôli porovnaniu. RNA hybridizujúca na LLG sondu sa deteguje v nestimulovaných a PMA stimulovaných HUVEC bunkách. Naopak, detegovateľné hladiny LLG mRNA boli v kultúrach HCAEC buniek zistené iba po stimulácii PMA. V súlade s predchádzajúcimi štúdiami nebola v akýchkoľvek RNA endotelových bunkách detegovaná mRNA na lipoproteínovú lipázu (Verhoeven, A.J.M., Jansen, H., (1994) Biochem. Biophys. Acta 1211: 121 - 124).

Príklad 4: Analýza LLG proteínu

30

A) Príprava protilátky

Pripraví sa antisérum k peptidom so sekvenciou zodpovedajúcou regiónu predpokladaného proteínu kódovaného LLG cDNA otvoreným čítacím rámcom. Tento peptid sa vyberie vzhľadom na jeho predpokladaný vysoký index antigenicity (Jameson, B.A., a Wolf, H. (1988) Comput. Applic. In the Biosciences 4: 181 -

- 186). Sekvencia imunizačného peptidu nebola nájdená v žiadnom proteíne alebo translatovanej DNA sekvencii v Genbank databáze. Jeho zodpovedajúca pozícia v LLG proteíne je uvedená na obr. 10. Karboxykoncový cysteín peptidu nezodpovedá zvyšku v domnelom LLG proteíne, ale je vložený na uľahčenie naviazania na proteínový nosič. Peptid sa syntetizuje na Applied Biosystems Model 433A peptidovom syntetizátore. 2 mg peptidu sa naviaže na 2 mg prísavného hemokyanínu aktivovaného meleímimidom podľa postupu opísaného v Imject Activated Immunogen Conjugation Kite (Pierce Chemical). Po odsolení sa jedna polovica konjugátu emulzifikuje s rovnakým objemom Freundovho kompletného adjuvans (Pierce). Táto emulzia sa injekčne podá králikom druhu New Zealand White. Štyri týždne po prvej imunizácii sa podá dosycovacia dávka emulzie vyrobenej rovnakým spôsobom s tou výnimkou, že sa použije Freundovo nekompletné adjuvans (Pierce). Dva týždne po dosycovacej dávke sa odoberie krv a titrami špecifických protilátok sa určí ELISA s použitím imobilizovaného peptidu. Ďalšia dosycovacia dávka sa vykoná 1 mesiac po prvej dosycovacej dávke.

B) Western analýza média z kultúr endotelových buniek

HUVEC a HCAEC bunky sa kultivujú a stimulujú PMA rovnakým spôsobom, ako je opísané v príklade 3C s tou výnimkou, že bunky sa stimulujú PMA počas 48 hodín. Vzorky kondicionovaného média (9 ml) sa inkubujú s 500 μ l 50 % kaše heparín-Sepharosa CL- B v salinickom roztoku pufrovanom fosfátom (PBS, 150 mM chlorid sodný, 100 mM fosforečnan sodný, pH 7,2). Heparín-Sepharosa sa vyberie na čiastočné prečistenie a koncentrovanie LLG proteínov vzhľadom na konzerváciu zvyškov v LLGXL sekvencii, ktoré boli identifikované ako zásadné pre väzbovú aktivitu LPL pre heparín (Ma, Y., Henderson, H.E., Liu, M.S., Zhyng, H., Forsyte, I.J., Clarke-Lewis, I., Hayden, M.R., a Brunzell, J.D., J. Lipid Res., 35: 2049 - 2059; a obr. 6). Po rotácii pri 4 °C počas 1 hodiny sa vzorky centrifugujú počas 5 minút pri 150 x g. Médium sa aspiruje a Sepharosa sa premyje 14 ml PBS. Po centrifugácii a aspirácii sa peleta Heparín-Sepharosy suspenduje v 200 μ l 2x SDS zavádzacieho pufru (4 % SDS, 20 % glycerol, 2 % β -merkaptoetanol, 0,002 % brómfenolová modrá a 120 mM Tris, pH 6,8). Vzorky sa zahrievajú pri 95 °C počas 5 minút a 40 μ l sa zavedie do 10 % Tris-Glycín SDS gélu. Po elektroforéze pri 140 V za približne 90 minút sa proteíny prenesú na nitrocelulózoové membrány s použitím Novex elektroblotovacieho prístroja (210 V, 1 hodina). Membrány sa blokujú počas 30 minút v blokovacom pufri (5 % odtučnené sušené mlieko, 0,1 % Tween 20, 150 mM chlorid sodný, 25 mM Tris pH 7,2). Antisérum proti peptidu a normálne králičie sérum sa riedia 1 : 5 000 v blokovacom pufri a inkubujú sa s membránami za jemného miešania počas noci pri 4 °C. Membrány sa potom premyjú 4 x 15 minút TBTS (0,1 % Tween 20, 150 mM chlorid sodný, 25 mM Tris pH 7,2). Kozie antisérum proti králičím protilátkam konjugované s peroxidázou (Boehringer Mannheim) sa riedi 1 : 5 000 v blokovacom pufri a inkubuje sa s membránami jemným trepaním počas 1 hodiny. Membrány sa premyjú spôsobom uvedeným skôr, reagujú s Renaissance chemiluminiscenčným činidlom (DuPont NEN) a exponujú sa na Kodak XAR-2 filme. Výsledky sú uvedené na obr. 11. Vo vzorkách z nestimulovaných HUVEC a HCAEC buniek sú prítomné dva druhy imunoreaktívnych proteínov. Koncentrácie imunoreaktívnych proteínov v nestimulovaných HCAEC vzorkách sú oveľa nižšie, ako koncentrácie v zodpovedajúcich HUVEC vzorkách. Pri stimulácii PMA sú kultúrami endotelových buniek secerňované tri imunoreaktívne proteíny. Expozícia PMA značne zvyšuje hladiny LLG proteínov produkovaných HCAEC kultúrami. Indukcia LLG proteínov PMA v HUVEC kultúrach nie je taká výrazná.

Príklad 5: Rekombinantná produkcia LLG proteínov

A) LLG expresné konštrukty

cDNA kódujúce LLGN a LLGXL proteíny sa klonujú do cicavčieho expresného vektora pCDNA3 (Invitrogen). Tento vektor umožňuje expresiu cudzorodých génov v mnohých cicavčích bunkách s použitím cytomegalovírusového hlavného neskorého promotora. LLGN 5'RACE produkt sa klonuje do EcoRI miesta pCDNA3. LLGXL cDNA sa trávi DraI a SrfI za získania 1,55 kB cDNA (pozri obr. 4). Vektor sa trávi reštrikčným enzýmom EcoRV a vektor a inzert sa ligujú s použitím T4 DNA ligázy a činidiel z Rapid Ligation Kitu (Boehringer Mannheim) podľa návodu výrobcu. Produkty ligácie sa použijú na transformáciu kompetentných *E. coli*. Výsledné kolónie sa vyšetrujú reštrikčnou analýzou a sekvencovaním na prítomnosť a orientáciu inzertu v expresnom vektore.

B) Prechodná transfekcia LLG v COS-7 bunkách

LLG expresné vektory sa vložia do COS-7 buniek s použitím Lipofectamínového kationového lipidového činidla (GIBCO). 24 hodín pred transfekciou sa COS-7 bunky umiestnia na 60 mm tkanivové kultivačné disky s hustotou 2 x 10⁵ buniek/disk. Bunky sa propagujú v Dulbeccovom modifikovanom Eaglovom médiu (DMEM, GIBCO) doplnenom 10 % fetálnym teľacím sérom, 100 U/ml penicilínu, 100 μ g/ml streptomycínu. 1 μ g plazmidovej DNA sa pridá do 300 μ l Optimem I bezsérového média (GIBCO). 10 μ l Lipofectamínového činidla sa riedi 300 μ l Optimem I média, táto zmes sa pridá k roztoku DNA a uskutoční sa reakcia pri la-

- boratórnej teplote počas 30 minút. Médium sa odstráni z platní a bunky sa prepláchnu 2 ml Optimem média. Roztok DNA-Lipofectamín sa pridá k platniám spolu s 2,7 ml Optimem média a platne sa inkubujú počas 5 hodín pri 37 °C. Po inkubácii sa bezsérové médium odstráni a nahradí sa DMEM doplneným 2 % FBS a antibiotikami. 12 hodín po transfekcii sa niektoré kultúry ošetrí buď 0,25 mM Pefabloc SC (Boehringer Mannheim), inhibítorom proteáz, alebo 10 U/ml heparínu. 30 minút pred odberom sa vzorky ošetrované heparínom ošetrí ďalšími 40 U/ml heparínu. Médium sa odstráni z buniek 60 hodín po transfekcii. Heparín-Sepharosa CL-4B (200 µl 50 % kaša v PBS, pH 7,2) sa pridá k 1 ml média a mieša sa pri 4 °C počas 1 hodiny. Sepharosa sa peletuje centrifugáciou pri nízkej rýchlosti a premyje sa trikrát 1 ml studeného PBS. Sepharosa sa peletuje a suspenduje v 100 µl 2x zavádzacieho pufru. Vzorky sa zahrejú na 95 °C na 5 minút. 40 µl každej vzorky sa zavedie na 10 % SDS-PAGE gél. Elektroforéza a Western analýza sa uskutočnia s použitím anti-LLG antiséra spôsobom opísaným skôr. Výsledky sú uvedené na obr. 12. Proteíny z HCAEC kondicionovaného média boli použité na kontrolu veľkosti. LLGN migruje pri približne 40 kD, čo zodpovedá najmenšiemu prúžku v HCAEC. Médium z COS-7 buniek transfektovaných LLGXL cDNA obsahuje prúžky tak 68 kD, ako aj 40 kD. Keď boli tieto bunky ošetrované heparínom, tak sa výrazne zvýšilo množstvo tak 68 kD, ako aj 40 kD proteínov získaných z média, čo ukazuje na uvoľnenie proteínu naviazaného na proteoglykány z povrchu buniek, alebo na stabilizáciu proteínov heparínom. Keď boli bunky ošetrované inhibítorom proteáz Pefabloc, tak sa množstvo 68 kD proteínu zvýšilo oproti 40 kD proteínu. To naznačuje, že proteín s nižšou molekulovou hmotnosťou produkovaný týmito bunkami je produkt proteolýzy väčšej 68 kD formy. Úloha mRNA identifikovanej v diferenciálnom zobrazení, ktorá kóduje kratší 40 kD proteín, nie je známa. Existujú však práce, opisujúce alternatívne zostrihnutú formu pečenej lipázy, ktorá je exprimovaná špecifickým spôsobom a môže tvoriť skrátený proteín.

Príklad 6: LLG v zvieracích druhoch

25 A) Klonovanie králičieho homológu LLG

- Komerčne dostupná lambda cDNA knižnica odvodená z králičieho pľúcneho tkaniva (Clontech, katalógové č. TL1010b) sa použije na izoláciu fragmentu králičieho homológu LLG génu. 5 µl zásobného roztoku knižnice sa pridá k 45 µl vody a zmes sa zahreje na 95 °C na 10 minút. Potom sa pridá v konečnom objeme 100 µl: 200 µM dNTP, 20 mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 100 µM každého priméru DLIP774 a LLGgen2a a 2,5 U Taq polymerázy (GIBCO). Vykoná sa 35 teplotných cyklov s parametrami: 15 sekúnd pri 94 °C, 20 sekúnd pri 50 °C a 30 sekúnd pri 72 °C. 10 µl reakčnej zmesi sa analyzuje s použitím elektroforézy na agarózovom géli. Deteguje sa produkt s približne 300 párami báz. Časť (4 µl) reakčnej zmesi sa použije na klonovanie produktu s použitím TA klonovacieho systému. Inzert výsledného klonu sa sekvenkuje (SEQ ID NO: 11). Zoradenie odvodenej králičej aminokyselinovej sekvencie (SEQ ID NO: 12) a zodpovedajúca sekvencia ľudskej cDNA je tiež uvedené na obr. 14. V nukleotidoch, ktoré nepatria do amplifikačných priemerov, je 85,8 % identita medzi sekvenciou králičieho a ľudského LLG. Predpokladaný proteín kódovaný touto králičou cDNA má 94,6 % identitu s ľudským proteínom s tým, že väčšina nukleotidových substitúcií je v tretej alebo „vratkej“ pozícii kodónov. Významné je, že tento región zahrnuje „viečkovou“ sekvenciu predpokladaných LLG proteínov a je variabilnou doménou v rodine lipázového génu. Toto je dôkaz vysokého stupňa konzervácie tohto génu medzi druhmi.

B) LLG v iných druhoch

- Na dôkaz prítomnosti LLG génu v iných druhoch je genómová DNA z rôznych druhov reštrikčne trávená EcoRI, separovaná elektroforézou na agarózových géloch a blotovaná na nitrocelulóзовé membrány. Membrány sa hybridizujú počas noci pri 65 °C s 2,5 x 10⁶ cpm/ml náhodných ³²P-LLG alebo ³²P-LPL (lipoproteínová lipáza) sond v hybridizačnom roztoku obsahujúcom 6X SSC, 10 % dextránsíran, 5X Denhartov roztok, 1 % SDS a 5 µg/ml lososej spermatickej DNA. Membrány sa premyjú 0,1X SSC, 0,5 % SDS počas 10 minút pri laboratórnej teplote a potom postupne počas 10 minút pri 40 °C, 50 °C a 55 °C. Autorádiogramy blotov sú uvedené na obr. 16. Obr. 16 ukazuje prítomnosť LLG a LPL génov u všetkých vyšetrovaných druhov s tou výnimkou, že žiadna hybridizácia nebola pozorovaná pre LLG sondu proti krysej DNA. Dáta pre krysiu DNA môžu byť artefaktom spôsobeným tvorbou abnormálne veľkých reštrikčných fragmentov obsahujúcich LLG sekvencie. Také fragmenty môžu byť mimo frakčionačného rozsahu agarózového gélu alebo môžu byť neúčinne blotované. Rôzne prúžky detegované dvoma sondami naznačujú, že LPL a LLG sú separované, evolučne konzervované gény.

Príklad 7: Enzymatická aktivita LLGXL

A) Fosfolipázová aktivita

- Kondicionované médiá z COS-7 buniek prechodne exprimujúcich ľudskú lipoproteínovú lipázu (LPL),

LLGN alebo LLGXL sa testujú na fosfolipázovú aktivitu. MEM obsahujúci 10 % FBS (MEM) sa použije ako prázdna vzorka a kondicionované médium z COS-7 buniek transfektovaných protizmyslovým LLGXL plazmidom (AS) sa použije ako negatívna kontrola.

Fosfatidylcholinová (PC) emulzia sa vyrobí s použitím 10 μ l fosfatidylcholínu (10 mM), 40 μ l 14 C-fosfatidylcholínu, dipalmitoylu (2 μ Ci), značeného v sn 1 a sn 2 pozícii a 100 μ l Tris-TCNB (100 mM Tris, 1 % Triton, 5 mM CaCl_2 , 200 mM NaCl, 0,1 % BSA). Emulzia sa odparí za 10 minút, potom sa upraví na konečný objem 1 ml pridaním Tris-TCNB.

Reakcia sa vykoná dvojmo a obsahuje 20 μ l PC emulzie a 950 μ l média. Vzorky sa inkubujú v trepacom vodnom kúpeli počas 2 - 4 hodín pri 37 °C. Reakcia sa ukončí pridaním 1 ml 1N HCl, potom sa urobí extrakcia 4 ml 2-propanol : hexánu (1 : 1). Horná 1,8 ml hexánová vrstva sa zavedie do silikagélovej kolóny a uvoľnený 14 C - bez mastných kyselín obsiahnutý v pretekajúcej frakcii sa kvantifikuje v scintilačnom prístroji. Výsledky testu sú uvedené na obr. 14.

B) Triacylglycerol-lipázová aktivita

Kondicionované média z COS-7 buniek prechodne exprimujúcich ľudskú lipoproteínovú lipázu (LPL), LLGN, alebo LLGXL sa testujú na triacylglycerol-lipázovú aktivitu. MEM obsahujúci 10 % FBS (MEM) sa použije ako prázdna vzorka a kondicionované médium z COS-7 buniek transfektovaných protizmyslovým LLGXL plazmidom (AS) sa použije ako negatívna kontrola.

Koncentrovaný substrát sa pripraví ako bezvodá emulzia značeného trioleínu (9,10- $^3\text{H}(\text{N})$) a neznačeného trioleínu (konečné množstvo celkového trioleínu = 150 mg s $6,25 \times 10^8$ cpm), ktorá sa stabilizuje pridaním 9 mg lecitínu v 100 % glycerole. 0,56 ^3H -trioleínu (0,28 mCi) sa zmieša s 0,17 ml neznačeného trioleínu a 90 μ l lecitínu (9 mg). Zmes sa odparí prúdom dusíka. Sušená lipidová zmes sa emulzifikuje v 2,5 ml 100 % glycerolu sonikáciou (30 sekundové pulzy, intenzita 2, 2 sekundové cykly, 5 minút).

Substrát na test sa pripraví riedením 1 objemu koncentrovaného substrátu 4 objemami 0,2 M Tris-HCl pufra (pH 8,0) obsahujúcimi 3 % hmot./obj. hovädzieho sérového albumínu bez mastných kyselín. Riedený substrát sa dôkladne mieša počas 5 sekúnd.

Reakcie sa vykonajú dvojmo v celkovom objeme 0,2 ml obsahujúcom 0,1 substrátu na test a 0,1 ml uvedeného kondicionovaného média. Reakčné zmesi sa inkubujú počas 90 minút pri 37 °C. Reakcia sa ukončí pridaním 3,25 ml metanol-chloroform-heptánu 1,41 : 1,25 : 1 (obj./obj./obj.) a potom 1,05 ml 0,1 M uhličitán vápenatý-boritanového pufra (pH 10,5). Po dôkladnom miešaní počas 15 sekúnd sa vzorky centrifugujú počas 5 minút pri 1000 rpm. 1,0 ml alikvótnej vrchnej vodnej fázy sa odčíta v scintilačnom prístroji. Výsledky testu sú uvedené na obr. 15.

Príklad 8: Použitie LLG polypeptidu na vyšetrovanie agonistov a antagonistov

Rekombinantná LLG sa produkuje v hmyzích bunkách infikovaných bakulovírusom. Rekombinantná LLG sa prečistí z kondicionovaného média obsahujúceho alebo neobsahujúceho sérum chromatografiou na heparín-Sepharose a potom chromatografiou na kationovej iónomeničovej živici. Ak je to nutné, použije sa na prečistenie LLG tretí chromatografický krok, ako je spracovanie na molekulovom site. Počas prečistenia sa protilátky proti peptidu použijú na monitorovanie LLG proteínu a fosfolipázový test sa použije na určenie aktivity LLG.

Vo fluorescenčnom teste sú konečné podmienky približne 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 100 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 5 μ M $\text{C}_6\text{NBD-PC}\{1\text{-acyl-2-[6-(nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]kaproylfosfatidylcholin}$ a LLG proteín (približne 1 - 100 ng). Reakčná zmes sa podrobí fluorescenčnej excitácii pri 470 nm a priebežne sa sleduje aktivita enzýmu, ako je meraná emisíou fluorescencie pri 540 nm. Zlúčeniny a/alebo substancie, ktoré sú testované na stimulačnú a/alebo inhibičnú aktivitu pre LLG, sa pridávajú ako 10 - 200 mM roztoky v dimetylsulfoxide. Zlúčeniny, ktoré stimulujú alebo inhibujú aktivitu LLG sa identifikujú podľa toho, či spôsobujú zvýšenie alebo zníženie emisie fluorescencie pri 540 nm.

V tio-teste sú konečné podmienky približne 25 mM Tris-HCl (pH 8,5), 100 mM KCl, 10 mM CaCl_2 , 4,24 mM Triton X-100, 0,5 mM 1,2-bis(hexanoyltio)-1,2-dideoxy-sn-glycero-3-fosforylcholínu, 5 mM 4,4'-ditioispyridínu (z 50 mM zásobného roztoku v etanole) a 1 - 100 ng rekombinantného LLG. Fosfolipázová aktivita sa meria zvýšením absorpcie pri 342 nm. Zlúčeniny a/alebo substancie, ktoré sú testované na stimulačnú a/alebo inhibičnú aktivitu pre LLG, sa pridávajú ako 10 - 200 mM roztoky v dimetylsulfoxide. Zlúčeniny, ktoré stimulujú alebo inhibujú aktivitu LLG sa identifikujú podľa toho, či spôsobujú zvýšenie alebo zníženie absorpcie pri 342 nm.

Príklad 9: Transgénne myši exprimujúce ľudský LLG

Na ďalší výskum fyziologickej úlohy LLG boli vytvorené transgénne myši exprimujúce ľudský LLG.

1,53 kbp DraI/SrfI reštrikčný fragment kódujúci LLGXL (pozri obr. 4) sa klonuje do plazmidového vektora (pHMG) „downstream“ od promotora pre ubikvitne exprimovaný gén pre 3-hydroxy-3-metylglutaryl koenzým A (HMG CoA) reduktázu. Transgénne myši exprimujúce rôzne hladiny ľudského LLGXL sa generujú

s použitím bežných techník (pozri napríklad G.L. Tromp et al., Gene 1565: 199 - 205, 1995). Transgénne myši sa používajú na určenie vplyvu nadmernej expresie LLGXL na lipidový profil, vaskulárne patologické stavy, rýchlosť vývoja a závažnosť aterosklerózy a iné fyziologické parametre.

5 Príklad 10: Expresia LLG v aterosklerotickom tkanive

Expresia LLGXL v aterosklerotickom tkanive sa vyšetruje pomocou reverznej transkriptázovej - polymérazovej reťazovej reakcie (RT-PCR) s použitím mRNA izolovanej z vaskulárnych biopsií od štyroch pacientov s aterosklerózou. Vzorky tkaniva sú zo steny aorty (jedna vzorka), arteria iliaca (dve vzorky) a karotídy (jedna vzorka).

- 10 Biopsie z aterosklerotického tkaniva sa získajú od Gloucestershire Royal Hospital, England, a polyA+ mRNA sa pripraví a resuspenduje sa vo vode spracovanej dietylpyprouhličitanom (DEPC) v koncentrácii 0,5 µg/µl mRNA. Reakcia s reverznou transkriptázou sa vykoná podľa GibcoBRL protokolu pre Superscript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis. Stručne, cDNA sa syntetizuje nasledujúcim spôsobom: 2 µl každej mRNA sa pridajú k 1 µl oligo (dT)₁₂₋₁₈ priméru a 9 µl DEC vody. Skúmavky sa inkubujú pri 70 °C počas 10 minút a potom sa umiestnia na ľad na 1 minútu. Do každej skúmavky sa pridajú nasledujúce zložky: 2 µl 10X PCR pufru, 2 µl 25 mM MgCl₂, 1 µl 10 mM zmesi dNTP a 2 µl 0,1 M DTT. Po 5 minútach pri 42 °C sa pridá 1 µl (200 jednotiek) SuperScript II reverznej transkriptázy. Reakčná zmes sa jemne mieša a potom sa inkubuje pri 42 °C počas 50 minút. Reakcia sa ukončí inkubáciou pri 70 °C počas 15 minút a potom umiestnením na ľad. Zvyšná mRNA sa zničí pridaním 1 µl RNasy H do každej skúmavky a inkubáciou počas 20 minút pri 37 °C.

- 20 PCR amplifikácie sa uskutočnia s použitím 2 µl cDNA reakčných zmesí. Do každej skúmavky sa pridá: 5 µl 10X PCR pufru, 5 µl 2 mM dNTP, 1 µl hllg-gsp1 priméru (20 pmol/ml, pozri obr. 1), 1 µl hllg-gsp2a priméru (20 pmol/ml, pozri obr. 1), 1,5 µl 50 mM MgCl₂, 0,5 µl Taq polymerázy (5 U/ml) a 34 µl vody. Po 2 hodinách pri 95 °C sa urobí nasledujúcich 30 cyklov PCR reakcie: 15 sekúnd pri 94 °C, 20 sekúnd pri 52 °C a 30 sekúnd pri 72 °C. Výsledná reakčná zmes sa nechá pred elektroforetickou analýzou počas 10 minút pri 72 °C na agarózovom géli. hllg-gsp priméry sú špecifické pre LLG a vedú k získaniu očakávaného produktu s 300 bp. V paralelnej PCR na dôkaz toho, že reakcie syntézy boli úspešné, sa používajú priméry špecifické pre prevádzkový gén, G3PDH (ľudská glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza) (1 µl v koncentrácii 20 pmol/ml).

- 30 G3PDH priméry (pozri obr. 1) vedú k získaniu očakávaného produktu s 983 bp vo všetkých biotických vzorkách z ciev. LLG sa deteguje v troch zo štyroch vzoriek, keď žiadna expresia nie je detegovaná vo vzorke z arteria carotis.

Všetky uvedené citácie sú tu obsiahnuté ako odkaz.

- 35 Odborníkom v odbore bude jasné, že predkladaný vynález je vhodný na uskutočňovanie predmetov vynálezu a získanie uvedených výsledkov a výhod, rovnako ako tých, ktoré sú od nich odvodené. Peptidy, polynukleotidy, spôsoby, postupy a techniky, ktoré sú tu uvedené, sú príklady výhodných uskutočnení a neobmedzujú rozsah predkladaného vynálezu. Do rozsahu predkladaného vynálezu a pripojených patentových nárokov patria aj ich varianty a iné použitia, ktoré budú odborníkom v odbore jasné.

40 Zoznam sekvencií

(1) Všeobecné informácie

(i) Prihlasovateľ: Jaye, Michael C.

Doan, Kim-Anh T.

- 45 Krawiec, John A.

Lynch, Kevin J.

Amin, Dilip V.

South, Victoria J.

- 50 (ii) Názov vynálezu: LLG polypeptidy triacylglycerol-lipázovej rodiny a prostriedky a spôsoby na ich použitie v enzymatickej hydrolýze a proteínovej a génovej terapii

(iii) Počet sekvencií: 31

- 55 (iv) Adresa na korešpondenciu:

(A) Adresa: Rhone-Poulenc Rorer Inc.

(B) Ulica: 500 Arcola Rd. 3C43

(C) Mesto: Collegeville

(D) Krajina: PA

- 60 (E) Štát: USA

(F) ZIP: 19426

(v) Počítačová čítacia forma:

(A) Médium: Floppy disk

5 (B) Počítač: IBM PC kompatibilný

(C) Operačný systém: PC-DOS/MS-DOS

(D) Softvér: PatentIn Release # 1.0, verzia # 1.30

(vi) Dáta súčasnej prihlášky:

10 (A) Číslo prihlášky: US

(B) Dátum podania:

(C) Klasifikácia:

(viii) Zástupca/agent - informácia:

15 (A) Meno: Fehlner Ph.D., Paul F.

(B) Registračné číslo: 35135

(C) Referencie/číslo registra: A2582-WO

(ix) Telekomunikačné informácie:

20 (A) Telefón: (610)454-3839

(B) Telefax: (610)454-3808

(2) Informácia pre SEQ ID NO: 1:

25 (i) Charakteristiky sekvencie:

(A) Dĺžka: 367 párov báz

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Reťazec: dvojitý

(D) Topológia: lineárna

30

(ii) Typ molekuly: cDNA

(ix) Vlastnosti:

(A) Meno/kľúč: CDS

35 (B) Umiestnenie: 22...180

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID NO: 1:

GAATTCGGCT TGATCAATCG C	TTC AAA AAG GGG ATC TGT CTG AGC TGC CGC	51
	Phe Lys Lys Gly Ile Cys Leu Ser Cys Arg	
	1 5 10	
AAG AAC CGT TGT AAT AGC AAT GGC TAC AAT GCC AAG AAA ATG AGG AAC		99
Lys Asn Arg Cys Asn Ser Ile Gly Tyr Asn Ala Lys Lys Met Arg Asn		
	15 20 25	
AAG AGG AAC AGC AAA ATG TAC CTA AAA ACC CGG GCA GGC ATG CCT TTC		147
Lys Arg Asn Ser Lys Met Tyr Leu Lys Thr Arg Ala Gly Met Pro Phe		
	30 35 40	
AGA GGT AAC CTT CAG TCC CTG GAG TGT CCC TGA GGAAGGCCCT TAATACCTCC		200
Arg Gly Asn Leu Gln Ser Leu Glu Cys Pro *		
	45 50	
TTCTTAATAC CATGCTGCAG AGCAGGGCAC ATCCTAGCCC AGGAGAAGTG GCCAGCACAA		260
TCCAATCAAA TCGTTGCAAA TCAGATTACA CTGTGCATGT CCTAGGAAAG GGAATCTTTA		320
CAAAATAAAC AGTGTGGACC CCTCAAAAAA AAAAAAAGC CGAATTC		367

(2) Informácia pre SEQ ID NO: 2:

(i) Charakteristiky sekvencie:

(A) Dĺžka: 53 aminokyselín

5 (B) Typ: aminokyselina

(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: proteín

10 (xi) Opis sekvencie: SEQ ID NO: 2:

```

Phe Lys Lys Gly Ile Cys Leu Ser Cys Arg Lys Asn Arg Cys Asn Ser
 1           5           10           15

Ile Gly Tyr Asn Ala Lys Lys Met Arg Asn Lys Arg Asn Ser Lys Met
          20           25           30

Tyr Leu Lys Thr Arg Ala Gly Met Pro Phe Arg Gly Asn Leu Gln Ser
      35           40           45

Leu Glu Cys Pro *
      50

```

(2) Informácia pre SEQ ID NO: 3:

15

(i) Charakteristiky sekvencie:

(A) Dĺžka: 1328 párov báz

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Refázec: dvojité

20 (D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: cDNA

(ix) Vlastnosti:

25 (A) Meno/kľúč: CDS

(B) Umiestnenie: 312...1370

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID NO: 3:

```

GAATTCGGCT TCTACTACTA CTAGGCCACG CGTCGCCTAG TACGGGGGGG GGGGGGGGGG      60
TCAGCGAGTC CTTGCCTCCC GCGGGCTCAG GACGAGGGCA GATCTCGTTC TGGGGCAAGC      120
CGTTGACACT CGCTCCCTGC CACCGCCCGG GCTCCGTGCC GCCAAGTTTT CATTTCCAC      180
CTTCTCTGCC TCCAGTCCCC CAGCCCCTGG CCGAGAGAAG GGTCTTACCG GCCGGGATTG      240
CTGGAAACAC CAAGAGGTGG TTTTGTGTTT TTAAAACTTC TGTTCTTGG GAGGGGGTGT      300
GGCGGGGCGAG G ATG AGC AAC TCC GTT CCT CTG CTC TGT TTC TGG AGC CTC      350
              Met Ser Asn Ser Val Pro Leu Leu Cys Phe Trp Ser Leu
              55           60           65

TGC TAT TGC TTT GCT GCG GGG AGC CCC GTA CCT TTT GGT CCA GAG GGA      398
Cys Tyr Cys Phe Ala Ala Gly Ser Pro Val Pro Phe Gly Pro Glu Gly
              70           75           80

CGG CTG GAA GAT AAG CTC CAC AAA CCC AAA GCT ACA CAG ACT GAG GTC      446
Arg Leu Glu Asp Lys Leu His Lys Pro Lys Ala Thr Gln Thr Glu Val
              85           90           95

AAA CCA TCT GTG AGG TTT AAC CTC CGC ACC TCC AAG GAC CCA GAG CAT      494
Lys Pro Ser Val Arg Phe Asn Leu Arg Thr Ser Lys Asp Pro Glu His
              100          105          110

GAA GGA TGC TAC CTC TCC GTC GGC CAC AGC CAG CCC TTA GAA GAC TGC      542

```

30

SK 287687 B6

Glu 115	Gly	Cys	Tyr	Leu	Ser 120	Val	Gly	His	Ser	Gln 125	Pro	Leu	Glu	Asp	Cys 130	
AGT	TTC	AAC	ATG	ACA	GCT	AAA	ACC	TTT	TTC	ATC	ATT	CAC	GGA	TGG	ACG	590
Ser	Phe	Asn	Met	Thr	Ala	Lys	Thr	Phe	Phe	Ile	Ile	His	Gly	Trp	Thr	
				135				140						145		
ATG	AGC	GGT	ATC	TTT	GAA	AAC	TGG	CTG	CAC	AAA	CTC	GTG	TCA	GCC	CTG	638
Met	Ser	Gly	Ile	Phe	Glu	Asn	Trp	Leu	His	Lys	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	
			150					155					160			
CAC	ACA	AGA	GAG	AAA	GAC	GCC	AAT	GTA	GTT	GTG	GTT	GAC	TGG	CTC	CCC	686
His	Thr	Arg	Glu	Lys	Asp	Ala	Asn	Val	Val	Val	Val	Asp	Trp	Leu	Pro	
		165					170					175				
CTG	GCC	CAC	CAG	CTT	TAC	ACG	GAT	GCG	GTC	AAT	AAT	ACC	AGG	GTG	GTG	734
Leu	Ala	His	Gln	Leu	Tyr	Thr	Asp	Ala	Val	Asn	Asn	Thr	Arg	Val	Val	
	180					185				190						
GGA	CAC	AGC	ATT	GCC	AGG	ATG	CTC	GAC	TGG	CTG	CAG	GAG	AAG	GAC	GAT	782
Gly	His	Ser	Ile	Ala	Arg	Met	Leu	Asp	Trp	Leu	Gln	Glu	Lys	Asp	Asp	
195				200				205						210		
TTT	TCT	CTC	GGG	AAT	GTC	CAC	TTG	ATC	GGC	TAC	AGC	CTC	GGA	GCG	CAC	830
Phe	Ser	Leu	Gly	Asn	Val	His	Leu	Ile	Gly	Tyr	Ser	Leu	Gly	Ala	His	
			215					220					225			
GTG	GCC	GGG	TAT	GCA	GGC	AAC	TTC	GTG	AAA	GGA	ACG	GTG	GGC	CGA	ATC	878
Val	Ala	Gly	Tyr	Ala	Gly	Asn	Phe	Val	Lys	Gly	Thr	Val	Gly	Arg	Ile	
			230				235					240				
ACA	GGT	TTG	GAT	CCT	GCC	GGG	CCC	ATG	TTT	GAA	GGG	GCC	GAC	ATC	CAC	926
Thr	Gly	Leu	Asp	Pro	Ala	Gly	Pro	Met	Phe	Glu	Gly	Ala	Asp	Ile	His	
		245					250					255				
AAG	AGG	CTC	TCT	CCG	GAC	GAT	GCA	GAT	TTT	GTG	GAT	GTC	CTC	CAC	ACC	974
Lys	Arg	Leu	Ser	Pro	Asp	Asp	Ala	Asp	Phe	Val	Asp	Val	Leu	His	Thr	
	260					265				270						
TAC	ACG	CGT	TCC	TTC	GGC	TTG	AGC	ATT	GGT	ATT	CAG	ATG	CCT	GTG	GGC	1022
Tyr	Thr	Arg	Ser	Phe	Gly	Leu	Ser	Ile	Gly	Ile	Gln	Met	Pro	Val	Gly	
275				280				285						290		
CAC	ATT	GAC	ATC	TAC	CCC	AAT	GGG	GGT	GAC	TTC	CAG	CCA	GGC	TGT	GGA	1070
His	Ile	Asp	Ile	Tyr	Pro	Asn	Gly	Gly	Asp	Phe	Gln	Pro	Gly	Cys	Gly	
			295					300					305			
CTC	AAC	GAT	GTC	TTG	GGA	TCA	ATT	GCA	TAT	GGA	ACA	ATC	ACA	GAG	GTG	1118
Leu	Asn	Asp	Val	Leu	Gly	Ser	Ile	Ala	Tyr	Gly	Thr	Ile	Thr	Glu	Val	
			310					315				320				
GTA	AAA	TGT	GAG	CAT	GAG	CGA	GCC	GTC	CAC	CTC	TTT	GTT	GAC	TCT	CTG	1166

```

Val Lys Cys Glu His Glu Arg Ala Val His Leu Phe Val Asp Ser Leu
    325                      330                      335

GTG AAT CAG GAC AAG CCG AGT TTT GCC TTC CAG TGC ACT GAC TCC AAT      1214
Val Asn Gln Asp Lys Pro Ser Phe Ala Phe Gln Cys Thr Asp Ser Asn
    340                      345                      350

CGC TTC AAA AAG GGG ATC TGT CTG AGC TGC CGC AAG AAC CGT TGT AAT      1262
Arg Phe Lys Lys Gly Ile Cys Leu Ser Cys Arg Lys Asn Arg Cys Asn
    355                      360                      365                      370

AGC ATT GGC TAC AAT GCC AAG AAA ATG AGG AAC AAG AGG AAC AGC AAA      1310
Ser Ile Gly Tyr Asn Ala Lys Lys Met Arg Asn Lys Arg Asn Ser Lys
    375                      380                      385

ATG TAC CTA AAA ACC CGG GCA GGC ATG CCT TTC AGA GGT AAC CTT CAG      1358
Met Tyr Leu Lys Thr Arg Ala Gly Met Pro Phe Arg Gly Asn Leu Gln
    390                      395                      400

TCC CTG GAG TGT CAAGCCGAAT TC      1382
Ser Leu Glu Cys
    405

```

(2) Informácia pre SEQ ID NO: 4:

(i) Charakteristiky sekvencie:

5 (A) Dĺžka: 353 aminokyselín

(B) Typ: aminokyselina

(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: proteín

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID NO: 4:

10

```

Met Ser Asn Ser Val Pro Leu Leu Cys Phe Trp Ser Leu Cys Tyr Cys
  1                      5                      10                      15

Phe Ala Ala Gly Ser Pro Val Pro Phe Gly Pro Glu Gly Arg Leu Glu
    20                      25                      30

Asp Lys Leu His Lys Pro Lys Ala Thr Gln Thr Glu Val Lys Pro Ser
    35                      40                      45

Val Arg Phe Asn Leu Arg Thr Ser Lys Asp Pro Glu His Glu Gly Cys
    50                      55                      60

Tyr Leu Ser Val Gly His Ser Gln Pro Leu Glu Asp Cys Ser Phe Asn
    65                      70                      75                      80

Met Thr Ala Lys Thr Phe Phe Ile Ile His Gly Trp Thr Met Ser Gly
    85                      90                      95

Ile Phe Glu Asn Trp Leu His Lys Leu Val Ser Ala Leu His Thr Arg
    100                     105                     110

Glu Lys Asp Ala Asn Val Val Val Val Asp Trp Leu Pro Leu Ala His
    115                     120                     125

Gln Leu Tyr Thr Asp Ala Val Asn Asn Thr Arg Val Val Gly His Ser
    130                     135                     140

```

```

Ile Ala Arg Met Leu Asp Trp Leu Gln Glu Lys Asp Asp Phe Ser Leu
145                      150                      155                      160

Gly Asn Val His Leu Ile Gly Tyr Ser Leu Gly Ala His Val Ala Gly
                      165                      170                      175

Tyr Ala Gly Asn Phe Val Lys Gly Thr Val Gly Arg Ile Thr Gly Leu
                      180                      185                      190

Asp Pro Ala Gly Pro Met Phe Glu Gly Ala Asp Ile His Lys Arg Leu
                      195                      200                      205

Ser Pro Asp Asp Ala Asp Phe Val Asp Val Leu His Thr Tyr Thr Arg
                      210                      215                      220

Ser Phe Gly Leu Ser Ile Gly Ile Gln Met Pro Val Gly His Ile Asp
225                      230                      235                      240

Ile Tyr Pro Asn Gly Gly Asp Phe Gln Pro Gly Cys Gly Leu Asn Asp
                      245                      250                      255

Val Leu Gly Ser Ile Ala Tyr Gly Thr Ile Thr Glu Val Val Lys Cys
                      260                      265                      270

Glu His Glu Arg Ala Val His Leu Phe Val Asp Ser Leu Val Asn Gln
                      275                      280                      285

Asp Lys Pro Ser Phe Ala Phe Gln Cys Thr Asp Ser Asn Arg Phe Lys
                      290                      295                      300

Lys Gly Ile Cys Leu Ser Cys Arg Lys Asn Arg Cys Asn Ser Ile Gly
305                      310                      315                      320

Tyr Asn Ala Lys Lys Met Arg Asn Lys Arg Asn Ser Lys Met Tyr Leu
                      325                      330                      335

Lys Thr Arg Ala Gly Met Pro Phe Arg Gly Asn Leu Gln Ser Leu Glu
                      340                      345                      350

```

Cys

(2) Informácia pre SEQ ID NO: 5:

5

(i) Charakteristiky sekvencie:

(A) Dĺžka: 1065 párov báz

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Reťazec: dvojité

10

(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: cDNA

(ix) Vlastnosti:

15

(A) Meno/kľúč: CDS

(B) Umiestnenie: 1...1065

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID NO: 5:

SK 287687 B6

ATG AGC AAC TCC GTT CCT CTG CTC TGT TTC TGG AGC CTC TGC TAT TGC Met Ser Asn Ser Val Pro Leu Leu Cys Phe Trp Ser Leu Cys Tyr Cys 355 360 365	48
TTT GCT GCG GGG AGC CCC GTA CCT TTT GGT CCA GAG GGA CGG CTG GAA Phe Ala Ala Gly Ser Pro Val Pro Phe Gly Pro Glu Gly Arg Leu Glu 370 375 380 385	96
GAT AAG CTC CAC AAA CCC AAA GCT ACA CAG ACT GAG GTC AAA CCA TCT Asp Lys Leu His Lys Pro Lys Ala Thr Gln Thr Glu Val Lys Pro Ser 390 395 400	144
GTG AGG TTT AAC CTC CGC ACC TCC AAG GAC CCA GAG CAT GAA GGA TGC Val Arg Phe Asn Leu Arg Thr Ser Lys Asp Pro Glu His Glu Gly Cys 405 410 415	192
TAC CTC TCC GTC GGC CAC AGC CAG CCC TTA GAA GAC TGC AGT TTC AAC Tyr Leu Ser Val Gly His Ser Gln Pro Leu Glu Asp Cys Ser Phe Asn 420 425 430	240
ATG ACA GCT AAA ACC TTT TTC ATC ATT CAC GGA TGG ACG ATG AGC GGT Met Thr Ala Lys Thr Phe Phe Ile Ile His Gly Trp Thr Met Ser Gly 435 440 445	288
ATC TTT GAA AAC TGG CTG CAC AAA CTC GTG TCA GCC CTG CAC ACA AGA Ile Phe Glu Asn Trp Leu His Lys Leu Val Ser Ala Leu His Thr Arg 450 455 460 465	336
GAG AAA GAC GCC AAT GTA GTT GTG GTT GAC TGG CTC CCC CTG GCC CAC Glu Lys Asp Ala Asn Val Val Val Val Asp Trp Leu Pro Leu Ala His 470 475 480	384
CAG CTT TAC ACG GAT GCG GTC AAT AAT ACC AGG GTG GTG GGA CAC AGC Gln Leu Tyr Thr Asp Ala Val Asn Asn Thr Arg Val Val Gly His Ser 485 490 495	432
ATT GCC AGG ATG CTC GAC TGG CTG CAG GAG AAG GAC GAT TTT TCT CTC Ile Ala Arg Met Leu Asp Trp Leu Gln Glu Lys Asp Asp Phe Ser Leu 500 505 510	480
GGG AAT GTC CAC TTG ATC GGC TAC AGC CTC GGA GCG CAC GTG GCC GGG Gly Asn Val His Leu Ile Gly Tyr Ser Leu Gly Ala His Val Ala Gly 515 520 525	528
TAT GCA GGC AAC TTC GTG AAA GGA ACG GTG GGC CGA ATC ACA GGT TTG Tyr Ala Gly Asn Phe Val Lys Gly Thr Val Gly Arg Ile Thr Gly Leu 530 535 540 545	576
GAT CCT GCC GGG CCC ATG TTT GAA GGG GCC GAC ATC CAC AAG AGG CTC Asp Pro Ala Gly Pro Met Phe Glu Gly Ala Asp Ile His Lys Arg Leu 550 555 560	624
TCT CCG GAC GAT GCA GAT TTT GTG GAT GTC CTC CAC ACC TAC ACG CGT Ser Pro Asp Asp Ala Asp Phe Val Asp Val Leu His Thr Tyr Thr Arg 565 570 575	672
TCC TTC GGC TTG AGC ATT GGT ATT CAG ATG CCT GTG GGC CAC ATT GAC Ser Phe Gly Leu Ser Ile Gly Ile Gln Met Pro Val Gly His Ile Asp 580 585 590	720
ATC TAC CCC AAT GGG GGT GAC TTC CAG CCA GGC TGT GGA CTC AAC GAT Ile Tyr Pro Asn Gly Gly Asp Phe Gln Pro Gly Cys Gly Leu Asn Asp 595 600 605	768
GTC TTG GGA TCA ATT GCA TAT GGA ACA ATC ACA GAG GTG GTA AAA TGT Val Leu Gly Ser Ile Ala Tyr Gly Thr Ile Thr Glu Val Val Lys Cys 610 615 620 625	816

GAG CAT GAG CGA GCC GTC CAC CTC TTT GTT GAC TCT CTG GTG AAT CAG	864
Glu His Glu Arg Ala Val His Leu Phe Val Asp Ser Leu Val Asn Gln	
630 635 640	
GAC AAG CCG AGT TTT GCC TTC CAG TGC ACT GAC TCC AAT CGC TTC AAA	912
Asp Lys Pro Ser Phe Ala Phe Gln Cys Thr Asp Ser Asn Arg Phe Lys	
645 650 655	
AAG GGG ATC TGT CTG AGC TGC CGC AAG AAC CGT TGT AAT AGC ATT GGC	960
Lys Gly Ile Cys Leu Ser Cys Arg Lys Asn Arg Cys Asn Ser Ile Gly	
660 665 670	
TAC AAT GCC AAG AAA ATG AGG AAC AAG AGG AAC AGC AAA ATG TAC CTA	1008
Tyr Asn Ala Lys Lys Met Arg Asn Lys Arg Asn Ser Lys Met Tyr Leu	
675 680 685	
AAA ACC CGG GCA GGC ATG CCT TTC AGA GGT AAC CTT CAG TCC CTG GAG	1056
Lys Thr Arg Ala Gly Met Pro Phe Arg Gly Asn Leu Gln Ser Leu Glu	
690 695 700 705	
TGT CCC TGA	1065
Cys Pro *	

(2) Informácia pre SEQ ID NO: 6:

- 5 (i) Charakteristiky sekvencie:
 (A) Dĺžka: 355 aminokyselín
 (B) Typ: aminokyselina
 (D) Topológia: lineárna

10 (ii) Typ molekuly: proteín

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID NO: 6:

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

```

Glu Lys Asp Ala Asn Val Val Val Val Asp Trp Leu Pro Leu Ala His
    115                                120                        125

Gln Leu Tyr Thr Asp Ala Val Asn Asn Thr Arg Val Val Gly His Ser
    130                                135                        140

Ile Ala Arg Met Leu Asp Trp Leu Gln Glu Lys Asp Asp Phe Ser Leu
    145                                150                        155                        160

Gly Asn Val His Leu Ile Gly Tyr Ser Leu Gly Ala His Val Ala Gly
    165                                170                        175

Tyr Ala Gly Asn Phe Val Lys Gly Thr Val Gly Arg Ile Thr Gly Leu
    180                                185                        190

Asp Pro Ala Gly Pro Met Phe Glu Gly Ala Asp Ile His Lys Arg Leu
    195                                200                        205

Ser Pro Asp Asp Ala Asp Phe Val Asp Val Leu His Thr Tyr Thr Arg
    210                                215                        220

Ser Phe Gly Leu Ser Ile Gly Ile Gln Met Pro Val Gly His Ile Asp
    225                                230                        235                        240

Ile Tyr Pro Asn Gly Gly Asp Phe Gln Pro Gly Cys Gly Leu Asn Asp
    245                                250                        255

Val Leu Gly Ser Ile Ala Tyr Gly Thr Ile Thr Glu Val Val Lys Cys
    260                                265                        270

Glu His Glu Arg Ala Val His Leu Phe Val Asp Ser Leu Val Asn Gln
    275                                280                        285

Asp Lys Pro Ser Phe Ala Phe Gln Cys Thr Asp Ser Asn Arg Phe Lys
    290                                295                        300

Lys Gly Ile Cys Leu Ser Cys Arg Lys Asn Arg Cys Asn Ser Ile Gly
    305                                310                        315                        320

Tyr Asn Ala Lys Lys Met Arg Asn Lys Arg Asn Ser Lys Met Tyr Leu
    325                                330                        335

Lys Thr Arg Ala Gly Met Pro Phe Arg Gly Asn Leu Gln Ser Leu Glu
    340                                345                        350

Cys Pro *
    355

```

(2) Informácia pre SEQ ID NO: 7:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- 5 (A) Dĺžka: 2565 párov báz
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Reťazec: dvojité
 (D) Topológia: lineárna

10 (ii) Typ molekuly: cDNA

(ix) Vlastnosti:

(A) Meno/kľúč: CDS

(B) Umiestnenie: 252..1754

5 (xi) Opis sekvencie: SEQ ID NO: 7:

GAATTCGCGG CCGCGTCGAC GCGGGCTCAG GACGAGGGCA GATCTCGTTC TGGGGCAAGC	60
CGTTGACACT CGCTCCCTGC CACCGCCCGG GCTCCGTGCC GCCAAGTTTT CATTITCCAC	120
CTTCTCTGCC TCCAGTCCCC CAGCCCCTGG CCGAGAGAAG GSTCTTACCG GCCGGGATTG	180
CTGGAACAC CAAGAGGTGG TTTTGTGTTT TTAAACTTC TGTTCTTGG GAGGGGGTGT	240
GGCGGGGCAG G ATG AGC AAC TCC GTT CCT CTG CTC TGT TTC TGG AGC CTC	290
Met Ser Asn Ser Val Pro Leu Leu Cys Phe Trp Ser Leu	
360 365	
TGC TAT TGC TTT GCT GCG GGG AGC CCC GTA CCT TTT GGT CCA GAG GGA	338
Cys Tyr Cys Phe Ala Ala Gly Ser Pro Val Pro Phe Gly Pro Glu Gly	
370 375 380	
CGG CTG GAA GAT AAG CTC CAC AAA CCC AAA GCT ACA CAG ACT GAG GTC	386
Arg Leu Glu Asp Lys Leu His Lys Pro Lys Ala Thr Gln Thr Glu Val	
385 390 395 400	
AAA CCA TCT GTG AGG TTT AAC CTC CGC ACC TCC AAG GAC CCA GAG CAT	434
Lys Pro Ser Val Arg Phe Asn Leu Arg Thr Ser Lys Asp Pro Glu His	
405 410 415	
GAA GGA TGC TAC CTC TCC GTC GGC CAC AGC CAG CCC TTA GAA GAC TGC	482
Glu Gly Cys Tyr Leu Ser Val Gly His Ser Gln Pro Leu Glu Asp Cys	
420 425 430	
AGT TTC AAC ATG ACA GCT AAA ACC TTT TTC ATC ATT CAC GGA TGG ACG	530
Ser Phe Asn Met Thr Ala Lys Thr Phe Phe Ile Ile His Gly Trp Thr	
435 440 445	
ATG AGC GGT ATC TTT GAA AAC TGG CTG CAC AAA CTC GTG TCA GCC CTG	578
Met Ser Gly Ile Phe Glu Asn Trp Leu His Lys Leu Val Ser Ala Leu	
450 455 460	
CAC ACA AGA GAG AAA GAC GCC AAT GTA GTT GTG GTT GAC TGG CTC CCC	626
His Thr Arg Glu Lys Asp Ala Asn Val Val Val Val Asp Trp Leu Pro	
465 470 475 480	
CTG GCC CAC CAG CTT TAC ACG GAT GCG GTC AAT AAT ACC AGG GTG GTG	674
Leu Ala His Gln Leu Tyr Thr Asp Ala Val Asn Asn Thr Arg Val Val	
485 490 495	
GGA CAC AGC ATT GCC AGG ATG CTC GAC TGG CTG CAG GAG AAG GAC GAT	722
Gly His Ser Ile Ala Arg Met Leu Asp Trp Leu Gln Glu Lys Asp Asp	
500 505 510	
TTT TCT CTC GGG AAT GTC CAC TTG ATC GGC TAC AGC CTC GGA GCG CAC	770
Phe Ser Leu Gly Asn Val His Leu Ile Gly Tyr Ser Leu Gly Ala His	
515 520 525	
GTG GCC GGG TAT GCA GGC AAC TTC GTG AAA GGA ACG GTG GGC CGA ATC	818
Val Ala Gly Tyr Ala Gly Asn Phe Val Lys Gly Thr Val Gly Arg Ile	
530 535 540	

SK 287687 B6

ACA GGT TTG GAT CCT GCC GGG CCC ATG TTT GAA GGG GCC GAC ATC CAC Thr Gly Leu Asp Pro Ala Gly Pro Met Phe Glu Gly Ala Asp Ile His 545 550 555 560	866
AAG AGG CTC TCT CCG GAC GAT GCA GAT TTT GTG GAT GTC CTC CAC ACC Lys Arg Leu Ser Pro Asp Asp Ala Asp Phe Val Asp Val Leu His Thr 565 570 575	914
TAC ACG CGT TCC TTC GGC TTG AGC ATT GGT ATT CAG ATG CCT GTG GGC Tyr Thr Arg Ser Phe Gly Leu Ser Ile Gly Ile Gln Met Pro Val Gly 580 585 590	962
CAC ATT GAC ATC TAC CCC AAT GGG GGT GAC TTC CAG CCA GGC TGT GGA His Ile Asp Ile Tyr Pro Asn Gly Gly Asp Phe Gln Pro Gly Cys Gly 595 600 605	1010
CTC AAC GAT GTC TTG GGA TCA ATT GCA TAT GGA ACA ATC ACA GAG GTG Leu Asn Asp Val Leu Gly Ser Ile Ala Tyr Gly Thr Ile Thr Glu Val 610 615 620	1058
GTA AAA TGT GAG CAT GAG CGA GCC GTC CAC CTC TTT GTT GAC TCT CTG Val Lys Cys Glu His Glu Arg Ala Val His Leu Phe Val Asp Ser Leu 625 630 635 640	1106
GTG AAT CAG GAC AAG CCG AGT TTT GCC TTC CAG TGC ACT GAC TCC AAT Val Asn Gln Asp Lys Pro Ser Phe Ala Phe Gln Cys Thr Asp Ser Asn 645 650 655	1154
CGC TTC AAA AAG GGG ATC TGT CTG AGC TGC CGC AAG AAC CGT TGT AAT Arg Phe Lys Lys Gly Ile Cys Leu Ser Cys Arg Lys Asn Arg Cys Asn 660 665 670	1202
AGC ATT GGC TAC AAT GCC AAG AAA ATG AGG AAC AAG AGG AAC AGC AAA Ser Ile Gly Tyr Asn Ala Lys Lys Met Arg Asn Lys Arg Asn Ser Lys 675 680 685	1250
ATG TAC CTA AAA ACC CGG GCA GGC ATG CCT TTC AGA GTT TAC CAT TAT Met Tyr Leu Lys Thr Arg Ala Gly Met Pro Phe Arg Val Tyr His Tyr 690 695 700	1298
CAG ATG AAA ATC CAT GTC TTC AGT TAC AAG AAC ATG GGA GAA ATT GAG Gln Met Lys Ile His Val Phe Ser Tyr Lys Asn Met Gly Glu Ile Glu 705 710 715 720	1346
CCC ACC TTT TAC GTC ACC CTT TAT GGC ACT AAT GCA GAT TCC CAG ACT Pro Thr Phe Tyr Val Thr Leu Tyr Gly Thr Asn Ala Asp Ser Gln Thr 725 730 735	1394
CTG CCA CTG GAA ATA GTG GAG CGG ATC GAG CAG AAT GCC ACC AAC ACC Leu Pro Leu Glu Ile Val Glu Arg Ile Glu Gln Asn Ala Thr Asn Thr 740 745 750	1442
TTC CTG GTC TAC ACC GAG GAG GAC TTG GGA GAC CTC TTG AAG ATC CAG Phe Leu Val Tyr Thr Glu Glu Asp Leu Gly Asp Leu Leu Lys Ile Gln 755 760 765	1490
CTC ACC TGG GAG GGG GCC TCT CAG TCT TGG TAC AAC CTG TGG AAG GAG Leu Thr Trp Glu Gly Ala Ser Gln Ser Trp Tyr Asn Leu Trp Lys Glu 770 775 780	1538
TTT CGC AGC TAC CTG TCT CAA CCC CGC AAC CCC GGA CGG GAG CTG AAT Phe Arg Ser Tyr Leu Ser Gln Pro Arg Asn Pro Gly Arg Glu Leu Asn 785 790 795 800	1586

SK 287687 B6

ATC AGG CGC ATC CGG GTG AAG TCT GGG GAA ACC CAG CGG AAA CTG ACA Ile Arg Arg Ile Arg Val Lys Ser Gly Glu Thr Gln Arg Lys Leu Thr 805 810 815	1634
TTT TGT ACA GAA GAC CCT GAG AAC ACC AGC ATA TCC CCA GGC CGG GAG Phe Cys Thr Glu Asp Pro Glu Asn Thr Ser Ile Ser Pro Gly Arg Glu 820 825 830	1682
CTC TGG TTT CGC AAG TGT CGG GAT GGC TGG AGG ATG AAA AAC GAA ACC Leu Trp Phe Arg Lys Cys Arg Asp Gly Trp Arg Met Lys Asn Glu Thr 835 840 845	1730
AGT CCC ACT GTG GAG CTT CCC TGA GGGTGCCCGG GCAAGTCTTG CCAGCAAGGC Ser Pro Thr Val Glu Leu Pro * 850 855	1784
AGCAAGACTT CCTGCTATCC AAGCCCATGG AGGAAAGTTA CTGCTGAGGA CCCACCCAAT	1844
GGAAGGATTC TTCTCAGCCT TGACCCTGGA GCACTGGGAA CAACTGGTCT CCTGTGATGG	1904
CTGGGACTCC TCGCGGGAGG GGACTGCGCT GCTATAGCTC TTGCTGCCTC TCTTGAATAG	1964
CTCTAACTCC AAACCTCTGT CCACACCTCC AGAGCACCAA GTCCAGATTT GTGTGTAAGC	2024
AGCTGGGTGC CTGGGGCCTC TCGTGACACAC TGGATTGGTT TCTCAGTTGC TGGGCGAGCC	2084
TGTACTCTGC CTGACGAGGA ACGCTGGCTC CGAAGAGGCC CTGTGTAGAA GGCTGTCAGC	2144
TGCTCAGCCT GCTTTGAGCC TCAGTGAGAA GTCCTCCGA CAGGAGCTGA CTCATGTCAG	2204
GATGGCAGGC CTGGTATCTT GCTCGGGCCC TGGCTGTTGG GGTTCATG GGTTCGACTG	2264
ACCATACTGC TTACGTCTTA GCCATTCCGT CCTGCTCCCC AGCTCACTCT CTGAAGCACA	2324
CATCATTGGC TTTCCTATTT TTCTGTTTAT TTTTAAATTG AGCAAATGTC TATTGAACAC	2384
TTAAATTA TTAGAATGTG GTAATGGACA TATTACTGAG CCTCTCCATT TGGAACCCAG	2444
TGGAGTTGGG ATTTCTAGAC CCTCTTTCTG TTTGGATGGT GTATGTGTAT ATGCATGGGG	2504
AAAGGCACCT GGGGCCTGGG GGAGGCTATA GGATATAAGC AGTCGACGCG GCCGCGAATT	2564
C	2565

(2) Informácia pre SEQ ID NO: 8:

(i) Charakteristiky sekvencie:

(A) Dĺžka: 501 aminokyselín

(B) Typ: aminokyselina

(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: proteín

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID NO: 8:

Met	Ser	Asn	Ser	Val	Pro	Leu	Leu	Cys	Phe	Trp	Ser	Leu	Cys	Tyr	Cys			
1				5					10					15				
Phe	Ala	Ala	Gly	Ser	Pro	Val	Pro	Phe	Gly	Pro	Glu	Gly	Arg	Leu	Glu			
			20					25					30					
Asp	Lys	Leu	His	Lys	Pro	Lys	Ala	Thr	Gln	Thr	Glu	Val	Lys	Pro	Ser			
		35					40					45						
Val	Arg	Phe	Asn	Leu	Arg	Thr	Ser	Lys	Asp	Pro	Glu	His	Glu	Gly	Cys			
	50					55					60							
Tyr	Leu	Ser	Val	Gly	His	Ser	Gln	Pro	Leu	Glu	Asp	Cys	Ser	Phe	Asn			
65					70					75					80			
Met	Thr	Ala	Lys	Thr	Phe	Phe	Ile	Ile	His	Gly	Trp	Thr	Met	Ser	Gly			
				85					90						95			
Ile	Phe	Glu	Asn	Trp	Leu	His	Lys	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	His	Thr	Arg			
			100					105					110					
Glu	Lys	Asp	Ala	Asn	Val	Val	Val	Val	Asp	Trp	Leu	Pro	Leu	Ala	His			
		115					120					125						
Gln	Leu	Tyr	Thr	Asp	Ala	Val	Asn	Asn	Thr	Arg	Val	Val	Gly	His	Ser			
	130					135					140							
Ile	Ala	Arg	Met	Leu	Asp	Trp	Leu	Gln	Glu	Lys	Asp	Asp	Phe	Ser	Leu			
145				150						155					160			
Gly	Asn	Val	His	Leu	Ile	Gly	Tyr	Ser	Leu	Gly	Ala	His	Val	Ala	Gly			
				165					170						175			
Tyr	Ala	Gly	Asn	Phe	Val	Lys	Gly	Thr	Val	Gly	Arg	Ile	Thr	Gly	Leu			
			180					185					190					
Asp	Pro	Ala	Gly	Pro	Met	Phe	Glu	Gly	Ala	Asp	Ile	His	Lys	Arg	Leu			
		195					200					205						
Ser	Pro	Asp	Asp	Ala	Asp	Phe	Val	Asp	Val	Leu	His	Thr	Tyr	Thr	Arg			
	210					215					220							
Ser	Phe	Gly	Leu	Ser	Ile	Gly	Ile	Gln	Met	Pro	Val	Gly	His	Ile	Asp			
225					230					235					240			
Ile	Tyr	Pro	Asn	Gly	Gly	Asp	Phe	Gln	Pro	Gly	Cys	Gly	Leu	Asn	Asp			
			245						250					255				
Val	Leu	Gly	Ser	Ile	Ala	Tyr	Gly	Thr	Ile	Thr	Glu	Val	Val	Lys	Cys			
			260					265					270					
Glu	His	Glu	Arg	Ala	Val	His	Leu	Phe	Val	Asp	Ser	Leu	Val	Asn	Gln			
		275					280					285						

Asp Lys Pro Ser Phe Ala Phe Gln Cys Thr Asp Ser Asn Arg Phe Lys
 290 295 300
 Lys Gly Ile Cys Leu Ser Cys Arg Lys Asn Arg Cys Asn Ser Ile Gly
 305 310 315 320
 Tyr Asn Ala Lys Lys Met Arg Asn Lys Arg Asn Ser Lys Met Tyr Leu
 325 330 335
 Lys Thr Arg Ala Gly Met Pro Phe Arg Val Tyr His Tyr Gln Met Lys
 340 345 350
 Ile His Val Phe Ser Tyr Lys Asn Met Gly Glu Ile Glu Pro Thr Phe
 355 360 365
 Tyr Val Thr Leu Tyr Gly Thr Asn Ala Asp Ser Gln Thr Leu Pro Leu
 370 375 380
 Glu Ile Val Glu Arg Ile Glu Gln Asn Ala Thr Asn Thr Phe Leu Val
 385 390 395 400
 Tyr Thr Glu Glu Asp Leu Gly Asp Leu Leu Lys Ile Gln Leu Thr Trp
 405 410 415
 Glu Gly Ala Ser Gln Ser Trp Tyr Asn Leu Trp Lys Glu Phe Arg Ser
 420 425 430
 Tyr Leu Ser Gln Pro Arg Asn Pro Gly Arg Glu Leu Asn Ile Arg Arg
 435 440 445
 Ile Arg Val Lys Ser Gly Glu Thr Gln Arg Lys Leu Thr Phe Cys Thr
 450 455 460
 Glu Asp Pro Glu Asn Thr Ser Ile Ser Pro Gly Arg Glu Leu Trp Phe
 465 470 475 480
 Arg Lys Cys Arg Asp Gly Trp Arg Met Lys Asn Glu Thr Ser Pro Thr
 485 490 495
 Val Glu Leu Pro
 500

(2) Informácia pre SEQ ID NO: 9:

5

(i) Charakteristiky sekvencie:

(A) Dĺžka: 1035 párov báz

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Reťazec: dvojité

10

(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: cDNA

(ix) Vlastnosti:

15

(A) Meno/kľúč: CDS

(B) Umiestnenie: 1...1035

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID NO: 9:

ATG AGC AAC TCC GTT CCT CTG CTC TGT TTC TGG AGC CTC TGC TAT TGC	48
Met Ser Asn Ser Val Pro Leu Leu Cys Phe Trp Ser Leu Cys Tyr Cys	
505 510. 515	
TTT GCT GCG GGG AGC CCC GTA CCT TTT GGT CCA GAG GGA CGG CTG GAA	96
Phe Ala Ala Gly Ser Pro Val Pro Phe Gly Pro Glu Gly Arg Leu Glu	
520 525 530	
GAT AAG CTC CAC AAA CCC AAA GCT ACA CAG ACT GAG GTC AAA CCA TCT	144
Asp Lys Leu His Lys Pro Lys Ala Thr Gln Thr Glu Val Lys Pro Ser	
535 540 545	
GTG AGG TTT AAC CTC CGC ACC TCC AAG GAC CCA GAG CAT GAA GGA TGC	192
Val Arg Phe Asn Leu Arg Thr Ser Lys Asp Pro Glu His Glu Gly Cys	
550 555 560 565	
TAC CTC TCC GTC GGC CAC AGC CAG CCC TTA GAA GAC TGC AGT TTC AAC	240
Tyr Leu Ser Val Gly His Ser Gln Pro Leu Glu Asp Cys Ser Phe Asn	
570 575 580	
ATG ACA GCT AAA ACC TTT TTC ATC ATT CAC GGA TGG ACG ATG AGC GGT	288
Met Thr Ala Lys Thr Phe Phe Ile Ile His Gly Trp Thr Met Ser Gly	
585 590 595	
ATC TTT GAA AAC TGG CTG CAC AAA CTC GTG TCA GCC CTG CAC ACA AGA	336
Ile Phe Glu Asn Trp Leu His Lys Leu Val Ser Ala Leu His Thr Arg	
600 605 610	
GAG AAA GAC GCC AAT GTA GTT GTG GTT GAC TGG CTC CCC CTG GCC CAC	384
Glu Lys Asp Ala Asn Val Val Val Val Asp Trp Leu Pro Leu Ala His	
615 620 625	
CAG CTT TAC ACG GAT GCG GTC AAT AAT ACC AGG GTG GTG GGA CAC AGC	432
Gln Leu Tyr Thr Asp Ala Val Asn Asn Thr Arg Val Val Gly His Ser	
630 635 640 645	
ATT GCC AGG ATG CTC GAC TGG CTG CAG GAG AAG GAC GAT TTT TCT CTC	480
Ile Ala Arg Met Leu Asp Trp Leu Gln Glu Lys Asp Asp Phe Ser Leu	
650 655 660	
GGG AAT GTC CAC TTG ATC GGC TAC AGC CTC GGA GCG CAC GTG GCC GGG	528
Gly Asn Val His Leu Ile Gly Tyr Ser Leu Gly Ala His Val Ala Gly	
665 670 675	
TAT GCA GGC AAC TTC GTG AAA GGA ACG GTG GGC CGA ATC ACA GGT TTG	576
Tyr Ala Gly Asn Phe Val Lys Gly Thr Val Gly Arg Ile Thr Gly Leu	
680 685 690	
GAT CCT GCC GGG CCC ATG TTT GAA GGG GCC GAC ATC CAC AAG AGG CTC	624
Asp Pro Ala Gly Pro Met Phe Glu Gly Ala Asp Ile His Lys Arg Leu	
695 700 705	
TCT CCG GAC GAT GCA GAT TTT GTG GAT GTC CTC CAC ACC TAC ACG CGT	672
Ser Pro Asp Asp Ala Asp Phe Val Asp Val Leu His Thr Tyr Thr Arg	
710 715 720 725	
TCC TTC GGC TTG AGC ATT GGT ATT CAG ATG CCT GTG GGC CAC ATT GAC	720
Ser Phe Gly Leu Ser Ile Gly Ile Gln Met Pro Val Gly His Ile Asp	
730 735 740	
ATC TAC CCC AAT GGG GGT GAC TTC CAG CCA GGC TGT GGA CTC AAC GAT	768
Ile Tyr Pro Asn Gly Gly Asp Phe Gln Pro Gly Cys Gly Leu Asn Asp	
745 750 755	

GTC TTG GGA TCA ATT GCA TAT GGA ACA ATC ACA GAG GTG GTA AAA TGT	816
Val Leu Gly Ser Ile Ala Tyr Gly Thr Ile Thr Glu Val Val Lys Cys	
760 765 770	
GAG CAT GAG CGA GGC GTC CAC CTC TTT GTT GAC TCT CTG GTG AAT CAG	864
Glu His Glu Arg Ala Val His Leu Phe Val Asp Ser Leu Val Asn Gln	
775 780 785	
GAC AAG CCG AGT TTT GCC TTC CAG TGC ACT GAC TCC AAT CGC TTC AAA	912
Asp Lys Pro Ser Phe Ala Phe Gln Cys Thr Asp Ser Asn Arg Phe Lys	
790 795 800 805	
AAG GGG ATC TGT CTG AGC TGC CGC AAG AAC CGT TGT AAT AGC ATT GGC	960
Lys Gly Ile Cys Leu Ser Cys Arg Lys Asn Arg Cys Asn Ser Ile Gly	
810 815 820	
TAC AAT GCC AAG AAA ATG AGG AAC AAG AGG AAC AGC AAA ATG TAC CTA	1008
Tyr Asn Ala Lys Lys Met Arg Asn Lys Arg Asn Ser Lys Met Tyr Leu	
825 830 835	
AAA ACC CGG GCA GGC ATG CCT TTC AGA	1035
Lys Thr Arg Ala Gly Met Pro Phe Arg	
840 845	

(2) Informácia pre SEQ ID NO: 10:

- 5 (i) Charakteristiky sekvencie:
 (A) Dĺžka: 345 aminokyselín
 (B) Typ: aminokyselina
 (D) Topológia: lineárna

10 (ii) Typ molekuly: proteín

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID NO: 10:

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

Gln Leu Tyr Thr Asp Ala Val Asn Asn Thr Arg Val Val Gly His Ser

130 135 140

Ile Ala Arg Met Leu Asp Trp Leu Gln Glu Lys Asp Asp Phe Ser Leu
145 150 155 160

Gly Asn Val His Leu Ile Gly Tyr Ser Leu Gly Ala His Val Ala Gly
165 170 175

Tyr Ala Gly Asn Phe Val Lys Gly Thr Val Gly Arg Ile Thr Gly Leu
180 185 190

Asp Pro Ala Gly Pro Met Phe Glu Gly Ala Asp Ile His Lys Arg Leu
195 200 205

Ser Pro Asp Asp Ala Asp Phe Val Asp Val Leu His Thr Tyr Thr Arg
210 215 220

Ser Phe Gly Leu Ser Ile Gly Ile Gln Met Pro Val Gly His Ile Asp
225 230 235 240

Ile Tyr Pro Asn Gly Gly Asp Phe Gln Pro Gly Cys Gly Leu Asn Asp
245 250 255

Val Leu Gly Ser Ile Ala Tyr Gly Thr Ile Thr Glu Val Val Lys Cys
260 265 270

Glu His Glu Arg Ala Val His Leu Phe Val Asp Ser Leu Val Asn Gln
275 280 285

Asp Lys Pro Ser Phe Ala Phe Gln Cys Thr Asp Ser Asn Arg Phe Lys
290 295 300

Lys Gly Ile Cys Leu Ser Cys Arg Lys Asn Arg Cys Asn Ser Ile Gly
305 310 315 320

Tyr Asn Ala Lys Lys Met Arg Asn Lys Arg Asn Ser Lys Met Tyr Leu
325 330 335

Lys Thr Arg Ala Gly Met Pro Phe Arg
340 345

(2) Informácia pre SEQ ID NO: 11:

- 5 (i) Charakteristiky sekvencie:
 (A) Dĺžka: 225 párov báz
 (B) Typ: nukleová kyselina
 (C) Reťazec: dvojité
 (D) Topológia: lineárna
- 10 (ii) Typ molekuly: cDNA
- (ix) Vlastnosti:
 (A) Meno/kľúč: CDS
 15 (B) Umiestnenie: 1...225

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID NO: 11:

CTG GGA TCC ATC GCC TAT GGC ACG ATC GCG GAG GTG GTG AAG TGC GAG	48
Leu Gly Ser Ile Ala Tyr Gly Thr Ile Ala Glu Val Val Lys Cys Glu	
350 355 360	
CAT GAG CGG GCC GTG CAT CTC TTT GTG GAC TCC CTG GTG AAC CAG GAC	96
His Glu Arg Ala Val His Leu Phe Val Asp Ser Leu Val Asn Gln Asp	
365 370 375	
AAG CCG AGC TTT GCC TTC CAG TGC ACA GAC TCC AAC CGC TTC AAA AAA	144
Lys Pro Ser Phe Ala Phe Gln Cys Thr Asp Ser Asn Arg Phe Lys Lys	
380 385 390	
GGG ATC TGT CTC AGC TGC CGG AAG AAC CGC TGT AAC GGC ATC GGC TAC	192
Gly Ile Cys Leu Ser Cys Arg Lys Asn Arg Cys Asn Gly Ile Gly Tyr	
395 400 405	
AAT GCT AAG AAG ACG AGG AAT AAG AGG AAC ACC	225
Asn Ala Lys Lys Thr Arg Asn Lys Arg Asn Thr	
410 415 420	

5 (2) Informácia pre SEQ ID NO: 12:

(i) Charakteristiky sekvencie:

(A) Dĺžka: 75 aminokyselín

(B) Typ: aminokyselina

10 (D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: proteín

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID NO: 12:

15

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

(2) Informácia pre SEQ ID NO: 13:

20 (i) Charakteristiky sekvencie:

(A) Dĺžka: 472 aminokyselín

(B) Typ: aminokyselina

(D) Topológia: lineárna

25 (ii) Typ molekuly: proteín

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID NO: 13:

```

Met Glu Ser Lys Ala Leu Leu Val Leu Thr Leu Ala Val Trp Leu Gln
1           5           10           15

Ser Leu Thr Ala Ser Arg Gly Gly Val Ala Ala Ala Asp Gln Arg Arg
          20           25           30

Asp Phe Ile Asp Ile Glu Ser Lys Phe Ala Leu Arg Thr Pro Glu Asp
          35           40           45

Thr Ala Glu Asp Thr Cys His Leu Ile Pro Gly Val Ala Glu Ser Val
          50           55           60

Ala Thr Cys His Phe Asn His Ser Ser Lys Thr Phe Met Val Ile His
63           70           75           80

Gly Trp Thr Val Thr Gly Met Tyr Glu Ser Trp Val Pro Lys Leu Val
          85           90           95

Ala Ala Leu Tyr Lys Arg Glu Pro Asp Ser Asn Val Ile Val Val Asp
          100          105          110

Trp Leu Ser Arg Ala Gln Glu His Tyr Pro Val Ser Ala Gly Tyr Thr
          115          120          125

Lys Val Gly Gln Asp Val Ala Arg Phe Ile Asn Trp Met Glu Glu Glu
          130          135          140

Phe Asn Tyr Pro Leu Asp Asn Val His Leu Leu Gly Tyr Ser Leu Gly
145          150          155          160

Ala His Ala Ala Gly Ile Ala Gly Ser Leu Thr Asn Lys Lys Val Asn
          165          170          175

Arg Ile Thr Gly Leu Asp Pro Ala Gly Pro Asn Phe Glu Tyr Ala Glu
          180          185          190

Ala Pro Arg Leu Ser Pro Asp Asp Ala Asp Phe Val Asp Val Leu His
          195          200          205

Thr Phe Thr Arg Gly Ser Pro Gly Arg Ser Ile Gly Ile Gln Lys Pro
          210          215          220

Val Gly His Val Asp Ile Tyr Pro Asn Gly Gly Thr Phe Gln Pro Gly
225          230          235          240

Cys Asn Ile Gly Glu Ala Ile Arg Val Ile Ala Glu Arg Gly Leu Gly
          245          250          255

Asp Val Asp Gln Leu Lys Cys Ser His Glu Arg Ser Ile His Leu Phe
          260          265          270

Ile Asp Ser Leu Leu Asn Glu Glu Asn Pro Ser Lys Ala Tyr Arg Cys
          275          280          285

```

```

Ser Ser Lys Glu Ala Phe Glu Lys Gly Leu Cys Leu Ser Cys Arg Lys
 290                               295                               300

Asn Arg Cys Asn Asn Leu Gly Tyr Glu Ile Asn Lys Val Arg Ala Lys
305                               310                               315                               320

Arg Ser Ser Lys Met Tyr Leu Lys Thr Arg Ser Gln Met Pro Tyr Lys
                               325                               330                               335

Val Phe His Tyr Gln Val Lys Ile His Phe Ser Gly Thr Glu Ser Glu
                               340                               345                               350

Thr His Thr Asn Gln Ala Phe Glu Ile Ser Leu Tyr Gly Thr Val Ala
                               355                               360                               365

Glu Ser Glu Asn Ile Pro Phe Thr Leu Pro Glu Val Ser Thr Asn Lys
370                               375                               380

Thr Tyr Ser Phe Leu Ile Tyr Thr Glu Val Asp Ile Gly Glu Leu Leu
385                               390                               395                               400

Met Leu Lys Leu Lys Trp Lys Ser Asp Ser Tyr Phe Ser Trp Ser Asp
                               405                               410                               415

Trp Trp Ser Ser Pro Gly Phe Ala Ile Gln Lys Ile Arg Val Lys Ala
                               420                               425                               430

Gly Glu Thr Gln Lys Lys Val Ile Phe Cys Ser Arg Glu Lys Val Ser
435                               440                               445

His Leu Gln Lys Gly Lys Ala Pro Ala Val Phe Val Lys Cys His Asp
450                               455                               460

Lys Ser Leu Asn Lys Lys Ser Gly
465                               470

```

(2) Informácia pre SEQ ID NO: 14:

(i) Charakteristiky sekvencie:

(A) Dĺžka: 499 aminokyselín

(B) Typ: aminokyselina

(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: proteín

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID NO: 14:

```

Met Asp Thr Ser Pro Leu Cys Phe Ser Ile Leu Leu Val Leu Cys Ile
 1                               5                               10                               15

Phe Ile Gln Ser Ser Ala Leu Gly Gln Ser Leu Lys Pro Glu Pro Phe
                               20                               25                               30

Gly Arg Arg Ala Gln Ala Val Glu Thr Asn Lys Thr Leu His Glu Met
35                               40                               45

```

Lys Thr Arg Phe Leu Leu Phe Gly Glu Thr Asn Gln Gly Cys Gln Ile
 50 55 60
 Arg Ile Asn His Pro Asp Thr Leu Gln Glu Cys Gly Phe Asn Ser Ser
 65 70 75 80
 Leu Pro Leu Val Met Ile Ile His Gly Trp Ser Val Asp Gly Val Leu
 85 90 95
 Glu Asn Trp Ile Trp Gln Met Val Ala Ala Leu Lys Ser Gln Pro Ala
 100 105 110
 Gln Pro Val Asn Val Gly Leu Val Asp Trp Ile Thr Leu Ala His Asp
 115 120 125
 His Tyr Thr Ile Ala Val Arg Asn Thr Arg Leu Val Gly Lys Glu Val
 130 135 140
 Ala Ala Leu Leu Arg Trp Leu Glu Glu Ser Val Gln Leu Ser Arg Ser
 145 150 155 160
 His Val His Leu Ile Gly Tyr Ser Leu Gly Ala His Val Ser Gly Phe
 165 170 175
 Ala Gly Ser Ser Ile Gly Gly Thr His Lys Ile Gly Arg Ile Thr Gly
 180 185 190
 Leu Asp Ala Ala Gly Pro Leu Phe Glu Gly Ser Ala Pro Ser Asn Arg
 195 200 205
 Leu Ser Pro Asp Asp Ala Asn Phe Val Asp Ala Ile His Thr Phe Thr
 210 215 220
 Arg Glu His Met Gly Leu Ser Val Gly Ile Lys Gln Pro Ile Gly His
 225 230 235 240
 Tyr Asp Phe Tyr Pro Asn Gly Gly Ser Phe Gln Pro Gly Cys His Phe
 245 250 255
 Leu Glu Leu Tyr Arg His Ile Ala Gln His Gly Phe Asn Ala Ile Thr
 260 265 270
 Gln Thr Ile Lys Cys Ser His Glu Arg Ser Val His Leu Phe Ile Asp
 275 280 285
 Ser Leu Leu His Ala Gly Thr Gln Ser Met Ala Tyr Pro Cys Gly Asp
 290 295 300
 Met Asn Ser Phe Ser Gln Gly Leu Cys Leu Ser Cys Lys Lys Gly Arg
 305 310 315 320
 Cys Asn Thr Leu Gly Tyr His Val Arg Gln Glu Pro Arg Ser Lys Ser
 325 330 335
 Lys Arg Leu Phe Leu Val Thr Arg Ala Gln Ser Pro Phe Lys Val Tyr
 340 345 350
 His Tyr Gln Leu Lys Ile Gln Phe Ile Asn Gln Thr Glu Thr Pro Ile
 355 360 365
 Gln Thr Thr Phe Thr Met Ser Leu Leu Gly Thr Lys Glu Lys Met Gln
 370 375 380
 Lys Ile Pro Ile Thr Leu Gly Lys Gly Ile Ala Ser Asn Lys Thr Tyr
 385 390 395 400

Ser Phe Leu Ile Thr Leu Asp Val Asp Ile Gly Glu Leu Ile Met Ile
405 410 415

Lys Phe Lys Trp Glu Asn Ser Ala Val Trp Ala Asn Val Trp Asp Thr
420 425 430

Val Gln Thr Ile Ile Pro Trp Ser Thr Gly Pro Arg His Ser Gly Leu
435 440 445

Val Leu Lys Thr Ile Arg Val Lys Ala Gly Glu Thr Gln Gln Arg Met
450 455 460

Thr Phe Cys Ser Glu Asn Thr Asp Asp Leu Leu Leu Arg Pro Thr Gln
465 470 475 480

Glu Lys Ile Phe Val Lys Cys Glu Ile Lys Ser Lys Thr Ser Lys Arg
485 490 495

Lys Ile Arg

(2) Informácia pre SEQ ID NO: 15:

- 5 (i) Charakteristiky sekvencie:
(A) Dĺžka: 465 aminokyselín
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topológia: lineárna

10 (ii) Typ molekuly: proteín

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID NO: 15:

Met Leu Pro Leu Trp Thr Leu Ser Leu Leu Leu Gly Ala Val Ala Gly
1 5 10 15

Lys Glu Val Cys Tyr Glu Arg Leu Gly Cys Phe Ser Asp Asp Ser Pro
20 25 30

Trp Ser Gly Ile Thr Glu Arg Pro Leu His Ile Leu Pro Trp Ser Pro
35 40 45

Lys Asp Val Asn Thr Arg Phe Leu Leu Tyr Thr Asn Glu Asn Pro Asn
50 55 60

Asn Phe Gln Glu Val Ala Ala Asp Ser Ser Ser Ile Ser Gly Ser Asn
65 70 75 80

Phe Lys Thr Asn Arg Lys Thr Arg Phe Ile Ile His Gly Phe Ile Asp
85 90 95

Lys Gly Glu Glu Asn Trp Leu Ala Asn Val Cys Lys Asn Leu Phe Lys
100 105 110

Val Glu Ser Val Asn Cys Ile Cys Val Asp Trp Lys Gly Gly Ser Arg
115 120 125

Thr Gly Tyr Thr Gln Ala Ser Gln Asn Ile Arg Ile Val Gly Ala Glu
130 135 140

Val Ala Tyr Phe Val Glu Phe Leu Gln Ser Ala Phe Gly Tyr Ser Pro
 145 150 155 160
 Ser Asn Val His Val Ile Gly His Ser Leu Gly Ala His Ala Ala Gly
 165 170 175
 Glu Ala Gly Arg Arg Thr Asn Gly Thr Ile Gly Arg Ile Thr Gly Leu
 180 185 190
 Asp Pro Ala Glu Pro Cys Phe Gln Gly Thr Pro Glu Leu Val Arg Leu
 195 200 205
 Asp Pro Ser Asp Ala Lys Phe Val Asp Val Ile His Thr Asp Gly Ala
 210 215 220
 Pro Ile Val Pro Asn Leu Gly Phe Gly Met Ser Gln Val Val Gly His
 225 230 235 240
 Leu Asp Phe Phe Pro Asn Gly Gly Val Glu Met Pro Gly Cys Lys Lys
 245 250 255
 Asn Ile Leu Ser Gln Ile Val Asp Ile Asp Gly Ile Trp Glu Gly Thr
 260 265 270
 Arg Asp Phe Ala Ala Cys Asn His Leu Arg Ser Tyr Lys Tyr Tyr Thr
 275 280 285
 Asp Ser Ile Val Asn Pro Asp Gly Phe Ala Gly Phe Pro Cys Ala Ser
 290 295 300
 Tyr Asn Val Phe Thr Ala Asn Lys Cys Phe Pro Cys Pro Ser Gly Gly
 305 310 315 320
 Cys Pro Gln Met Gly His Tyr Ala Asp Arg Tyr Pro Gly Lys Thr Asn
 325 330 335
 Asp Val Gly Gln Lys Phe Tyr Leu Asp Thr Gly Asp Ala Ser Asn Phe
 340 345 350
 Ala Arg Trp Arg Tyr Lys Val Ser Val Thr Leu Ser Gly Lys Lys Val
 355 360 365
 Thr Gly His Ile Leu Val Ser Leu Phe Gly Asn Lys Gly Asn Ser Lys
 370 375 380
 Gln Tyr Glu Ile Phe Lys Gly Thr Leu Lys Pro Asp Ser Thr His Ser
 385 390 395 400
 Asn Glu Phe Asp Ser Asp Val Asp Val Gly Asp Leu Gln Met Val Lys
 405 410 415
 Phe Ile Trp Tyr Asn Asn Val Ile Asn Pro Thr Leu Pro Arg Val Gly
 420 425 430
 Ala Ser Lys Ile Ile Val Glu Thr Asn Val Gly Lys Gln Phe Asn Phe
 435 440 445
 Cys Ser Pro Glu Thr Val Arg Glu Glu Val Leu Leu Thr Leu Thr Pro
 450 455 460
 Cys
 465

(2) Informácia pre SEQ ID NO: 16:

(i) Charakteristiky sekvencie:

(A) Dĺžka: 17 aminokyselín

5 (B) Typ: aminokyselina

(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: peptid

10 (v) Typ fragmentu: vnútorný

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID NO: 16:

```
Gly Pro Glu Gly Arg Leu Glu Asp Lys Leu His Lys Pro Lys Ala Thr
1           5           10           15
Cys
```

15

(2) Informácia pre SEQ ID NO: 17:

(i) Charakteristiky sekvencie:

(A) Dĺžka: 13 párov báz

20 (B) Typ: nukleová kyselina

(C) Reťazec: jednoduchý

(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina

25 (A) Opis: /opis = „Oligonukleotid“

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID NO: 17:

```
TTTTTTTTTTT TGA 13
```

30

(2) Informácia pre SEQ ID NO: 18:

(i) Charakteristiky sekvencie:

(A) Dĺžka: 10 párov báz

35 (B) Typ: nukleová kyselina

(C) Reťazec: jednoduchý

(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina

40 (A) Opis: /opis = „Oligonukleotid“

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID NO: 18:

```
GATCAATCGC 10
```

45

(2) Informácia pre SEQ ID NO: 19:

(i) Charakteristiky sekvencie:

(A) Dĺžka: 23 párov báz

50 (B) Typ: nukleová kyselina

(C) Reťazec: jednoduchý

(D) Topológia: lineárna

- (ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina
(A) Opis: /opis = „Oligonukleotid“

5 (xi) Opis sekvencie: SEQ ID NO: 19:

TAGGACATGC ACAGTGTAACTG

23

(2) Informácia pre SEQ ID NO: 20:

- 10 (i) Charakteristiky sekvencie:
(A) Dĺžka: 20 párov báz
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Reťazec: jednoduchý
(D) Topológia: lineárna

- 15 (ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina
(A) Opis: /opis = „Oligonukleotid“

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID NO: 20:

20 **GATTGTGCTG GCCACTTCTC**

20

(2) Informácia pre SEQ ID NO: 21:

- 25 (i) Charakteristiky sekvencie:
(A) Dĺžka: 19 párov báz
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Reťazec: jednoduchý
(D) Topológia: lineárna

- 30 (ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina
(A) Opis: /opis = „Oligonukleotid“

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID NO: 21:

35 **GACACTCCAG GGACTGAAG**

19

(2) Informácia pre SEQ ID NO: 22:

- 40 (i) Charakteristiky sekvencie:
(A) Dĺžka: 48 párov báz
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Reťazec: jednoduchý
(D) Topológia: lineárna

- 45 (ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina
(A) Opis: /opis = „Oligonukleotid“

(ix) Vlastnosti:

- 50 (A) Meno/kľúč: modifikovaná báza
(B) Umiestnenie: 36
(D) Iné informácie /mod_báza = i

(ix) Vlastnosti:

- 55 (A) Meno/kľúč: modifikovaná báza
(B) Umiestnenie: 37

(D) Iné informácie /mod_báza = i

(ix) Vlastnosti:

(A) Meno/kľúč: modifikovaná báza

5 (B) Umiestnenie: 41

(D) Iné informácie /mod_báza = i

(ix) Vlastnosti:

(A) Meno/kľúč: modifikovaná báza

10 (B) Umiestnenie: 42

(D) Iné informácie /mod_báza = i

(ix) Vlastnosti:

(A) Meno/kľúč: modifikovaná báza

15 (B) Umiestnenie: 46

(D) Iné informácie /mod_báza = i

(ix) Vlastnosti:

(A) Meno/kľúč: modifikovaná báza

20 (B) Umiestnenie: 47

(D) Iné informácie /mod_báza = i

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID NO: 22:

CUACUACUAC UAGGCCACGC GTCGACTAGT ACGGGNNGGG NNGGGNNG

48

(2) Informácia pre SEQ ID NO: 23:

(i) Charakteristiky sekvencie:

(A) Dĺžka: 28 párov báz

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Reťazec: jednoduchý

(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina

(A) Opis: /opis = „Oligonukleotid“

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID NO: 23:

CACACACAGG CCACGCGTCG ACTAGTAC

28

(2) Informácia pre SEQ ID NO: 24:

(i) Charakteristiky sekvencie:

(A) Dĺžka: 24 párov báz

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Reťazec: jednoduchý

(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina

(A) Opis: /opis = „Oligonukleotid“

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID NO: 24:

ACCACCATGG AGAGCAAAGC CCTG

24

(2) Informácia pre SEQ ID NO: 25:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- 5 (A) Dĺžka: 25 párov báz
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Reťazec: jednoduchý
(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina

- 10 (A) Opis: /opis = „Oligonukleotid“

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID NO: 25:

CCAGTTTCAG CCTGACTTCT TATTC

25

15

(2) Informácia pre SEQ ID NO: 26:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- 20 (A) Dĺžka: 21 párov báz
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Reťazec: jednoduchý
(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina

- 25 (A) Opis: /opis = „Oligonukleotid“

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID NO: 26:

GGCTGTGGAC TCAACGATGT C

21

30

(2) Informácia pre SEQ ID NO: 27:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- 35 (A) Dĺžka: 22 párov báz
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Reťazec: jednoduchý
(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina

- 40 (A) Opis: /opis = „Oligonukleotid“

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID NO: 27:

CCGGGTGGGT AGGTACATTT TG

22

45

(2) Informácia pre SEQ ID NO: 28:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- 50 (A) Dĺžka: 25 párov báz
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Reťazec: jednoduchý
(D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina

- (A) Opis: /opis = „Oligonukleotid“

55 (xi) Opis sekvencie: SEQ ID NO: 28:

GGGGGTGACT TCCAGCCAGG CTGTG

25

(2) Informácia pre SEQ ID NO: 29:

5 (i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) Dĺžka: 25 párov báz
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Reťazec: jednoduchý
- (D) Topológia: lineárna

10

(ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina

- (A) Opis: /opis = „Oligonukleotid“

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID NO: 29:

15

AACTCTGAAA GGCATGCCCTG CCCGG

25

(2) Informácia pre SEQ ID NO: 30:

20 (i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) Dĺžka: 26 párov báz
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Reťazec: jednoduchý
- (D) Topológia: lineárna

25

(ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina

- (A) Opis: /opis = „Oligonukleotid“

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID NO: 30:

30

TGAAGGTCGG AGTCAACGGA TTTGGT

26

(2) Informácia pre SEQ ID NO: 31:

35 (i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) Dĺžka: 24 párov báz
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Reťazec: jednoduchý
- (D) Topológia: lineárna

40

(ii) Typ molekuly: iná nukleová kyselina

- (A) Opis: /opis = „Oligonukleotid“

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID NO: 31:

45

CATGTGGGCC ATGAGGTCCA CCAC

24

PATENTOVÉ NÁROKY

50

1. Izolovaný polypeptid kódovaný génom podobným génu pre lipázu, kde uvedený polypeptid:

- a) sa viaže na heparín,
- b) má homológiu s ľudskou lipoproteínovou lipázou a pečeneňovou lipázou, a

c) obsahuje 39 kD katalytickú doménu triacylglycerol-lipázovej rodiny,
a kde:

- (i) tento izolovaný polypeptid obsahuje aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 8 a zdanlivú molekulovú hmotnosť približne 55 kD na 10 % SDS-PAGE gélu, aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 8 a zdanlivú molekulovú hmotnosť približne 68 kD na 10 % SDS-PAGE gélu alebo aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 6 a zdanlivú molekulovú hmotnosť približne 40 kD na 10 % SDS-PAGE gélu; alebo
- (ii) 39 kD katalytickú doménu obsahujúcu aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 10; alebo
- (iii) je tento izolovaný polypeptid králičieho pôvodu a obsahuje aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 12;
2. Izolovaný polypeptid podľa nároku 1, kde polypeptid má aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 8 a molekulovú hmotnosť približne 55 kD na 10 % SDS-PAGE gélu.
3. Izolovaný polypeptid podľa nároku 1, kde polypeptid má aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 8 a molekulovú hmotnosť približne 68 kD na 10 % SDS-PAGE gélu.
4. Izolovaný polypeptid podľa nárokov 1 až 3, kde polypeptid má aktivitu fosfolipázy A.
5. Izolovaný polypeptid podľa nároku 1, kde polypeptid má aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 6 a zdanlivú molekulovú hmotnosť približne 40 kD na 10 % SDS-PAGE gélu.
6. Izolovaný polypeptid podľa nároku 1, kde polypeptid je ľudského pôvodu.
7. Izolovaný polypeptid podľa nároku 1, kde 39 kD katalytická doména obsahuje aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 10.
8. Prostriedok majúci fosfolipázovú účinnosť, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje polypeptid podľa nárokov 1 až 3 a biologicky kompatibilný roztok.
9. Farmaceutický prostriedok, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje polypeptid podľa nárokov 1 až 6 a farmaceuticky prijateľný nosič.
10. Antigénny fragment izolovaného polypeptidu podľa nárokov 1 až 6 obsahujúci SEQ ID NO: 16.
11. Izolovaná nukleová kyselina kódujúca polypeptid podľa nárokov 1 až 6.
12. Izolovaná nukleová kyselina podľa nároku 11, ktorou je cDNA.
13. Izolovaná nukleová kyselina podľa nároku 12, ktorej nukleotidová sekvencia je vybratá zo skupiny zahrnujúcej SEQ ID NO: 5, 7 a 9.
14. Izolovaná nukleová kyselina podľa nároku 13 obsahujúca nukleotidy 252 až 1754 SEQ ID NO: 7.
15. Izolovaná nukleová kyselina, ktorá hybridizuje za vysoko stringentných podmienok na nukleovú kyselinu, ktorá má sekvenciu vybratú zo skupiny zahrnujúcej SEQ ID NO: 3, 5 a 7.
16. Izolovaná nukleová kyselina podľa nároku 15, ktorá obsahuje 20 po sebe idúcich nukleotidov.
17. Izolovaná nukleová kyselina podľa nároku 15, ktorou je antisense nukleová kyselina.
18. Izolovaná nukleová kyselina podľa nároku 17, kde sekvencia antisense nukleovej kyseliny je operatívne naviazaná na regulačný región na génovú expresiu.
19. Izolovaná nukleová kyselina podľa nároku 15, ktorá hybridizuje za vysoko stringentných podmienok na cieľovú sekvenciu vybranú zo skupiny zahrnujúcej nukleotidy 44 až 79 SEQ ID NO: 3 a nukleotidy 1036 až 1065 SEQ ID NO: 5.
20. Biologicky aktívny prostriedok, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje nukleovú kyselinu podľa nároku 17 a biologicky kompatibilný roztok.
21. Farmaceutický prostriedok, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje nukleovú kyselinu podľa nároku 17 a farmaceuticky prijateľný nosič.
22. Vektor obsahujúci izolovanú nukleovú kyselinu podľa nárokov 11 až 14 operatívne naviazanú na regulačný región.
23. Vektor podľa nároku 22, kde regulačný región je z heterológneho zdroja.
24. Vektor podľa nároku 22 alebo 23, ktorým je vírusový vektor.
25. Vektor podľa nároku 24, ktorým je adenovírusový vektor.
26. Rekombinantná hostiteľská bunka obsahujúca vektor podľa nárokov 22 až 25.
27. Rekombinantná hostiteľská bunka podľa nároku 26, kde bunka je eukaryotická bunka.
28. Rekombinantná hostiteľská bunka podľa nároku 27, kde touto bunkou je COS-7 bunka.
29. Prostriedok využiteľný na transfekáciu cieľovej bunky, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje vektor podľa nárokov 22 až 25 a biologicky kompatibilný roztok.
30. Farmaceutický prostriedok, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje vektor podľa nárokov 22 až 25 a farmaceuticky prijateľný nosič.
31. Spôsob výroby polypeptidu, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že zahrnuje kultiváciu rekombinantných buniek podľa nárokov 26 až 28 za podmienok umožňujúcich expresiu polypeptidu.
32. Polypeptid pripravený spôsobom podľa nároku 31.
33. Protilátka schopná špecifickej väzby na polypeptid podľa nárokov 1 až 6 alebo 32.
34. Protilátka schopná špecifickej väzby na polypeptid podľa nároku 4 a neutralizujúcu fosfolipázovú aktivitu polypeptidu.

35. Protilátka podľa nárokov 33 alebo 34, ktorou je monoklonálna protilátka.

36. Protilátka podľa nárokov 33 alebo 34, ktorou je polyklonálna protilátka.

37. Hybridómna bunka, ktorá produkuje protilátku podľa nároku 35.

5 38. Prostriedok poskytujúci naviazanie polypeptidu podľa nároku 1 na protilátku, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje protilátku podľa nárokov 33 až 36 a biologicky kompatibilný roztok.

39. Farmaceutický prostriedok, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje protilátku podľa nárokov 33 až 36 a farmaceuticky prijateľný nosič.

40. Spôsob *in vitro* skríningu aktivity agonistov alebo antagonistov enzymatickej aktivity polypeptidu kódovaného génom podobným génu pre lipázu, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že zahŕňa:

10 a) kontaktovanie potenciálnych agonistov alebo antagonistov génu podobnému génu pre lipázu a substrátu génu podobnému génu pre lipázu, a

b) meranie schopnosti potenciálnych agonistov alebo antagonistov potenciovat' alebo inhibovať aktivitu génu podobnému génu pre lipázu, kde gén podobný génu pre lipázu je polypeptid podľa nároku 1.

15 41. Spôsob *in vitro* enzymatickej hydrolýzy fosfatidylcholínesteru, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že zahŕňa kontaktovanie uvedeného fosfatidylcholínesteru s polypeptidom podľa nárokov 1 až 4.

42. Použitie polypeptidu podľa nárokov 1 až 6 na výrobu liečiva na zlepšenie sérového lipidového profilu u ľudí a iných živočíchov, ktorí majú nežiaduci lipidový profil.

43. Použitie protilátky podľa nárokov 33 až 36 na výrobu liečiva na zlepšenie sérového lipidového profilu u ľudí a iných živočíchov majúcich nežiaduci lipidový profil.

20 44. Izolovaný polypeptid podľa nároku 1, ktorý je králičieho pôvodu a obsahuje aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 12.

45. Izolovaná nukleová kyselina kódujúca polypeptid podľa nároku 44.

46. Nukleová kyselina podľa nároku 45, ktorá má nukleotidovú sekvenciu SEQ ID NO: 11.

25 47. Transgénna myš exprimujúca polypeptid podľa nárokov 1 až 4.

20 výkresov

Obr. 1

- A. „downstream“ primér 7 na diferenciálne zobrazenie : (SEQ ID NO:17)
5'TTTTTTTTTTTTGA3'
- B. „upstream“ primér 15 na diferenciálne zobrazenie : (SEQ ID NO:18)
5'GATCAATCGC3'
- C. 5'RACE Primér 2a: (SEQ ID NO: 19)
5'TAGGACATGCACAGTGTAATCTG3'
- D. 5'RACE Primér 3a: (SEQ ID NO: 20)
5'GATTGTGCTGGCCACTTCTC3'
- E. 5'RACE Primér 4a: (SEQ ID NO: 21)
5'GACACTCCAGGGACTGAAG3'
- F. 5'RACE kotviaci primér (SEQ ID NO:22)
5'CUACUACUACUAGGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIIGGGIIIGGGIIIG3'
- G. 5'RACE univerzálny amplifikačný primér (SEQ ID NO:23)
5'CUACUACUACUAGGCCACGCGTCGACTAGTAC3'
- H. 5'LPL Primér: (SEQ ID NO: 24)
5' ACCACCATGGAGAGCAAAGCCCTG3'
- štart kodón ľudskej kódujúcej sekvencie pre LPL je podčiarknutý
- I. 3'LPL Primér: (SEQ ID NO: 25)
5' CCAGTTTCAGCCTGACTTCTTATTC3'
- komplement k terminačnému kodónu kódujúcej sekvencie pre LPL je podčiarknutý
- J. Primér DLIP774: (SEQ ID NO: 26)
5'GGCTGTGGACTCAACGATGTC3'
- K. Primér LLGgen2a: (SEQ ID NO: 27)
5'CCGGGTGGGTAGGTACATTTTG3'
- L. Hllg-gsp1 primér: 5' GGG GGT GAC TTC CAG CCA GGC TGT G 3'
(nukleotidy 772-796 na obr.4, SEQ ID NO: 28)
Hllg-gsp2a primér: 5' AAC TCT GAA AGG CAT GCC TGC CCG G 3'
(reverzný komplement k nukleotidom 1053-1077 na obr. 4, SEQ ID NO: 29)
G3PDH 5' primér: 5' TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT 3'
(SEQ ID NO: 30)
G3PDH 3' primér: 5' CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC 3'
(SEQ ID NO: 31)

2/20

GAATTCCGGCTTGATCAATCGGCTTCAAAAGGGGATCTGTCTGAGCTGCCGCAAGAACCCTTGT
AATAGCATTGGCTACAAATGCCAAGAAAATGAGGAACAAGAGGAACAGCAAAATGTACCTAAA
AACCCGGCAGGCATGCCTTTCAGAGGTAACTTCAGTCCCTGGAGTGTCCCTTGAAGGAAGGCC
CTTAAATACCTCCTTCITTAATACCATGCTGCAGAGCAGGGCACATCCTAGCCCCAGGAGAAAGTGG
CCAGCACAAATCCAATCAATCGTTGCAAAATCAGATTACACTGTGCAATGTCTCTAGGAAAGGGAA
TCTTTACAAATAAAACAGTGTGGACCCCTCAAAAAAAAAGCCGAAATTC

Obr. 2

GAATTCGGCTTCTACTACTAGGCCACGGCTCGCCTAGTACGGGGGGGGGGGGGTCA
GCGAGTCCTTGGCTCCCGGGCTCAGGACGAGGGCAGATCTCGTTCTGGGGCAAGCCGTTGA
CACTCGCTCCCTGCCACCGCCGGCTCCGTCCGCCAAGTTTTCATTTCACCTTCTCTGC
CTCCAGTCCCCAGCCCCCTGGCCGAGAGAAGGGTCTTACCGGCCGGGATTGCTGGAAACACC
AAGAGGTGGTTTGTGTTTAAACTTCGTCTTGGGAGGGGTGTGGCGGGCAGGATGA
GCAACTCCGTTCCCTCTGTCTGTGAGCCTCTGCTATTGCTTGTCTGCGGGAGCCCCGT
ACCTTTTGGTCCAGAGGACGGCTGGAAGATAAGCTCCACAAACCCAAAGCTACACAGACTG
AGGTCAAACCATCTGTGAGGTTTAACTCCGCACTCCAAAGGACCCAGAGCATGAAGGATGCT
ACCTCTCCGTCCGCCACAGCCAGCCCTTAGAAGACTGCAGTTTCAACATGACAGCTAAAACCT
TTTTCATCATTCACGGATGGACGATGAGCGGTATCTTTTGAAACTGGCTGCACAAACTCGTGT
AGCCCTGCACACAAGAGAGAAAGACGCCAATGTAGTTGTGTGTTGACTGGCTCCCCCTGGCCC
ACCAAGCTTTACACGGATGCGGTCAATAATACCAGGGTGGTGGGACACAGCATTTGCCAGGATGC
TCGACTGGCTGCAGGAGAGGACGATTTTCTCTCGGGAATGTCCACTTGTATCGGCTACAGCC
TCGGAGCGCACGTGGCCGGGTATGCAGGCAACTTCGTGAAGGAACGGTGGGCCGGAATCACA
GGTTTGGATCCCTGCCGGGCCCATGTTTGAAGGGGCCGACATCCACAAAGAGGCTCTCTCCGGAC
GATGCAGATTTTGTGGATGTCTCCACAACCTACACGGCTTCTTCGGCTTGAGCATTTGGTATT
AGATGCCCTGTGGCCACATTGACATCTAACCACAAATGGGGTGACTTCCAGCCAGGCTGTGGAC
TCAACGATGTCTTGGATCAATTGCATATGGAACAATCACAGAGGTGGTAAATGTGAGCATG
AGCGAGCCGTCCACCTCTTGTGTGACTCTCTGGTGAATCAGGACAAAGCCGAGTTTTCCTTCC
AGTGCACTGACTCCAATCGCTTCAAAAGGGGATCTGTCTGAGCTGCCGCAAGAACCGTTGTGA
ATAGCATTTGGCTACAATGCCAAGAAATGAGGAACAAGAGGAACAGCAAAATGTACCTAAAA
ACCCGGGCAGGCATGCCCTTTCAGAGGTAACCTTCAGTCCCTGGAGTGTCAAGCCGAATTC

GAATTCCGGGCCCGCTCGACGGCGGCTCAGGACGAGGGCAGATCTCGTTCTGGGGCAAGCCG
 TTGACACTCGCTCCCTGCCACCGCCCGGCTCCGTGCCGCCAAGTTTTTCATTTTCCACCTTCT
 CTGCCTCCAGTCCCCCAGCCCTGGCCGAGAGAAGGGTCTTACCGGCCGGGATTGCTGGAAA
 CACCAAGAGGTGGTTTTTGTCTTTTAACTTCTGTTTCTTGGGAGGGGGTGTGGCGGGCAGG
ATGAGCAACTCCGTTCTCTGCTCTGTTTCTGGAGCCTCTGCTATTGCTTTGCTGCGGGGAGCC
 CCGTACCTTTTGGTCCAGAGGGACGGCTGGAAAGATAAGCTCCACAAACCCAAAGCTACACAG
 ACTGAGGTCAAACCATCTGTGAGGTTTAACTCCGACCTCCAAGGACCCAGAGCATGAAGG
 ATGCTACCTCTCGTCCGCCACAGCCAGCCCTTAGAAGACTGCAGTTTCAACATGACAGCTAA
 AACCTTTTTTCATCATTACGGATGGACGATGAGCGGTATCTTTGAAAACTGGCTGCACAACT
 CGTGTACGCCCTGCACACAAGAGAGAAAGACGCCAATGTAGTTGTGGTTGACTGGCTCCCCCT
 GGCCCAACAGCTTTACACGGATGCGGTCAATAATACCAGGGTGGTGGGACACAGCATTGCCA
 GGATGCTCGACTGGCTGCAGGAGAAGGACGATTTTCTCTCGGGAATGTCCACTTGATCGGCT
 ACAGCCTCGGAGCGCACGTGGCCGGGTATGCAGGCAACTTCGTGAAAGGAACGGTGGGCCGA
 ATCACAGTTTGGATCCTGCGGGGCCATGTTTGAAGGGGCCGACATCCACAAGAGGCTCTCT
 CCGGACGATGCAGATTTTGTGGATGTCTCCACCTACACGCGTTCCTTCGGCTTGAGCATT
 GGTATTCAGATGCCTGTGGGCCACATTGACATCTACCCCAATGGGGGTGACTTCCAGCCAGGC
 TGTGGACTCAACGATGTCTTGGGATCAATTGCATATGGAACAATCACAGAGGTGTTAAATGT
 GAGCATGAGCGAGCCGTCACCTCTTTGTGATCTCTGTTGAATCAGGACAAGCCGAGTTTT
 GCCTTCCAGTGCACTGACTCCAATCGCTTCAAAAAGGGGATCTGTCTGAGCTGCCGCAAGAAC
 CGTTGTAATAGCATTGGCTACAATGCCAAGAAAATGAGGAACAAGAGGAACAGCAAAATGTA
 CCTAAAAACCCGGGCAGGCATGCCTTTCAGAGTTTACCATTATCAGATGAAAAATCCATGTCTT
 CAGTTACAAGAACATGGGAGAAAATTGAGCCACCTTTTACGTCACCTTTTATGGCACTAATGC
 AGATTCCAGACTCTGCCACTGGAAATAGTGGAGCGGATCGAGCAGAATGCCACCAACA
 CCTTCCTGGTCTACACCGAGGAGGACTTGGGAGACCTCTTGAAGATCCAGCTCACCTGGGAGG
 GGGCTCTCAGTCTTGGTACAACCTGTGGAAGGAGTTTCGCAGCTACCTGTCTCAACCCCGCA
 ACCCCGGACGGGAGCTGAATATCAGGCGCATCCGGGTGAAGTCTGGGGAACCCAGCGGAAA
 CTGACATTTGTACAGAAGACCTGAGAACACCAGCATATCCCCAGGCCGGGAGCTCTGGTTT
 CGCAAGTGTGCGGATGGCTGGAGGATGAAAAACGAAACCAAGTCCCACTGTGGAGCTTCCC
TTGAGGGTGCCCGGGCAAGTCTTGCCAGCAAGGCAGCAAGACTTCCTGCTATCCAAGCCCATG
 GAGGAAAGTTACTGCTGAGGACCCACCCAATGGAAGGATTCTTCTCAGCCTTGACCCTGGAGC
 ACTGGGAACAACCTGGTCTCCTGTGATGGCTGGGACTCCTCGCGGGAGGGGACTGCGCTGCTAT
 AGCTCTTGCTGCCTCTCTTGAATAGCTCTAACTCCAAACCTCTGTCCACACCTCCAGAGCA
 CCAAGTCCAGATTTGTGTGTAAGCAGCTGGGTGCCTGGGGCCTCTCGTGCACTGGATTGGT
 TTCTCAGTTGCTGGGCGAGCCTGTACTCTGCCTGACGAGGAACGCTGGCTCCGAAGAGGCCCT
 GTGTAGAAGGCTGTGAGCTGCTCAGCCTGCTTTGAGCCTCAGTGAGAAGTCTTCCGACAGGA
 GCTGACTCATGTGAGGATGGCAGGCCTGGTATCTTGCTCGGGCCCTGGCTGTTGGGGTTCTCAT
 GGGTTGCACTGACCATACTGCTTACGTCTTAGCCATTCCGTCCTGCTCCCCAGCTCACTCTCTG
 AAGCACACATCATTTGGCTTTCTATTTTTCTGTTTCATTTTTAATTGAGCAAATGTCTATTGAAC
 ACTTAAAATTAAATAGAATGTGGTAATGGACATATTACTGAGCCTCTCCATTTGGAACCCAGTG
 GAGTTGGGATTTCTAGACCTCTTTCTGTTTGGATGGTGTATGTGTATATGCATGGGGAAGGC
 ACCTGGGGCCTGGGGGAGGCTATAGGATATAAGCAGTCCGACGCGGCCGGAATTC

MSNSVPLJCFWSLCYCFAAGSPVPFGPEGRLEDKLGHPKATQTEVKPSVRFNLRTSKDPHEGCY
LSVGHSQPLEDCSFNMTAKTFFIHHGWTMSGIFENWLHKLVSALHTREK DANVVVDWLPLAHQL
YTDAVNNTRVVGHSIARMLDWLQEKDDFSLGNVHLIGYSLGAHVAGYAGNFVKGTVGRITGLDP
AGPMFEGADIIHKRLSPDDADFVDVLHTYTRSFGLSIGIQMPVGHIDIYPNGGDFQPGCGLNDVLGSI
AYGTTTEVVKCEHERAVHLLFVDSL VNQDKPSFAFQCTDSNRFFKKGICLSCRKNRCNSIGYNAKKM
RNKRNSKMYLKTRAGMPFVYHYQMKIIVFSYKNMGEIEPTFYVTL YGTNADSQTLPLEIVERIE
QNA TNITFLVYTEEDLGDLLKIQLTWEGASQSWYNLWKEFRSYLSQPRNPGRELNIRIRVKSGETQ
RKLTFC TEDPENTSPGRELWFRKCRD GWRMKNETSPTVELP

Obr . 5

Obv. 6A

Обр. 6В

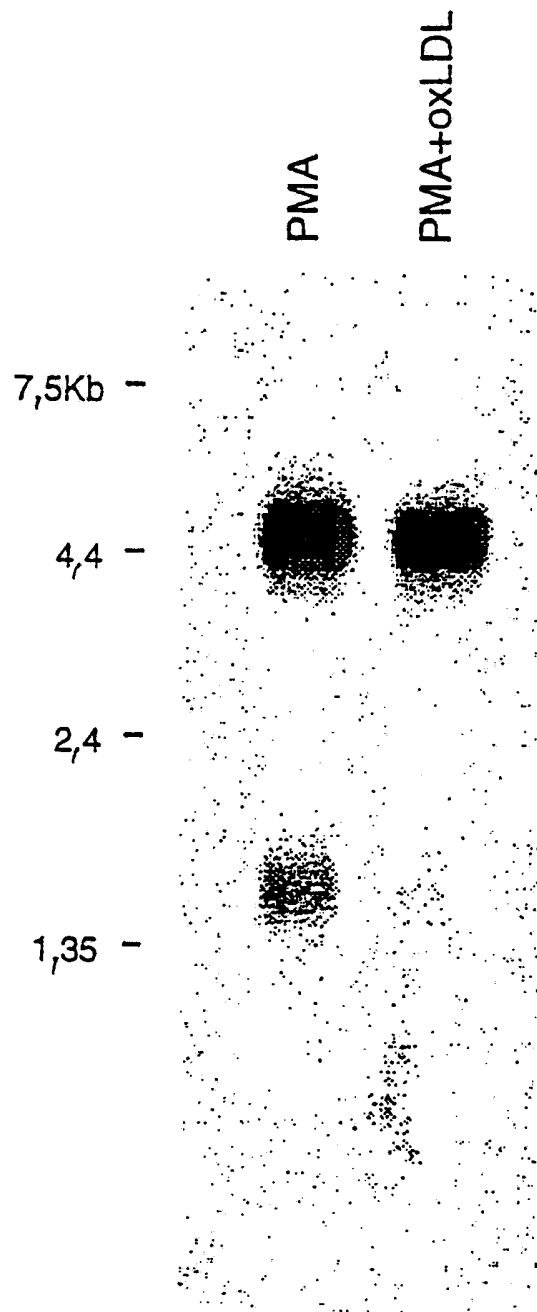
8/20

Q C S D S N R F K K G L C L S C R K N R C N S L G Y N A K K M R N K R N S - - - - -
 300 310 320 330
 296 Q C T D S N R F K K G I C L S C R K N R C N S I G Y N A K K M R N K R N S - - - - - LLG ORF
 296 Q C T D S N R F K K G I C L S C R K N R C N S I G Y N A K K M R N K R N S - - - - - LLGXL ORF
 290 R C S S K E A F E K G L C L S C R K N R C N S I G Y N A K K M R N K R N S - - - - - LPL
 301 P C G D M N S F S Q G L C L S C K K G R C N T L G Y H V R Q E P R S K S K - - - - - HL
 302 C A S Y N V F T A N K C F P C P S G G C P Q M G H Y A D R Y P G K - T N D V G Q P L
 K M Y L K T R A G M P F K V Y H Y Q V K I H F S G X K X E G H I X X T F X V S L
 340 350 360 370
 333 K M Y L K T R A G M P F R G N L Q S L E C P
 333 K M Y L K T R A G M P F R V Y H Y Q M K I H V F S Y K N M G E I E P T F Y V T L LLG ORF
 327 K M Y L K T R S Q M P Y K V E H Y Q V K I H F S G T E S E T H T N Q A F E I S L LLGXL ORF
 338 R L F L V T R A Q S P F K V Y H Y Q L K I Q F F I N - Q T E T P I Q T T F T M S L HL
 341 K F Y L D T G D A S N F A R R Y K V S V T L S G K K V T G H I - - - - - L V S L PL
 Y G T K A X S Q X I P I T L X E X I X X N K T Y S F L I Y T D V D I G D L L M I
 380 390 400 410
 354 Y G T N A D S Q T L P L E I V E R I E Q N A T N T F L V Y T E E D L G D L L K I LLG ORF
 373 Y G T V A E S E N I P F T L P E - V S T N K T Y S F L I Y T E V D I G E L L M L LLGXL ORF
 367 L G T K E K M Q K I P I T L G K G I A S N K T Y S F L I T L D V D I G E L L M I LPL
 377 F G N K G N S K Q Y E I - F K G T L K P D S T H S N E F D S D V D V G D L Q M V PL
 K L K W E X X S - - W Y N X W X X X X S X I X - - - X P R X P G - - L V I X X I
 420 430 440
 354 Q L T W E G A S Q S W Y N L W K E F R S Y L S - - - Q P R N P G R E L N I R R I LLG ORF
 413 K L K W K S D S - - - Y F S W S D W W S - - - - - S P G - - F A I Q K I LLGXL ORF
 406 K L K W E N S A - V W A N V W D T V Q T I I P W S T G P R H S G - - - L V L K T I LPL
 417 K F I W - - - - - Y N N V I N P T L P R V G A S K I I V E T - - - HL
 416 K F I W - - - - - Y N N V I N P T L P R V G A S K I I V E T - - - PL

Obr. 6C

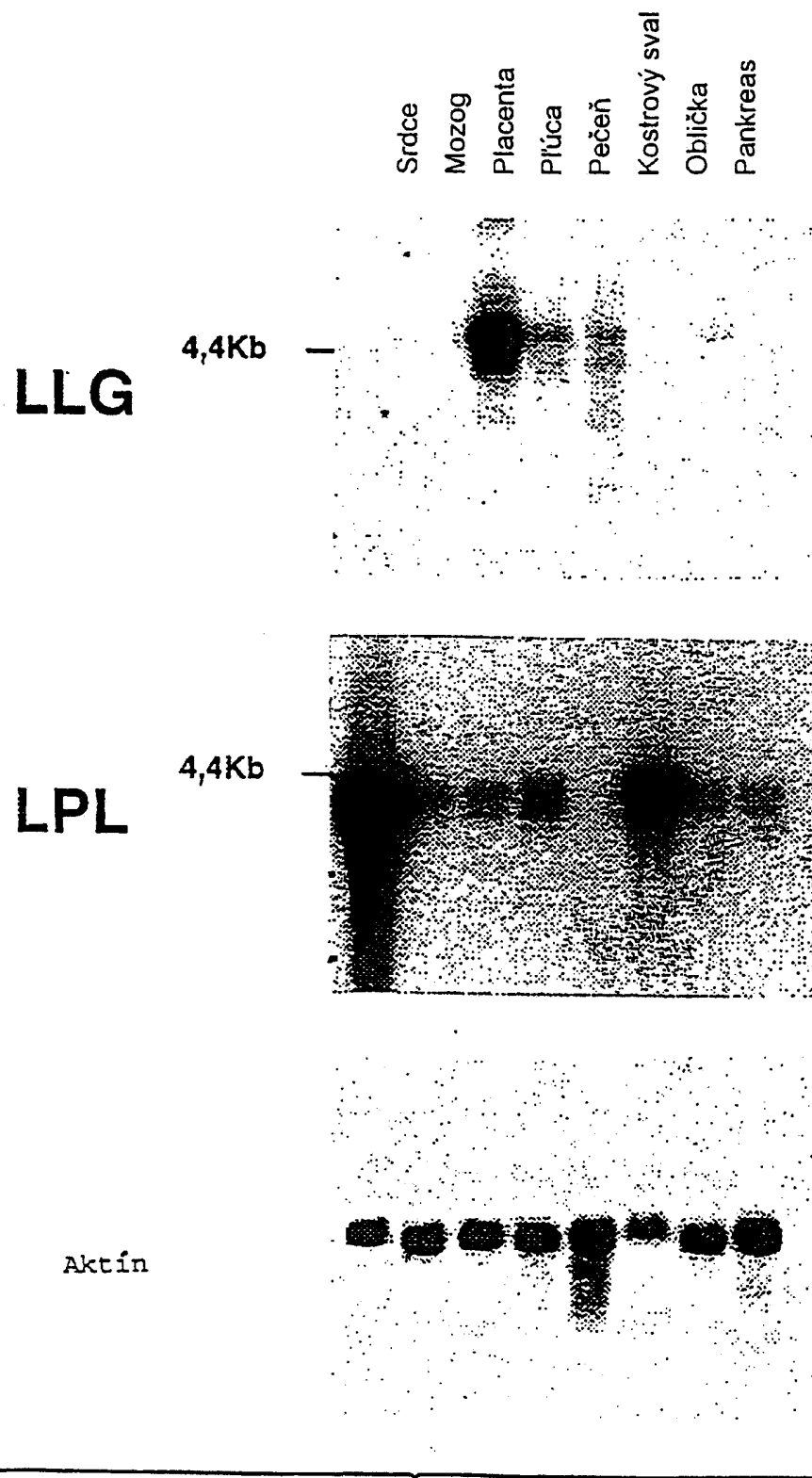
Zobrazenie č.1: V rámčeku sú zvyšky, ktoré presne zodpovedajú LLGXL ORF

10/20



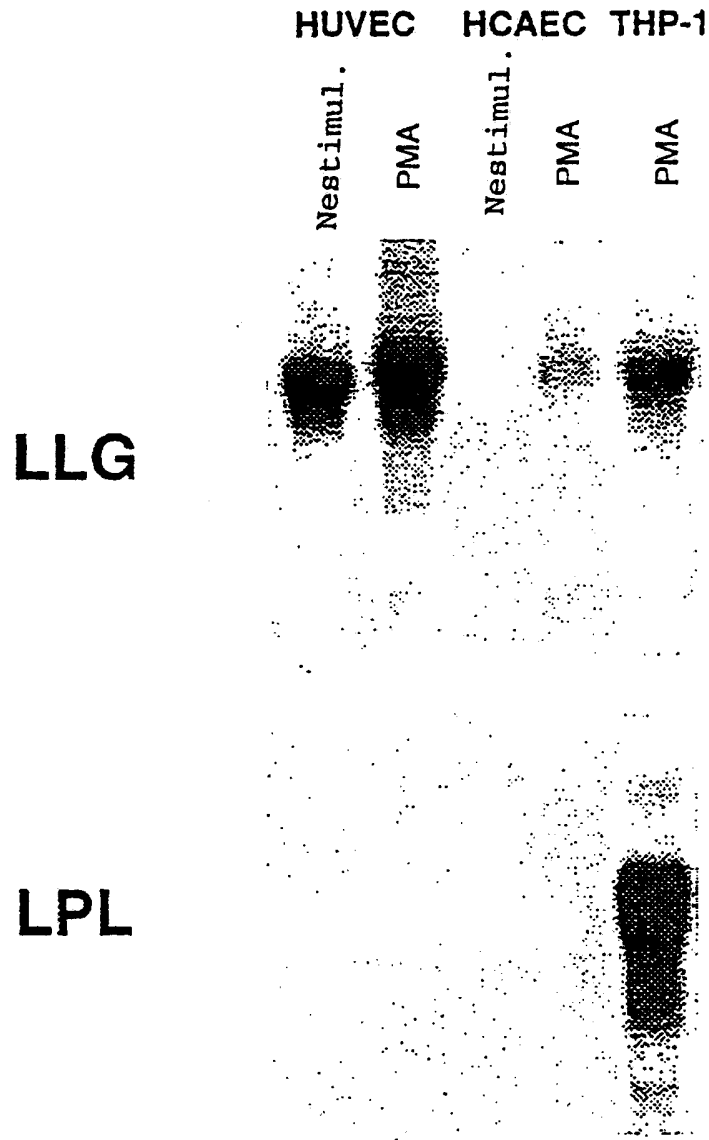
Obr. 7

11/20



Obr. 8

12/20

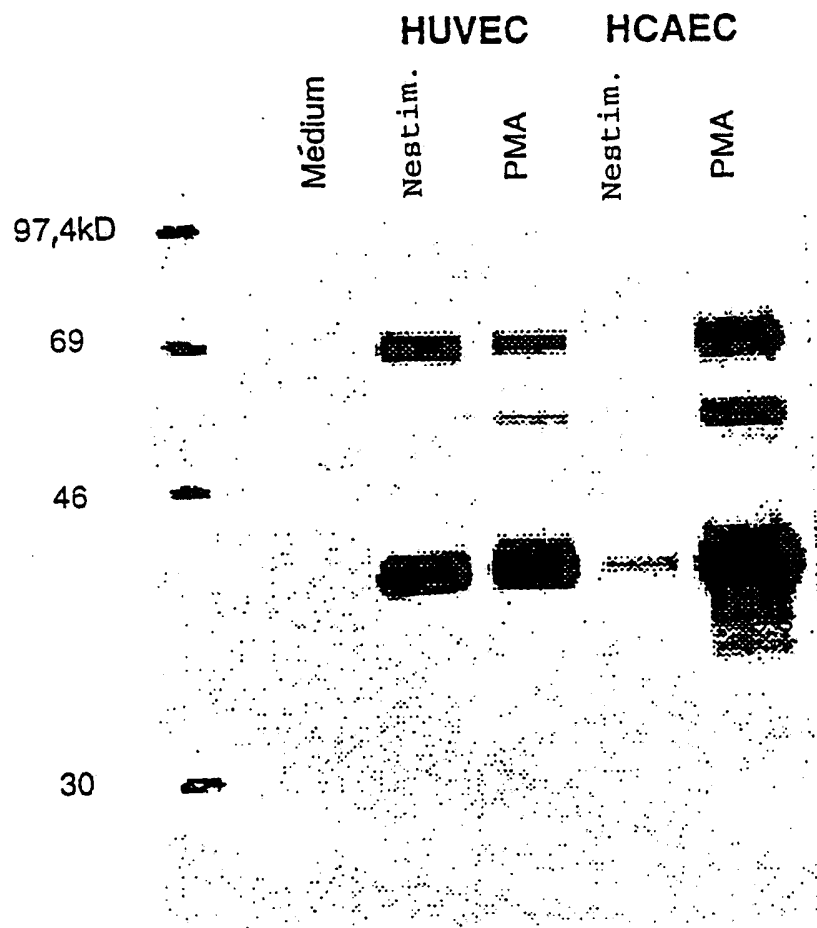


Obr. 9

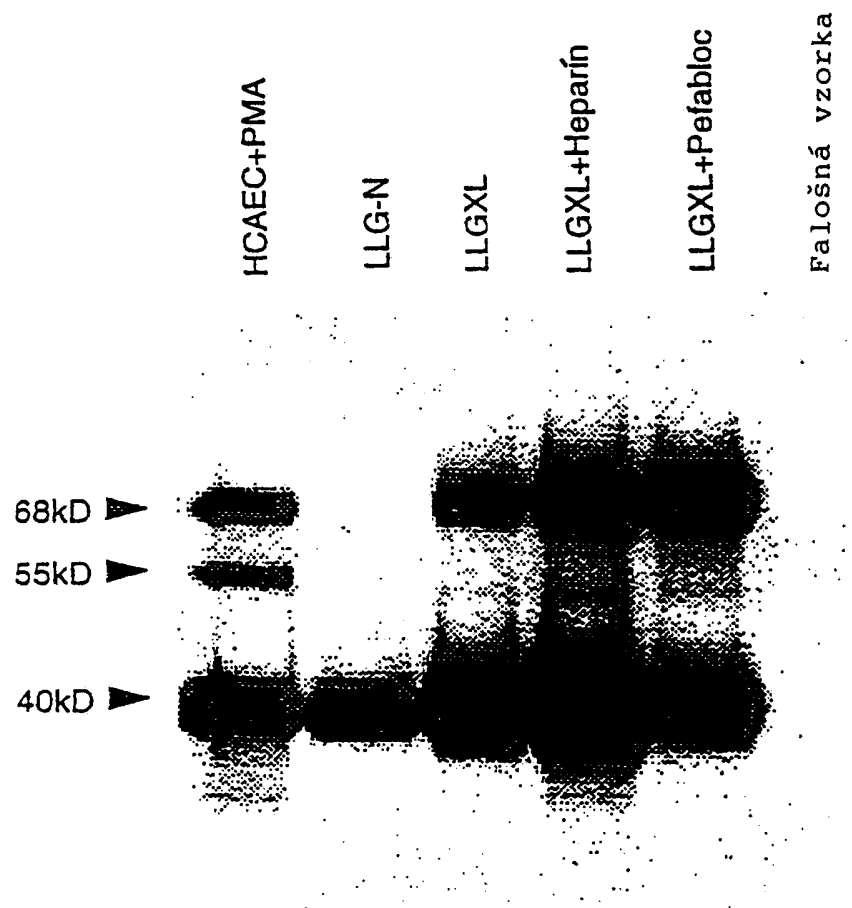
GPEGRLEDKLIHKPKATC

MSNSVPLLCFWSLCYCFAAGSPVPFGPEGRLEDKLIHKPKATQTEVKPSVRFNLRRTSKDPEHEGCYL
SVGHSQPLEDCSFNMTAKTFFIIHGW/TMSGIFENWLHKLVSALHTREK DANVVVDWLPLAHQLY
TDAVNNTRVVGHSIARMLDWLQEKDDFSLGNVHLIGYSLGAHVAGYAGNFVKGTVGRITGLDPA
GPMFEGADIIHKRLSPDDADFVDVLHTYTRSFGLSIGIQMPVGHIDIYPNNGGDFQPGCGLNDVLGSIA
YGTITEVVKCEHERA VHLFVDSL VNQDKPSFAFQCTDSNRFKKGICLSCKRNCNSIGYNACKMR
NKRNSKMYLKTRAGMPFRVYHYQMKIHVFSYKNMGEIPTFYVTL YGTNADSQTLPLEIVERIEQ
NATNTFLVYTEEDLGDLLKIQLTWEGASQSWYNLWKEFRSYLSQPRNPGRELNIRRIRVKSGETQR
KLTFCTEDPENTSPGRELWFRKCRDGWRMKNETSPTVELP

Obr. 10



Obr. 11

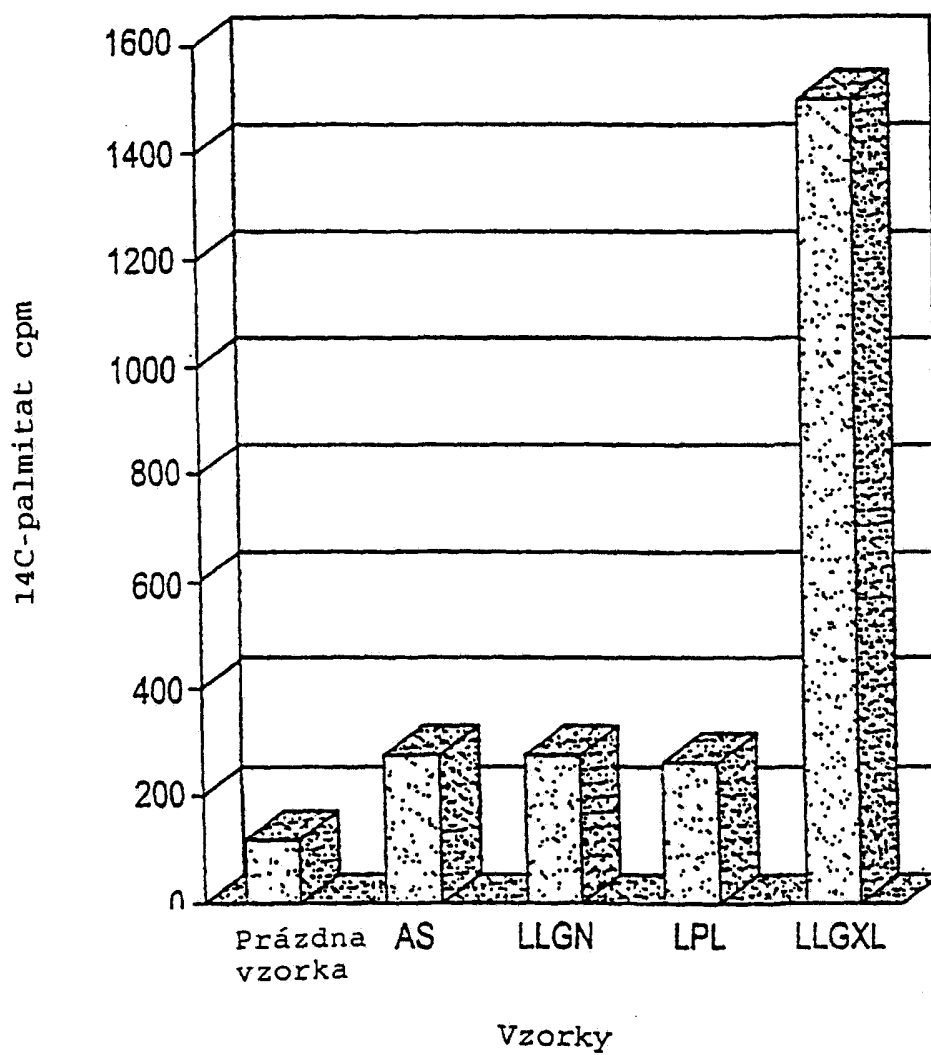


Obr. 12

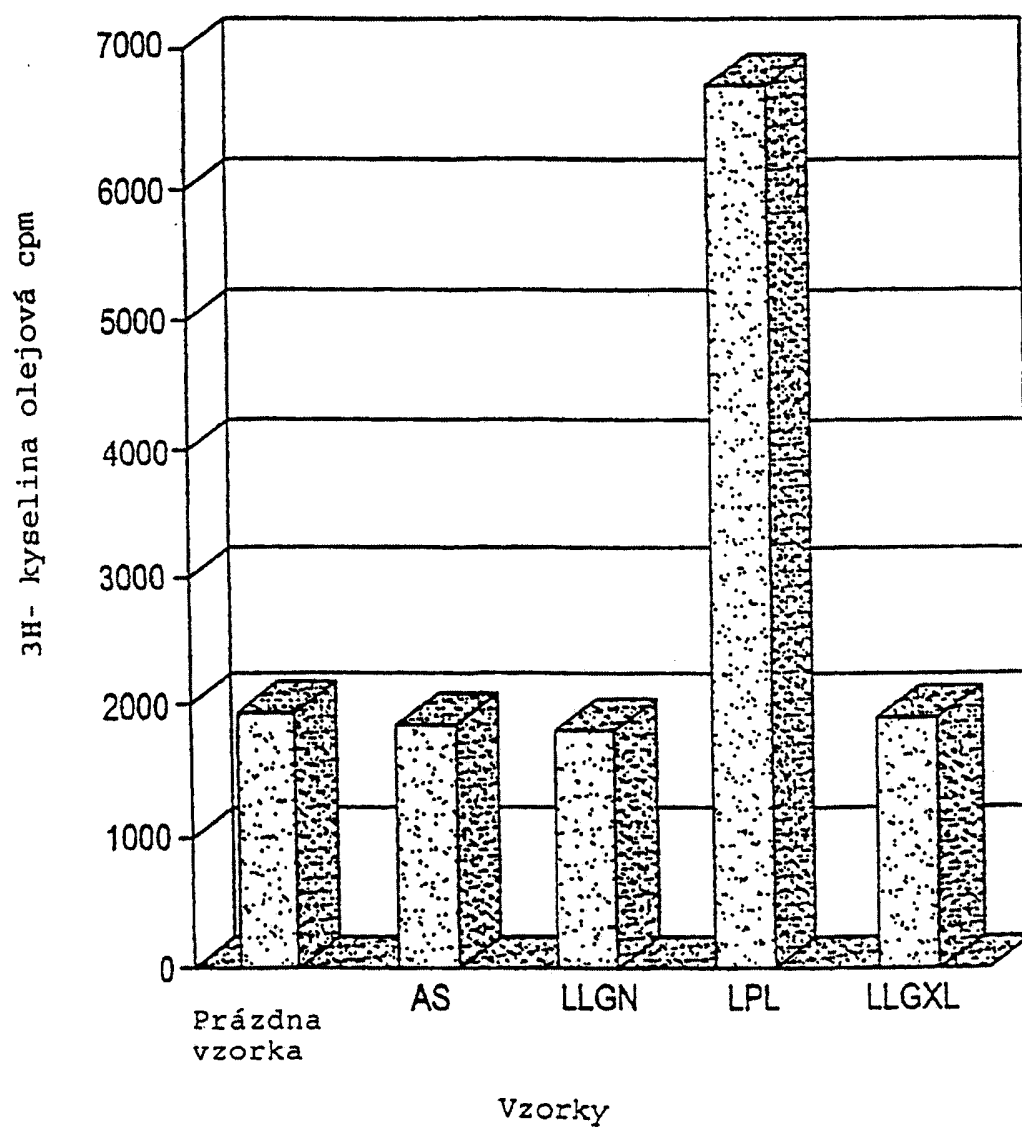
		10	20	30	40	
1		T T G G G A T C A A T T G C A T A T G G A A C A A T C A C A G A G G T G G T A A				LLG7742A.SEQ
1		C T G G G A T C C A T C G C C T A T G G C A C G A T C G C G A G G T G G T G A				RLG.SEQ
		50	60	70	80	
41		A A T G T G A G C A T G A G C C G A G C C C G T C C A C C T C T T T G T T G A C T C				LLG7742A.SEQ
41		A G T G C G A G C A T G A G C C G G G C A T C T C T T T G T T G A C T C				RLG.SEQ
		90	100	110	120	
81		T C T G G T G A A T C A G G A C A A G C C C G A G T T T T G C C T T C C A G T G C				LLG7742A.SEQ
81		C C T G G T G A A C C A G G A C A A G C C C G A G C T T T T G C C T T C C A G T G C				RLG.SEQ
		130	140	150	160	
121		A C T G A C T C C C A A T C C G C T T C A A A A A A G G G A T C T G T C T G A G C T				LLG7742A.SEQ
121		A C A G A C T C C C A A C C G C T T C A A A A A A G G G A T C T G T C T C A G C T				RLG.SEQ
		170	180	190	200	
161		G C C G C A A G A A C C G T T G T A A T A G C A T T G G C T A C A A T G C C A A				LLG7742A.SEQ
161		G C C G G A A G A A C C C G C T G T A A C G G C A T C G G C T A C A A T G C T A A				RLG.SEQ
		210	220			
201		G A A A A T G A G G A A C A A G A G G A A C A G C				LLG7742A.SEQ
201		G A A G A C G A G G A A T A A G A G G A A C A C C				RLG.SEQ

Zobrazenie č. 1: V rámciku sú zvyšky, ktoré presne zodpovedajú
LLG7742A.SEQ.

Obr. 14

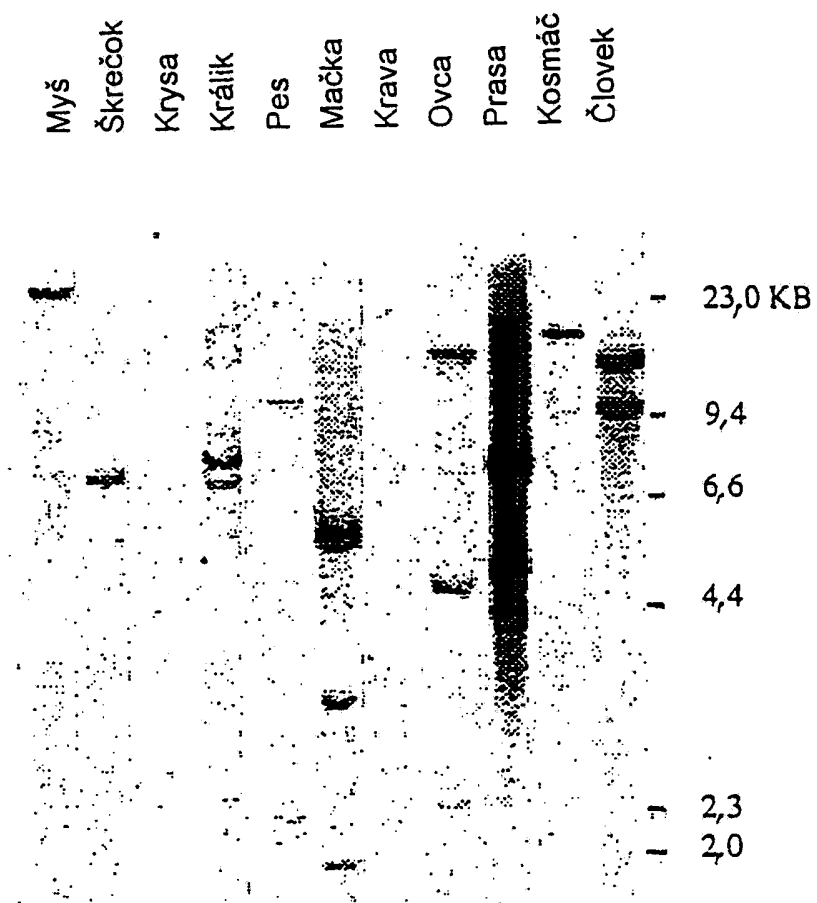


Obr. 15

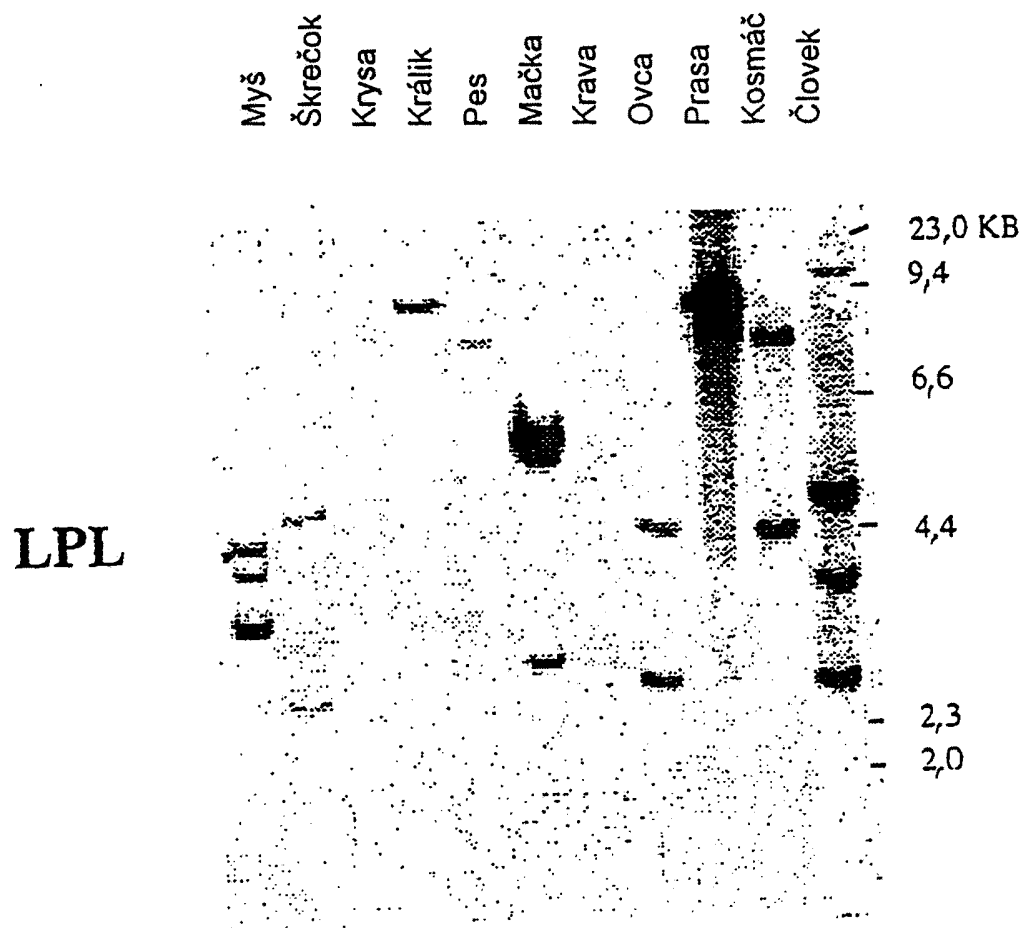


19/20

LLG



Obr. 16A



Obr. 16B