



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 157 847** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) МПК⁷ **C 12 N 15/55, 9/20, 15/81**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 97117367/13, 12.03.1996
(24) Дата начала действия патента: 12.03.1996
(30) Приоритет: 24.05.1995 SE 95 01 939-4
(46) Дата публикации: 20.10.2000
(56) Ссылки: RU 2060275 C1, 20.05.1996. RU 94046360 A1, 10.06.1997. EP 0443063 A1, 28.08.1991. DE 4111321 A1, 17.10.1991. US 5200183, 06.04.1993. US 5306636, 26.04.1994.
(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 23.10.1997
(86) Заявка РСТ: SE 96/00318 (12.03.1996)
(87) Публикация РСТ: WO 96/37622 (28.11.1996)
(98) Адрес для переписки: 129010, Москва, ул. Большая Спасская 25, стр.3, ООО "Городисский и Партнеры", Лебедевой Н.Г.

(71) Заявитель:
АСТРА АКТИЕБОЛАГ (пабл) (SE)
(72) Изобретатель: Гоутам Дас (IN)
(73) Патентообладатель:
АСТРА АКТИЕБОЛАГ (пабл) (SE)

(54) **МОЛЕКУЛА ДНК ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ, СТИМУЛИРУЕМОЙ СОЛЯМИ ЖЕЛЧИ ЛИПАЗЫ (BSSL)**

(57)
Изобретение относится к молекулам ДНК, рекомбинантным векторам и клеточным культурам, предназначенным для использования в способах экспрессии стимулируемой солями желчи липазы (BSSL) в метилтрофных дрожжах *Pichia pastoris*. Молекула ДНК содержит область кодирования полипептида, представляющего собой человеческую BSSL или ее биологический активный вариант с аминокислотной последовательностью, представленной в описании. К 5'-окончанию указанной области присоединен участок, кодирующий сигнальный пептид, способный управлять секрецией указанного полипептида из клеток

Pichia pastoris, трансформированных указанной молекулой ДНК, с аминокислотной последовательностью, представленной в описании, а также оперативно связанный с указанными кодирующими областями метанооксидазный промотор *Pichia pastoris* или функционально эквивалентный промотор. Описаны плазмидные векторы pARC 5771, pARC 5799, pARC 5797. Полипептид получают культивированием клеток-хозяев, трансформированных указанными плазмидами, с выделением его из культуральной среды. Изобретение позволяет увеличить выход целевого продукта по сравнению с известными способами. 5 с. и 3 з.п. ф-лы, 1 табл.



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 157 847** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **C 12 N 15/55, 9/20, 15/81**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 97117367/13, 12.03.1996

(24) Effective date for property rights: 12.03.1996

(30) Priority: 24.05.1995 SE 95 01 939-4

(46) Date of publication: 20.10.2000

(85) Commencement of national phase: 23.10.1997

(86) PCT application:
SE 96/00318 (12.03.1996)

(87) PCT publication:
WO 96/37622 (28.11.1996)

(98) Mail address:
129010, Moskva, ul. Bol'shaja Spasskaja 25,
str.3, OOO "Gorodisskij i Partnery", Lebedevoj N.G.

(71) Applicant:

ASTRA AKTIEBOLAG (publ) (SE)

(72) Inventor: Goutam Das (IN)

(73) Proprietor:

ASTRA AKTIEBOLAG (publ) (SE)

(54) **DNA MOLECULE FOR EXPRESSION OF BILE SALT-STIMULATED LIPASE**

(57) Abstract:

FIELD: molecular biology, genetic engineering. SUBSTANCE: invention relates to DNA molecules, recombinant vectors and cellular cultures used for expression of lipase stimulated by bile salts in methyltrophic yeast, *Pichia pastoris*. DNA molecule has region encoding polypeptide that presents human lipase stimulated by bile salts or its biologically active variant with amino acid sequence given in the invention description. Site is bound to 5'-terminating region encoding signal peptide that is able to operate the

secretion of indicated polypeptide from *Pichia pastoris* cells transformed with indicated DNA molecule with amino acid sequence given in the invention description and methanol oxidizing promoter of *Pichia pastoris* operative-associated with encoding regions or functionally equivalent promoter. Invention describes plasmid vectors pARC 5771, pARC 5799, pARC 5797. Polypeptide is prepared by culturing host-cells transformed with indicated plasmids and its isolation from cultural medium. EFFECT: increased yield of end product as compared with known methods. 8 cl, 1 tbl, 5 ex

Изобретение относится к молекулам ДНК, рекомбинантным векторам и клеточным культурам, предназначенным для использования в способах экспрессии стимулируемой солями желчи липазы (BSSL) в мителотрофных дрожжах *Pichia pastoris*.

Считается, что стимулируемая солями желчи липаза (BSSL; EC 3.1.1.1) (см. ссылку на работу Wang и Hartsuck, 1993) ответственна за основную часть липолитической активности человеческого молока. Отличительный признак такой липазы состоит в том, что необходимо наличие первичных солей желчи для обеспечения ее активности в отношении эмульгированных длинных цепей триацилглицеринов. BSSL к настоящему времени была обнаружена только в молоке людей, горилл, кошек и собак (Hernell с сотр., 1989).

BSSL приписывается решающая роль в процессе переваривания молочных липидов в кишечнике детей, кормящихся грудью (Fredrikzon с сотр., 1978). BSSL синтезируется в организме женщин в период лактации молочных желез и секретируется с молоком (Bläckberg с сотр., 1987). Считается, что она обеспечивает примерно 1% общего количества молочного белка (Bläckberg & Hernell, 1981).

Предполагается, что BSSL является основным лимитирующим скорость фактором в абсорбции жира и последующем росте, особенно в возрасте полового созревания, у детей с дефицитом собственного продуцирования BSSL и что добавка в рацион питания упомянутых выше детей рецептур, содержащих очищенный энзим, существенно улучшает пищеварение и способствует росту детей (US 4944944; Медицинский Исследовательский Фонд Оклахомы). Этот факт является весьма важным в клинической практике в области составления детских рецептур, содержащих относительно высокое процентное содержание триглицеридов и основанных на молочных белках растительного или нечеловеческого происхождения, так как новорожденные, питающиеся такими рецептурами, не способны переваривать жир в отсутствие добавляемой BSSL.

Структуры кДНК как молочной BSSL, так и карбонового сложного эфира гидролазы поджелудочной железы (СЕН) были охарактеризованы (Baba с сотр., 1991; Hui и Kissel, 1991; Nilsson с сотр., 1991; Reue с сотр., 1991) и был сделан вывод, что молочный энзим и фермент поджелудочной железы являются продуктами одного и того же гена, гена CEL. Последовательность кДНК (SEQ ID N: 1) CEL гена раскрыта в патенте США 5200183 (Медицинский Исследовательский Фонд Оклахомы); WO 91/18293 (Actiebolare Astra); Nilsson с сотр. (1990); а также Baba с сотр. (1991). Выведенная аминокислотная последовательность белка BSSL, включающая сигнальную последовательность из 23 аминокислот, представлена как Последовательность SEQ ID N: 2 в Перечне последовательностей, приведенном в конце описания, тогда как последовательность нативного белка, состоящего из 722 аминокислот, представлена как SEQ ID N: 3.

С-терминальная область белка содержит 16 повторов из 11 аминокислотных остатков

каждый, за которыми следует консервативный участок из 11 аминокислот. Нативный белок имеет высокую степень гликозилирования, и имеются сообщения о широком интервале наблюдаемых молекулярных весов. Вероятно, этот факт может быть объяснен изменением степени гликозилирования (Abouakil с сотр., 1988). N-терминальная половина белка гомологична ацетилхолинэстеразе и некоторым другим эстеразам (Nilsson с сотр., 1990).

Рекомбинантная BSSL может быть продуцирована экспрессией в таком подходящем хозяине, как *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* или клеточные линии млекопитающих. Для масштабирования системы экспрессии BSSL с целью достижения коммерчески приемлемой стоимости производства может рассматриваться применение гетерологических экспрессирующих систем. Как упоминалось выше, человеческая BSSL имеет 16 повторов из 11 аминокислот на С-терминальном конце. Для определения биологической значимости такого участка повторов конструировались различные мутанты человеческой BSSL, у которых частично или полностью отсутствовали участки повтора (Hansson с сотр., 1993). Так, например, вариант BSSL-C (SEQ ID N: 4) имеет делеции от аминокислотных остатков 536-568 и аминокислотных остатков 591-711. Исследования экспрессии с использованием линии клеток млекопитающего C127 и сектора экспрессии на основе вируса коровьей папилломы показали, что различные варианты могут экспрессироваться в активных формах (Hansson с сотр., 1993). Из исследований экспрессии был также сделан вывод, что повторы, обогащенные пролином, в человеческой BSSL не играют существенной роли в каталитической активности или активации BSSL солями желчи. Однако получение BSSL или ее мутантов в экспрессионной системе млекопитающего оказывается слишком дорогостоящим для рутинного терапевтического использования.

Эукариотическая система, например дрожжи, может обеспечить значительные преимущества по сравнению с использованием прокариотических систем в плане получения некоторых полипептидов, кодируемых рекомбинантной ДНК. Так, например, дрожжи обычно могут расти до более высокой плотности клеток, чем бактерии, и могут оказаться способными к гликозилированию экспрессированных полипептидов в том случае, когда такое гликозилирование важно для биологической активности. Однако применение дрожжей разновидности *Saccharomyces cerevisiae* в качестве организма-хозяина часто приводит к плохим уровням экспрессии и плохой секреции рекомбинантного белка (Cregg с сотр., 1987). Максимальные уровни содержания гетерологических белков в *S. cerevisiae* составляют величину порядка 5% от общего количества клеточного белка (Kingsman с сотр., 1985). Дополнительным недостатком применения *Saccharomyces cerevisiae* в качестве хозяина является то, что рекомбинантные белки проявляют тенденцию к сверхгликозилированию, которое может оказывать влияние на активность гликозилированных белков млекопитающих.

Pichia pastoris представляют собой метилотрофные дрожжи, которые способны расти на метаноле в качестве единственного источника углерода и энергии, поскольку для такого микроорганизма характерен высокорегулируемый путь утилизации метанола (Ellis с сотр., 1985). *P. pastoris* также способны подвергаться эффективной технологии ферментации с высокой плотностью клеточной популяции. В связи с этим технология рекомбинантной ДНК и эффективные способы трансформации дрожжей позволили использовать *P. pastoris* в качестве хозяина для экспрессии гетерологического белка в большом количестве с помощью экспрессионной системы на основе метанооксидазного промотора (Cregg с сотр., 1987).

Применение *Pichia pastoris* в качестве хозяина для экспрессии известно из литературы, например, следующих гетерологических белков: фактора некроза человеческих опухолей (EP-A-0263311); пертактиновых антигенов Bordetella (WO 91/15571); поверхностного антигена вируса гепатита В (Cregg с сотр., 1987); человеческого лизоцимного белка (WO 92/04441); апротинина (WO 92/01048). Однако успешная экспрессия гетерологического белка в активной, растворимой и секретированной форме зависит от большого числа факторов, например правильного выбора сигнального пептида, надлежащего конструирования участка слияния между сигнальным пептидом и зрелым белком, условий роста и т.д.

Цель настоящего изобретения состоит в преодолении упомянутых выше недостатков известных систем и разработке способа получения человеческой BSSL, который являлся бы экономически выгодным и давал выходы продукта, сравнимые или превосходящие производительность процесса в других микроорганизмах. Эта цель была достигнута разработкой способов экспрессии BSSL в клетках *Pachia pastoris*.

Таким образом, с помощью настоящего изобретения было показано, что человеческая BSSL и вариантная BSSL-C могут экспрессироваться в активной форме, секретируемой из *P. pastoris*. Нативный сигнальный пептид, а также гетерологический сигнальный пептид, являющийся производным белка инвертазы *S. cerevisiae*, были использованы для транслокации зрелого белка в культуральную среду в активной, надлежащим образом процессированной форме.

В соответствии с первым аспектом изобретение предусматривает ДНК-молекулу, содержащую:

(а) область, кодирующую полипептид, представляющий собой человеческую BSSL или ее биологически активный вариант;

(b) присоединенный к 5'-концу области, кодирующей полипептид, участок, кодирующий сигнальный пептид, способный управлять секрецией указанного полипептида из клеток *Pichia pastoris*, трансформированных с помощью указанной ДНК-молекулы; и

(с) оперативно связанный с кодирующими областями, указанными в (а) и (b), метанооксидазный промотор *Pichia pastoris* или функционально эквивалентный промотор.

Под термином "биологически активный вариант" BSSL понимается полипептид, обладающий BSSL активностью и содержащий часть аминокислотной последовательности, представленной последовательностью SEQ ID N: 3 в Перечне последовательностей (Перечень последовательностей приведен в конце описания). Под термином "полипептид, обладающий BSSL активностью", в настоящем контексте понимается полипептид, обладающий следующими свойствами: (а) пригодностью для орального применения; (b) способностью активироваться специфическими солями желчи; и (с) способностью к действию в качестве неспецифической липазы в содержимом тонкого кишечника, т.е. способностью к гидролизу липидов независимо от их химической структуры и физического состояния (эмульгированного, мицеллярного, растворимого).

Указанный BSSL-вариант может представлять собой, например, вариант, содержащий менее 16 повторяющихся единиц, вследствие чего термин "повторяющаяся единица" понимается как повторяющаяся единица из 11 аминокислот, закодированных нуклеотидной последовательностью, обозначенной как "повторяющаяся единица" в разделе под заголовком "(IX) Отличительный признак" в "Информации для SEQ ID N: 1" в Перечне последовательностей. Главным образом BSSL-вариант может представлять собой вариант BSSL-C, в котором аминокислоты 536-568 и 591-711 подвергнуты делеции (SEQ ID N: 4 в Перечне последовательностей).

Следовательно, ДНК-молекула в соответствии с изобретением предпочтительно представляет собой молекулу ДНК, которая кодирует BSSL (SEQ ID N: 3) или BSSL-C (SEQ ID N: 4).

Однако ДНК-молекулы согласно настоящему изобретению не должны строго ограничиваться молекулами ДНК, кодирующими полипептиды с аминокислотными последовательностями, идентичными SEQ ID N: 3 или 4 в Перечне последовательностей. Наоборот, изобретение охватывает молекулы ДНК, кодирующие полипептиды, несущие такие модификации, как замены, небольшие делеции, инсерции или инверсии, причем такие полипептиды в значительной мере обладают биологическими активностями BSSL. Таким образом, настоящее изобретение включает молекулы ДНК, кодирующие BSSL-варианты, упомянутые выше, а также молекулы ДНК, кодирующие полипептиды, аминокислотные последовательности которых по крайней мере на 90% гомологичны, предпочтительно по крайней мере на 95% гомологичны аминокислотной последовательности, представленной последовательностью SEQ ID N: 3 или 4 в Перечне последовательностей.

Сигнальный пептид, на который ссылались выше, может представлять собой пептид, идентичный или в значительной мере подобный пептиду с аминокислотной последовательностью, представленной как аминокислоты от -20 до -1 в SEQ ID N: 2 в Перечне последовательностей. С другой стороны, это может быть пептид, включающий сигнальный пептид инвертазы *Saccharomyces*

cerevisiae.

В соответствии с другим аспектом изобретение предусматривает вектор, содержащий молекулу ДНК, упомянутую выше. Предпочтительно такой вектор представляет собой способный к репликации вектор экспрессии, который несет и способен управлять экспрессией в клетках вида *Pichia* ДНК-последовательности, кодирующей человеческую BSSL или ее биологически активный вариант. Такой вектор может представлять собой, например, плазмидный вектор pARC 5771 (NCIMB 40721), pARC 5799 (NCIMB 40723) или pARC 5797 (NCIMB 40722).

Согласно еще одному аспекту изобретение предусматривает культуру клеток-хозяев, содержащую клетки вида *Pichia*, трансформированные с помощью упомянутых выше молекулы ДНК или вектора. Предпочтительно клетки-хозяева представляют собой клетки *Pichia pastoris* такого штамма, как PPF-1 или GS115. В качестве указанных клеточных культур могут использоваться, например, культура PPF-1 [pARC 5771] (NCIMB 40721), GS115 [pARC 5799] (NCIMB 40723) или GS115 [pARC 5797] (NCIMB 40722).

В соответствии с еще одним аспектом изобретение предусматривает способ получения полипептида, представляющего собой человеческую BSSL или ее биологически активный вариант, заключающийся в культивировании клеток-хозяев согласно изобретению в условиях, при которых указанный полипептид секретируется в культурную среду, и выделении указанного полипептида из культурной среды.

ПРИМЕР 1: Экспрессия BSSL в *Pichia pastoris* PPF-1.

1.1. Конструкция pARC 0770.

Последовательность кДНК (SEQ ID N: 1), кодирующую BSSL-белок, включающий нативный сигнальный пептид (на который ниже ссылаются, как на NSP), клонировали в pTZ19R (Фармация) в виде фрагмента EcoRI-SacI. Клонирование кДНК NSP-BSSL в *S.cerevisiae* экспрессионный вектор pSCW 231 (полученный от профессора L. Prakash, Рочестерский университет, NY, США), представляющий собой вектор экспрессии дрожжей с низким числом копий, в котором экспрессия осуществляется под контролем конститутивного ADH1 промотора, проводили в две стадии. Вначале кДНК NSP-BSSL клонировали в pYES 2.0 (Инвитроген, США) в виде фрагмента EcoRI-Spbl из pTZ19R-SP-BSSL. Избыточные 89 пар оснований между EcoRI и NcoI в начале кодирующей последовательности сигнального пептида удаляли созданием слияния EcoRI/NcoI (89) и регенерацией EcoRI сайта. Полученный в результате клон pARC 0770 содержал ATG кодон, первоначально закодированный в NcoI сайте, за которым сразу же располагался регенерированный EcoRI сайт в рамках считывания информации с оставшейся NSP-BSSL последовательностью.

1.2. Конструкция pARC 5771 плазмиды.

Для конструирования подходящего экспрессионного вектора для экспрессии BSSL, кДНК фрагмент, кодирующий BSSL белок, совместно с его нативным сигнальным пептидом клонировали с экспрессионным вектором pDM 148 *P.pastoris*. Векторный pDM

148 (полученный от д-ра S. Subramani, UCSD) конструировали следующим образом: расположенную против хода транскрипции нетранслированную область (5'-UTR) и расположенную по ходу транскрипции нетранслированную область (3'-UTR) гена метанооксидазы (MOX1) выделяли методом PCR и помещали тандемно в множественную клонирующую последовательность (MCS) вектора pSK⁺ *E.coli* (полученного от Стратеген, США).

Для надлежащего отбора предполагаемых трансформантов *P.pastoris* ДНК последовательность, кодирующую ген ARG4 *S.cerevisiae* совместно с его собственной промоторной последовательностью,

вставляли между 5'- и 3'-UTR в pSK⁺. Полученная в результате конструкция pDM 148 имела следующие отличительные признаки: в MCS области pSK⁺ клонировали 5'-UTR MOX, геномную последовательность ARG4 *S.cerevisiae* и 3'-UTR MOX. Между 5'-UTR MOX и геномной последовательностью ARG4 располагали серии уникальных рестрикционных сайтов (Sall, ClaI, EcoRI, PstI, SmaI и BamHI) так, что кодирующая последовательность гетерологического белка может клонироваться для экспрессии под контролем MOX промотора в *P.pastoris*. Для облегчения интеграции такого полигенного экспрессирующего кластера в MOX1-локус в хромосоме *P.pastoris* такой экспрессирующий полигенный кластер может быть отщеплен от оставшейся части pSK⁺ вектора путем расщепления рестрикционным энзимом NotI.

5'-UTR MOX1 разновидности *P. pastoris*, клонированная в pDM 148, имела длину около 150 bp, тогда как 3'-UTR MOX1 из *P.pastoris*, клонированная в pDM 148, имела длину около 1000 bp. Для инсерции NSP-BSSL кДНК-последовательности между 5'-UTR MOX1 и ARG4 кодирующей последовательностью *S.cerevisiae* в pDM 148, кДНК-вставку (SP-BSSL) выделяли из pARC 0770 путем расщепления EcoRI и BamHI (фрагмент ДНК размером примерно 2.2 kb) и клонировали между EcoRI и BamHI сайтами в pDM 148.

Полученная в результате конструкция pARG 5771 (NCIMB 40721) содержала 5'-UTR MOX1 *P. pastoris* с последующей NSP-BSSL кодирующей последовательностью, за которой следовала ARG4 генная последовательность *S.cerevisiae* и 3'-UTR MOX1 гена *P.pastoris*, тогда как ДНК сегмент от 5'-UTR MOX1 до 3'-UTR MOX1 клонировали в MCS pSK⁺.

1.3. Трансформация BSSL в *P.pastoris* PPF-1.

Для экспрессии BSSL в *P.pastoris* PPF-1 (his4, arg4; получено от Филлипс Петролеум Ко.) плазмиду pARC 5771 переваривали NotI и всю расщепленную смесь (10 мкг общей ДНК) использовали для трансформации PPF-1. Используемый протокол трансформации был практически таким же, как метод для дрожжевого сферопласта, описанный Cragg с сотр. (1987). Трансформанты регенерировали на минимальной среде с дефицитом аргинина так, чтобы можно было осуществлять селекцию Arg⁺ колоний. Регенерационный верхний агар, содержащий трансформанты, снимали и гомогенизировали в воде и дрожжевые клетки культивировали до образования примерно 250 колоний в расчете

на пластину на минимальных глюкозных пластинах с дефицитом аргинина. Затем мутантные колонии идентифицировали методом реплик на минимальных метанольных пластинах. Примерно 15% от всего числа трансформантов образовывалось в виде Mut^s (медленный рост в метаноле) фенотипа.

1.4. Скрининг трансформантов у экспрессирующих BSSL.

С целью быстрого скрининга большого числа трансформантов на экспрессию липазы был разработан метод анализа липазы на платах. Использовали следующую методику для приготовления таких пластин: к раствору 2% агарозы (конечная концентрация) добавляли 10 x Na-холатный раствор в воде до конечной концентрации 1%. Липидный субстратный трибутиин добавляли в смесь до конечной концентрации 1% (об./об.). Для поддержания роста трансформантов смесь дополняли 0.25% дрожжевого азотистого основания (конечное значение) и 0.5% метанола (конечная концентрация). Ингредиенты тщательно перемешивали и переливали на пластины до толщины 3-5 мм. Сразу после отвердевания смеси трансформанты полосками наносили на пластины и полученные пластины дополнительно инкубировали при +37°C в течение 12 часов. Липаза-продуцирующие клоны демонстрировали прозрачный гало вокруг клон. В типичном эксперименте 7 из 93 трансформантов идентифицировали, как BSSL продуцирующие трансформанты. Два клон (NN 39 и 86), продуцирующие самые крупные гало (ореолы) вокруг полосы колонии, отбирали для дальнейшей характеристики.

1.5. Экспрессия BSSL из PPF-1 [pARC 5771].

Два трансформанта NN 39 и 86, описанные в Разделе 1.4, отбирали и выращивали в BMGY жидкой среде (1% дрожжевого экстракта, 2% бактопептона, 1.34% дрожжевого азотистого основания без аминокислоты, 100 mM KPO₄ буфера, pH 6.0, 400 мкг/л биотина и 2% глицерина) в течение 24 часов при 30°C до достижения культурами значения A₆₀₀, близкого к 40. Культуры осаждали и ресуспендировали в BMMY (2% глицерина, замененного 0.5% метанола в BMGY) среде при A₆₀₀ = 300. Индуцированные культуры инкубировали при 30°C при встряхивании в течение 120 часов. Супернатанты культуры отбирали через различные промежутки времени для анализа на экспрессию BSSL путем осуществления анализа на активность энзима, SDS-PAGE анализа и вестерн-блоттинга.

1.6. Детекция ферментативной активности BSSL в культуральных супернатантах клонов NN 39 и 86.

Для определения ферментативной активности в бесклеточном культуральном супернатанте индуцированных культур NN 39 и 86, как описано в Разделе 1.5, культуры центрифугировали и 2 мл бесклеточного супернатанта анализировали на BSSL-энзимную активность в соответствии со способом, описанным Hernell и Olivecrona (1974). Как показано в таблице, было установлено, что обе культуры содержат BSSL-энзимную активность при

максимальном значении активности на 96 час после индукции.

1.7. Вестерн-блоттинг анализ культуральных супернатантов PPF-1: pARC 5771 трансформантов (NN 39 и 86).

Для определения наличия рекомбинантной BSSL в культуральных супернатантах NN 39 и 86 PPF-1 [pARC 5771] трансформантов, культуры выращивали и индуцировали, как описано в Разделе 1.5. Культуры отбирали через различные промежутки времени после индукции и подвергали Вестерн-блоттинг анализу с использованием анти-BSSL поликлонального антитела. Полученные результаты указывают на присутствие BSSL в культуральном супернатанте в виде полосы в 116 кДа.

ПРИМЕР 2: Экспрессия BSSL в *Pichia pastoris* GS115.

2.1. Конструкция pARC 5799.

Поскольку 5'-MOX UTR и 3'-MOX UTR не выражены надлежащим образом и поскольку в pDM 148 векторе отсутствует какой-либо другой подходящий маркер (например, G418 устойчивый ген) для мониторинга числа копий BSSL, интегрированных в *Pichia* хромосоме, кДНК вставку нативной BSSL совместно с ее сигнальным пептидом клонировали в другой *P. pastoris* экспрессионный вектор, pHIL D4. Интеграционную плазмиду pHIL D4 получали от Филлипс Петролеум Компани. Плазида содержала 5'-MOX1, сегмент алкогольоксидазного промотора размером примерно 1000 bp и уникальный EcoRI - клонирующий сайт. Она также содержала примерно 250 bp 3'-MOX1 участка, содержащего терминационную последовательность алкогольоксидазы после EcoRI-сайта. Район "терминации" сопровождался гистидинолдегидрогеназным геном HIS4 *P.pastoris*, содержащимся на 2.8-kb фрагменте для комплементации дефектного HIS4 гена в хозяине GS115 (см. ниже). 650-bp участок, содержащий 3'-MOX1 ДНК, был слит с 3'-окончанием HIS4 гена, что совместно с 5'-MOX1 участком необходимо для сайт-направленной интеграции. Бактериальный канамицин-устойчивый ген из pUC-4K (PL-Биокэмикал) подвергали инсерции по уникальному NaeI-сайту между HIS4 и 3'-MOX1 участку на 3'-окончании HIS4 гена.

Для клонирования NSP-BSSL-кодирующего фрагмента кДНК по уникальному EcoRI сайту pHIL D4, двухнитевой олиголинкер с положением расщепления BamHI-EcoRI лигировали с BamHI переваренной плазмидой pARC 5771, и полную NSP-BSSL-кодирующую последовательность объединяли в виде EcoRI-фрагмента размером 2.2 kb. Этот фрагмент клонировали в EcoRI-сайт pHIL D4 и правильно ориентированную плазмиду обозначали как pARC 5799 (NCIMB 40723).

2.2. Трансформация pARC 5799.

Для облегчения интеграции NSP-BSSL кодирующей последовательности по геномному локусу MOX1 в *P.pastoris* плазмиду pARC 5799 переваривали BglII и использовали для трансформации *P.pastoris* штамма GS115(his4) (Филлипс Петролеум Компани) в соответствии с протоколом, описанным в Разделе 1.5. Однако в этом случае селекцию проводили на His прототрофность. Трансформанты отбирали

после серийно разбавленного посева регенерированного верхнего агара и непосредственно тестировали анализом культивирования липазы, как описано в Разделе 1.4. Два трансформированных клона (NN 9 и 21) отбирали на основе размера ореола на пластинке для анализа липазы и дополнительно проверяли на экспрессию BSSL. Было установлено, что такие клоны являются Mut⁺.

2.3. Определение BSSL энзимной активности в культуральных супернатантах GS115 [pARC 5799] трансформантов NN 9 и 21.

Два этих трансформированных клона NN 9 и 21 GS115 [pARC 5799] выращивали практически полностью следуя протоколу, описанному в Разделе 1.5. Культуральные супернатанты в различные периоды времени после индукции анализировали на BSSL-энзимную активность в соответствии с описанным в Разделе 1.6. Как показано в таблице, было установлено, что оба культуральных супернатанта содержат BSSL-энзимную активность, причем наивысшая энзимная активность наблюдалась через 72 часа индукции. Оба клона демонстрировали улучшенную экспрессию BSSL по сравнению с клонами PPF-1 [pARC 5771].

2.4. SDS-PAGE и Вестерн-блоттинг анализ культуральных супернатантов GS115 [pARC 5799] трансформантов NN 9 и 21.

Культуральные супернатанты, собранные в различные периоды времени, как описано в Разделе 2.3, подвергали анализу SDS-PAGE и Вестерн-блоттингу. Из SDS-PAGE профиля было оценено, что около 60-75% общего белка, присутствующего в культуральных супернатантах индуцированных культур, представляет собой BSSL. Молекулярный вес такого белка составил величину около 116 кДа. Данные Вестерн-блоттинга также подтвердили, что основная часть белка, присутствующего в культуральном супернатанте, представляет собой BSSL. Такой белок, по-видимому, имеет тот же молекулярный вес, что нативная BSSL.

ПРИМЕР 3: Масштабирование BSSL экспрессии.

3.1. Масштабирование экспрессии BSSL из трансформированного клона GS115 [pARC 5799] (N 21).

Использовали ферментер Б. Брауна емкостью 23 л. Пять литров среды, содержащей 1% YE, 2% Пептона, 1.34 YNB и 4% вес./об. глицерина обрабатывали в автоклаве при 121°C в течение 30 минут и биотин (400 мкг/л, конечная концентрация) добавляли в ходе инокуляции после фильтрационной стерилизации. В качестве прививочного материала глицериновую массу GS115 [pARC 5799] (N 21) инокулировали в синтетическую среду, содержащую YNB (67%) плюс 2% глицерина (150 мл), и выращивание проводили в течение 36 часов при +30°C. Применяли следующие условия ферментации: температура составляла +30 °C; pH 5.0 поддерживали с использованием 3.5 N NH₄OH и 2 N HCl; концентрация растворенного кислорода составляла 20-40% от насыщения воздуха; в качестве противопенного агента использовали полипропиленгликоль 2000.

За ходом роста следили через регулярные

интервалы времени, определяя значение оптической плотности (OD) при длине волны 600 нм. Величина A₆₀₀ достигала максимума, равного 50-60, за 24 часа. К этому моменту протекала фаза периодического роста, о чем свидетельствовали повышенные уровни растворенного кислорода.

Фаза роста сразу сопровождалась фазой индукции. В ходе этой фазы загружали метанол, содержащий 12 мл/л PTM1 солей. Скорость подачи метанола составляла 6 мкл/ч в ходе первых 10-12 часов, после чего скорость постепенно повышали каждые 7-8 часов на 6 мл/ч, до максимального значения 36 мл/ч. Аммиак, используемый для регулирования pH, выполнял функции источника азота. Накопление метанола проверяли каждые 6-8 часов путем зондирования растворенного кислорода, и было установлено, что такая аккумуляция является ограниченной в ходе всей фазы индукции. Значение OD при 600 нм увеличивалось от 50-60 до 150-170 в ходе 86 часов подачи метанола. Дрожжевой экстракт и пептон добавляли каждые 24 часа до получения конечной концентрации 0.25% и 0.5% соответственно.

Образцы отбирали через 24-часовые промежутки времени и анализировали на BSSL-энзимную активность в бесклеточном бульоне. Бульон также подвергали анализу SDS-PAGE и Вестерн-блоттингу.

3.2. Белковый анализ секретированной BSSL из выращенной в ферментере культуры GS115 [pARC 5799] (N 21).

BSSL-энзимная активность в бесклеточном бульоне повышалась от 40-70 мг/л (что эквивалентно для нативного белка) к 24 часу до максимального значения 200-227.0 мг/л (что эквивалентно нативному белку) к концу 86-90 часа. SDS-PAGE анализ бесклеточного бульона показал полосу интенсивного окрашивания Кумасс голубым с мол. вес. порядка 116 кДа. Идентичность такой полосы была подтверждена Вестерн-блоттингом, осуществленным, как описано в Разделе 1.7, для нативного BSSL.

3.3. Очистка рекомбинантной BSSL, секретированной в культуральный супернатант GS115 [pARC 5799] (N 21) клонов.

P. pastoris клон GS115 [pARC 5799] выращивали и индуцировали в ферментере, как описано в Разделе 3.1. Для очистки рекомбинантной BSSL 250 мл культурной среды (индуцированной к 90 часу) центрифугировали с силой 12.000 x g в течение 30 минут для удаления всего мелкозернистого материала. Бесклеточный культуральный супернатант ультрафильтровали в устройстве Амикон с использованием мембраны, отсекающей фракции 10 кДа. Соли и низкомолекулярные белки, а также пептиды культурального супернатанта удаляли повторным разбавлением в ходе фильтрации. Буфер, используемый для такого разбавления, представлял собой 5 mM Барбитола при pH 7.4. После концентрирования культурального супернатанта ретентат доводили до объема 250 мл с использованием 5 mM Барбитола, pH 7.4 и 50 mM NaCl и загружали в Гепарин-Сефарозную колонку (объем слоя 15 мл), которую предварительно уравнивали с помощью того же буфера.

Загрузку образца осуществляли с объемной скоростью 10 мл/ч. После загрузки колонку промывали 5 mM Барбитола, pH 7.4 и 0.1 M NaCl (200 мкл промывного буфера) до тех пор, пока поглощение при длине волны 250 нм не становилось ниже уровня детекции. BSSL элюировали 200 мл Барбитольного буфера (5 mM, pH 7.4) и линейным градиентом NaCl в интервале 0.1 M - 0.7 M. Фракции (2.5 мл) собирали и анализировали на элюированный белок путем мониторинга поглощения при 250 нм. Фракции, содержащие белок, анализировали на BSSL-энзимную активность. Соответствующие фракции анализировали на 8.0% SDS-PAGE для проверки профиля очистки.

3.4. Характеристика очищенной рекомбинантной BSSL, секретируемой в культуральный супернатант GS115 [pARC 5799].

SDS-PAGE и Вестерн-блоттинг анализы фракций (описанных в Разделе 3.3), проявляющих максимальную BSSL-энзимную активность, продемонстрировали, что рекомбинантный белок имеет чистоту примерно 90%. В соответствии с данными SDS-PAGE и Вестерн-блоттинг анализов молекулярный вес очищенного белка имел величину около 116 кДа. При перегрузке образцов для SDS-PAGE анализа полоса, соответствующая низкомолекулярному белку, может быть детектирована окрашиванием красителем Кумасс Брилиантовым голубым, которая не проявляется при Вестерн-блоттинге. Очищенный белок подвергали N-терминальному анализу в автоматизированном белковом секвенаторе. Полученные результаты показали, что белок соответствующим образом процессирован из нативного сигнального пептида и что рекомбинантный белок имеет N-терминальную последовательность A K L G A V Y. Удельная активность очищенного рекомбинантного белка, как было установлено, аналогична активности нативного белка. Сведения о ферментативной активности в культуральных супернатантах трансформантов *Pichia pastoris* приведены в таблице.

ПРИМЕР 4: Экспрессия BSSL-C в *Pichia pastoris* GS115.

4.1. Конструкция pARC 5797.

кДНК кодирующую последовательность для BSSL варианта BSSL-C сливали по ее 5'-окончанию с кодирующей последовательностью сигнального пептида *S.cerevisiae* SUC2 генного продукта (инвертазы), сохраняя целостность открытой рамки считывания, инициированной по первому ATG кодону сигнального пептида инвертазы. Такую слитую генную конструкцию вначале клонировали в *S.cerevisiae* экспрессионный вектор pSCW 231 (pSCW 231 представляет собой вектор экспрессии дрожжей с низким числом копий, и экспрессия осуществляется под контролем конститутивного ADH1 промотора) между свитами EcoRI и BamHI с целью создания экспрессионного вектора pARC 0788.

кДНК слитого гена дополнительно субклонировали в *P.pastoris* экспрессионный вектор pDM 148 (описанный в разделе 1.2) путем высвобождения соответствующего 1.8-kb фрагмента с помощью EcoRI и BamHI переваривания pARC 0788 и субклонирования

фрагмента в pDM 148 переваренную с EcoRI и BamHI. Сконструированный в результате pARC 5790 переваривали с BamHI и двухнитевой олигонуклеотидный линкер физической структуры BamHI-EcoRI-BamHI подвергали лигированию для создания сконструированной pARC 5796, главным образом, для выделения кДНК фрагмента слитого гена, следуя при этом стратегии, описанной в Разделе 2.1.

Наконец, 1.8-kb фрагмент, содержащий систему сигнальный пептид инвертазы/BSSL-C слитый ген, высвобождали из pARC 5796 путем EcoRI переваривания и клонировали в pHIL D4 по EcoRI сайту. В результате соответствующего

рестрикционного анализа был идентифицирован вектор экспрессии, содержащий вставку в надлежащей ориентации, и он был обозначен как pARC 5797 (NCIMB 40722).

4.2. Экспрессия рекомбинантной BSSL-C из *P.pastoris*.

Для экспрессии рекомбинантной BSSL-C из *P.pastoris* *P. pastoris* хозяин GS115 трансформировали с pARC 5797 по способу, описанному в Разделах 1.3 и 2.2. Трансформанты проверяли на продуцирование липазы по способу, описанному в Разделах 1.4 и 2.2. Единственный трансформант (N 3) отбирали на основе высокой липаза-продуцирующей способности с помощью метода детекции при анализе липазных пластин и дополнительно анализировали на продуцирование BSSL-энзимной активности в культуральном супернатанте, следуя, по существу, способу, описанному в разделах 1.6 и 2.3. Как следует из данных, представленных в таблице, культуральный супернатант GS115 [pARC 5797] (N 3) содержал BSSL-энзимную активность, и ее количество прогрессивно увеличивалось вплоть до 72 часа после индукции.

4.3. SDS-PAGE и Вестерн-блоттинг анализы культурального супернатанта GS115 [pARC 5797] трансформанта (N 3).

Культуральный супернатант, собранный в различные периоды времени, как описано в Разделе 4.2, подвергали SDS-PAGE и Вестерн-блоттинг анализам в соответствии с описанным в разделах 1.7 и 2.4. Из SDS-PAGE профиля было установлено, что примерно 75-80% общего количества внеклеточного белка представляет собой BSSL. В соответствии с данными SDS-PAGE анализа молекулярный вес белка составил примерно 66 кДа. При Вестерн-блоттинге было обнаружено, что лишь две полосы (дублет) в области 66 кДа являются иммунореактивными, и эти данные подтверждают экспрессию рекомбинантной BSSL-C.

СПАВНИТЕЛЬНЫЙ ПРИМЕР: Экспрессия BSSL в *S.cerevisiae*.

Были предприняты попытки экспрессии BSSL в *Saccharomyces cerevisiae*. BSSL плохо секретирувалась в *S. cerevisiae*, и нативный сигнальный пептид функционировал неэффективно. Кроме этого, нативный сигнальный пептид не отщеплялся от зрелого белка в *S.cerevisiae*.

Депонирование микроорганизмов.

Следующие плазмиды, трансформированные в *Pichia pastoris*

культуры, были депонированы в соответствии с Будапештским договором в Национальных коллекциях Промышленных и морских бактерий (NCIMB), Абердин, Шотландия, Великобритания. Дата депонирования - 2 мая 1995 г.

Штамм [плазмида] - N по NCIMB

PPF-1[pARC 5771] - 40721

GS115[pARC 5799] - 40723

GS115[pARC 5797] - 40722

Список литературы

Abouakil, N., Rogalska, E., Bonicel, J. and Lombardo, D. (1988) *Biochim. Biophys. Acta.* 961, 299-308.

Baba, T., Downs, D., Jackson, K.W., Tang, J. and Wang, C-S (1991) *Biochemistry* 30, 500-510.

Bläckberg, L. and Hernell, O. (1981) *Eur. J. Biochem.* 116, 221-225.

Bläckberg, L., Ångquist, K.A. and Hernell, O. (1987) *FEBS Lett.* 217, 37-41.

Cregg, J.M. et al. (1987) *Bio/Technology* 5, 479-485.

Ellis, S.B. et al. (1985) *Mol. Cell Biol* 5, 1111-1121.

Fredrikzon, B., Hernell, O., Bläckberg, L. and Olivecrona, T. (1978) *Pediatric Res.* 12, 1048-1052.

Hansson, L., Bläckberg, L., Edlund, M., Lundberg, L., Strömquist, M. and Hernell, O. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 26692-26698.

Hernell, O. and Olivecrona, T. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 369, 234-244.

Hernell, O., Bläckberg, L. and Olivecrona, T. (1989) in: *Textbook of gastroenterology and nutrition in infancy* (Lebenthal, E., ed.) 347-354, Raven Press, NY.

Hernell, O. and Bläckberg, L. (1982) *Pediatric Res.* 16, 882-885.

Hui, D. Y. and Kissel, J. A. (1990) *FEBS Letters* 276, 131-134.

Kingsman, et al. (1985) *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 3, 377-416.

Nilsson, J., Bläckberg, L., Carlsson, P., Enerbäck, S., Hernell, O. and Bjursell, G. (1990) *Eur. J. Biochem.* 192, 543-550.

Reue, K., Zambaux, J., Wong, H., Lee, G., Leete, T.H., Ronk, M., Shively, J. E., Sternby, B., Borgström, B., Ameis, D. and Scholtz, M.C. (1991) *J. Lipid. Res.* 32, 267-276.

Wang, C-S, and Hartsuck, J.A. (1993) *Biochim. Biophys Acta* 1166, 1-19.

Формула изобретения:

1. Молекула ДНК, содержащая: (а) область, кодирующую полипептид, который представляет собой BSSL человека, имеющий аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO : 3, или его биологически активный вариант, в котором: аминокислоты 536-568 и 591-711 могут быть делетированы, как представлено в SEQ ID NO : 4, или по крайней мере одна из повторяющихся единиц из 11 аминокислот, указанная в SEQ ID NO : 1, соответствующая аминокислотам 679-689, 690-700 и 701-711 в SEQ ID NO : 3, делетирована, при том, что указанная аминокислотная последовательность может быть по крайней мере на 95% гомологична последовательности, соответствующей SEQ ID NO : 3 или SEQ ID NO : 4; (b) присоединенный к 5'-окончанию указанной области, кодирующей полипептид, участок, кодирующий сигнальный пептид, который идентичен или в значительной мере подобен пептиду с аминокислотной последовательностью, показанной аминокислотами от -20 до -1 в последовательности SEQ ID NO : 2 в Перечне последовательностей, способный управлять секрецией полипептида из клеток *Pichia pastoris*, трансформированных указанной молекулой ДНК, или указанный сигнальный пептид может содержать сигнальный пептид инвертазы *Saccharomyces cerevisiae*; и (c) операбельно связанный с указанными кодирующими областями, определенными в (a) и (b),

промотор метанолоксидазы *Pichia pastoris* или функционально эквивалентный промотор.

2. Плазмидный вектор pARC 5771 (NCIMB 40721), содержащий молекулу ДНК по п.1.

3. Плазмидный вектор по п.2, трансформированный в штамм PPF-1 (NCIMB 40721) *Pichia pastoris*.

4. Плазмидный вектор pARC 5799 (NCIMB 40723), содержащий молекулу ДНК по п.1.

5. Плазмидный вектор по п.4, трансформированный в штамм GS115 (NCIMB 40723) *Pichia pastoris*.

6. Плазмидный вектор pARC 5797 (NCIMB 40722), содержащий молекулу ДНК по п.1.

7. Плазмидный вектор по п.6, трансформированный в штамм GS115 (NCIMB 40722) *Pichia pastoris*.

8. Способ получения полипептида, представляющего собой BSSL человека или его биологически активный вариант, который заключается в культивировании клеток-хозяев, трансформированных плазмидой, включающей молекулу ДНК по п.1, в условиях, когда указанный полипептид секретируется в культуральную среду, и выделения указанного полипептида из культуральной среды.

55

60

Перечень последовательностей

(1) Общая информация

(i) Заявитель:

- (A) имя: ASTRA AB
- (B) улица: Västra Mäiarehamnen 9
- (C) город: Södertälje
- (D) страна: Швеция
- (F) почтовый код: S - 151 85
- (G) телефон: +46 - 8 - 553 260 00
- (H) телефакс: +46 - 8 - 553 288 20
- (I) телекс: 19237 astra s

(ii) название изобретения: ДНК последовательности для экспрессии полипептидов

(iii) число последовательностей: 4

(iv) Компьютерно - считываемая форма

- (A) Тип носителя: гибкий диск
- (B) Компьютер: IBM PC совместимый
- (C) операционная система: PC-DOS/MS-DOS
- (D) программное обеспечение: Patentin Release
*1.0, Version *1.30 (EPC)

(2) Информация для SEQ ID №: I

(i) Характеристики последовательностей

- (A) длина 2428 пар оснований
- (B) тип: нуклеиновая кислота
- (C) нитевидность: двойная
- (D) топология: линейная

(ii) молекулярный тип: к ДНК - м РНК

(iii) гипотетические признаки: нет

(iv) антисмысловые характеристики: нет

(vi) оригинальный источник:

- (A) Организм: Homo sapiens
- (F) тканевый тип: молочная железа

(ix) отличительный признак:

- (A) имя/ключ: CDS
- (B) местоположение: 82..2319
- (D) другая информация: / продукт= липаза

стимулированная солью желчи

(ix) отличительный признак:

- (A) имя/ключ: эксон
- (B) местоположение: 985..1173

(ix) отличительный признак:

- (A) имя/ключ: эксон
- (B) местоположение: 1174..1377

(ix) отличительный признак:

- (A) имя/ключ: эксон
- (B) местоположение: 1378..1575

- (ix) отличительный признак:
(A) имя/ключ: эксон
(B) местоположение: 1576..2415
- (ix) отличительный признак:
(A) имя/ключ: пептид
(B) местоположение: 151..2316
- (ix) отличительный признак:
(A) имя/ключ: поли A_сигнал
(B) местоположение: 2397..2402
- (ix) отличительный признак:
(A) имя/ключ: повторяющаяся область
(B) местоположение: 1756..2283
- (ix) отличительный признак:
(A) имя/ключ: 5'UTR
(B) местоположение: 1..81
- (ix) отличительный признак:
(A) имя/ключ: повторяющееся звено
(B) местоположение: 1756..1788
- (ix) отличительный признак:
(A) имя/ключ: повторяющееся звено
(B) местоположение: 1789..1821
- (ix) отличительный признак:
(A) имя/ключ: повторяющееся звено
(B) местоположение: 1822..1854
- (ix) отличительный признак:
(A) имя/ключ: повторяющееся звено
(B) местоположение: 1855..1887
- (ix) отличительный признак:
(A) имя/ключ: повторяющееся звено
(B) местоположение: 1888..1920
- (ix) отличительный признак:
(A) имя/ключ: повторяющееся звено
(B) местоположение: 1921..1953
- (ix) отличительный признак:
(A) имя/ключ: повторяющееся звено
(B) местоположение: 1954..1986
- (ix) отличительный признак:
(A) имя/ключ: повторяющееся звено
(B) местоположение: 1987..2019

- (ix) отличительный признак:
 (A) имя/ключ: повторяющееся звено
 (B) местоположение: 2020..2052
- (ix) отличительный признак:
 (A) имя/ключ: повторяющееся звено
 (B) местоположение: 2053..2085
- (ix) отличительный признак:
 (A) имя/ключ: повторяющееся звено
 (B) местоположение: 2086..2118
- (ix) отличительный признак:
 (A) имя/ключ: повторяющееся звено
 (B) местоположение: 2119..2151
- (ix) отличительный признак:
 (A) имя/ключ: повторяющееся звено
 (B) местоположение: 2152..2184
- (ix) отличительный признак:
 (A) имя/ключ: повторяющееся звено
 (B) местоположение: 2185..2217
- (ix) отличительный признак:
 (A) имя/ключ: повторяющееся звено
 (B) местоположение: 2218..2250
- (ix) отличительный признак:
 (A) имя/ключ: повторяющееся звено
 (B) местоположение: 2251..2283
- (x) информация о публикациях

- (A) Авторы: Nilsson, Jeanette, Bläckberg, Lars, Carlsson, Peter, Enerbäck, Sven, Hernell, Olle
- (B) название: кДНК клонирование стимулированной желочной солью липазы человеческого молока и доказательство ее идентичности гидролиза сложного эфира панкреатической карбоновой кислоты
- (C) журнал: Eur. J. Biochem.
- (D) том: 192
- (F) стр.: 543 - 550
- (G) дата: сентябрь 1990

(xi) описание последовательности: SEQ ID № 1:

ACCTTCTGTA TCAGTTAAGT GTCAAGATGG AAGGAACAGC AGTCTCAAGA TAATGCAAAG	60
AGTTTATTCA TCCAGAGGCT G ATG CTC ACC ATG GGG CGC CTG CAA CTG GTT	111
Met Leu Thr Met Gly Arg Leu Gln Leu Val	
-23 -20 -15	
GTG TTG GGC CTC ACC TGC TGC TGG GCA GTG GCG AGT GCC GCG AAG CTG	159
Val Leu Gly Leu Thr Cys Cys Trp Ala Val Ala Ser Ala Ala Lys Leu	
-10 -5 1	
GGC GCC GTG TAC ACA GAA GGT GGG TTC GTG GAA GGC GTC AAT AAG AAG	207
Gly Ala Val Tyr Thr Glu Gly Gly Phe Val Glu Gly Val Asn Lys Lys	
5 10 15	
CTC GGC CTC CTG GGT GAC TCT GTG GAC ATC TTC AAG GGC ATC CCC TTC	255
Leu Gly Leu Leu Gly Asp Ser Val Asp Ile Phe Lys Gly Ile Pro Phe	
20 25 30 35	
GCA GCT CCC ACC AAG GCC CTG GAA AAT CCT CAG CCA CAT CCT GGC TGG	303
Ala Ala Pro Thr Lys Ala Leu Glu Asn Pro Gln Pro His Pro Gly Trp	
40 45 50	
CAA GGG ACC CTG AAG GCC AAG AAC TTC AAG AAG AGA TGC CTG CAG GCC	351
Gln Gly Thr Leu Lys Ala Lys Asn Phe Lys Lys Arg Cys Leu Gln Ala	
55 60 65	
ACC ATC ACC CAG GAC AGC ACC TAC GGG GAT GAA GAC TGC CTG TAC CTC	399
Thr Ile Thr Gln Asp Ser Thr Tyr Gly Asp Glu Asp Cys Leu Tyr Leu	
70 75 80	
AAC ATT TGG GTG CCC CAG GGC AGG AAG CAA GTC TCC CGG GAC CTG CCC	447
Asn Ile Trp Val Pro Gln Gly Arg Lys Gln Val Ser Arg Asp Leu Pro	
85 90 95	
GTT ATG ATC TGG ATC TAT GGA GGC GCC TTC CTC ATG GGG TCC GGC CAT	495
Val Met Ile Trp Ile Tyr Gly Gly Ala Phe Leu Met Gly Ser Gly His	
100 105 110 115	

RU 2 1 5 7 8 4 7 C 2

RU 2 1 5 7 8 4 7 C 2

GGG GCC AAC TTC CTC AAC AAC TAC CTG TAT GAC GGC GAG GAG ATC GCC	543
Gly Ala Asn Phe Leu Asn Asn Tyr Leu Tyr Asp Gly Glu Glu Ile Ala	
120 125 130	
ACA CGC GGA AAC GTC ATC GTG GTC ACC TTC AAC TAC CGT GTC GGC CCC	591
Thr Arg Gly Asn Val Ile Val Val Thr Phe Asn Tyr Arg Val Gly Pro	
135 140 145	
CTT GGG TTC CTC AGC ACT GGG GAC GCC AAT CTG CCA GGT AAC TAT GGC	639
Leu Gly Phe Leu Ser Thr Gly Asp Ala Asn Leu Pro Gly Asn Tyr Gly	
150 155 160	
CTT CGG GAT CAG CAC ATG GCC ATT GCT TGG GTG AAG AGG AAT ATC GCG	687
Leu Arg Asp Gln His Met Ala Ile Ala Trp Val Lys Arg Asn Ile Ala	
165 170 175	
GCC TTC GGG GGG GAC CCC AAC AAC ATC ACG CTC TTC GGG GAG TCT GCT	735
Ala Phe Gly Gly Asp Pro Asn Asn Ile Thr Leu Phe Gly Glu Ser Ala	
180 185 190 195	
GGA GGT GCC AGC GTC TCT CTG CAG ACC CTC TCC CCC TAC AAC AAG GGC	783
Gly Gly Ala Ser Val Ser Leu Gln Thr Leu Ser Pro Tyr Asn Lys Gly	
200 205 210	
CTC ATC CGG CGA GCC ATC AGC CAG AGC GGC GTG GCC CTG AGT CCC TGG	831
Leu Ile Arg Arg Ala Ile Ser Gln Ser Gly Val Ala Leu Ser Pro Trp	
215 220 225	
GTC ATC CAG AAA AAC CCA CTC TTC TGG GCC AAA AAG GTG GCT GAG AAG	879
Val Ile Gln Lys Asn Pro Leu Phe Trp Ala Lys Lys Val Ala Glu Lys	
230 235 240	
GTG GGT TGC CCT GTG GGT GAT GCC GCC AGG ATG GCC CAG TGT CTG AAG	927
Val Gly Cys Pro Val Gly Asp Ala Ala Arg Met Ala Gln Cys Leu Lys	
245 250 255	
GTT ACT GAT CCC CGA GCC CTG ACG CTG GCC TAT AAG GTG CCG CTG GCA	975
Val Thr Asp Pro Arg Ala Leu Thr Leu Ala Tyr Lys Val Pro Leu Ala	
260 265 270 275	
GGC CTG GAG TAC CCC ATG CTG CAC TAT GTG GGC TTC GTC CCT GTC ATT	3
Gly Leu Glu Tyr Pro Met Leu His Tyr Val Gly Phe Val Pro Val Ile	
280 285 290	
GAT GGA GAC TTC ATC CCC GCT GAC CCG ATC AAC CTG TAC GCC AAC GCC	1071
Asp Gly Asp Phe Ile Pro Ala Asp Pro Ile Asn Leu Tyr Ala Asn Ala	
295 300 305	
GCC GAC ATC GAC TAT ATA GCA GGC ACC AAC AAC ATG GAC GGC CAC ATC	1119
Ala Asp Ile Asp Tyr Ile Ala Gly Thr Asn Asn Met Asp Gly His Ile	
310 315 320	
TTC GCC AGC ATC GAC ATG CCT GCC ATC AAC AAG GGC AAC AAG AAA GTC	1167
Phe Ala Ser Ile Asp Met Pro Ala Ile Asn Lys Gly Asn Lys Lys Val	
325 330 335	
ACG GAG GAG GAC TTC TAC AAG CTG GTC AGT GAG TTC ACA ATC ACC AAG	1215
Thr Glu Glu Asp Phe Tyr Lys Leu Val Ser Glu Phe Thr Ile Thr Lys	
340 345 350 355	
GGG CTC AGA GGC GCC AAG ACG ACC TTT GAT GTC TAC ACC GAG TCC TGG	1263
Gly Leu Arg Gly Ala Lys Thr Thr Phe Asp Val Tyr Thr Glu Ser Trp	
360 365 370	
GCC CAG GAC CCA TCC CAG GAG AAT AAG AAG AAG ACT GTG GTG GAC TTT	1311
Ala Gln Asp Pro Ser Gln Glu Asn Lys Lys Lys Thr Val Val Asp Phe	
375 380 385	

RU 2157847 C2

C2 2157847 RU

GAG Glu	ACC Thr	GAT Asp 390	GTC Val	CTC Leu	TTC Phe	CTG Leu	GTG Val 395	CCC Pro	ACC Thr	GAG Glu	ATT Ile	GCC Ala 400	CTA Leu	GCC Ala	CAG Gln	1359
CAC His	AGA Arg 405	GCC Ala	AAT Asn	GCC Ala	AAG Lys	AGT Ser 410	GCC Ala	AAG Lys	ACC Thr	TAC Tyr	GCC Ala 415	TAC Tyr	CTG Leu	TTT Phe	TCC Ser	1407
CAT His 420	CCC Pro	TCT Ser	CGG Arg	ATG Met	CCC Pro 425	GTC Val	TAC Tyr	CCC Pro	AAA Lys	TGG Trp 430	GTG Val	GGG Gly	GCC Ala	GAC Asp	CAT His 435	1455
GCA Ala	GAT Asp	GAC Asp	ATT Ile 440	CAG Gln 440	TAC Tyr	GTT Val	TTC Phe	GGG Gly	AAG Lys 445	CCC Pro	TTC Phe	GCC Ala	ACC Thr	CCC Pro 450	ACG Thr	1503
GGC Gly	TAC Tyr	CGG Arg 455	CCC Pro	CAA Gln	GAC Asp	AGG Arg	ACA Thr 460	GTC Val	TCT Ser	AAG Lys	GCC Ala	ATG Met	ATC Ile 465	GCC Ala	TAC Tyr	1551
TGG Trp	ACC Thr 470	AAC Asn	TTT Phe	GCC Ala	AAA Lys	ACA Thr	GGG Gly 475	GAC Asp	CCC Pro	AAC Asn	ATG Met	GGC Gly 480	GAC Asp	TCG Ser	GCT Ala	1599
GTG Val 485	CCC Pro	ACA Thr	CAC His	TGG Trp	GAA Glu 490	CCC Pro	TAC Tyr	ACT Thr	ACG Thr	GAA Glu	AAC Asn 495	AGC Ser	GGC Gly	TAC Tyr	CTG Leu	1647
GAG Glu 500	ATC Ile	ACC Thr	AAG Lys	AAG Lys	ATG Met 505	GGC Gly	AGC Ser	AGC Ser	TCC Ser	ATG Met 510	AAG Lys	CGG Arg	AGC Ser	CTG Leu	AGA Arg 515	1695
ACC Thr	AAC Asn	TTC Phe	CTG Leu 520	CGC Arg	TAC Tyr	TGG Trp	ACC Thr	CTC Leu	ACC Thr 525	TAT Tyr	CTG Leu	GCG Ala	CTG Leu	CCC Pro 530	ACA Thr	1743
GTG Val	ACC Thr	GAC Asp	CAG Gln 535	GAG Glu	GCC Ala	ACC Thr	CCT Pro	GTG Val 540	CCC Pro	CCC Pro	ACA Thr	GGG Gly	GAC Asp 545	TCC Ser	GAG Glu	1791
GCC Ala	ACT Thr 550	CCC Pro	GTG Val	CCC Pro	CCC Pro	ACG Thr	GGT Gly 555	GAC Asp	TCC Ser	GAG Glu	ACC Thr	GCC Ala 560	CCC Pro	GTG Val	CCG Pro	1839
CCC Pro	ACG Thr 565	GGT Gly	GAC Asp	TCC Ser	GGG Gly	GCC Ala 570	CCC Pro	CCC Pro	GTG Val	CCG Pro	CCC Pro	ACG Thr 575	GGT Gly	GAC Asp	TCC Ser	1887
GGG Gly 580	GCC Ala	CCC Pro	CCC Pro	GTG Val	CCG Pro 585	CCC Pro	ACG Thr	GGT Gly	GAC Asp	TCC Ser 590	GGG Gly	GCC Ala	CCC Pro	CCC Pro	GTG Val 595	1935
CCG Pro	CCC Pro	ACG Thr	GGT Gly	GAC Asp 600	TCC Ser	GGG Gly	GCC Ala	CCC Pro	CCC Pro	GTG Val 605	CCG Pro	CCC Pro	ACG Thr	GGT Gly 610	GAC Asp	1983
TCC Ser	GGG Gly	GCC Ala 615	CCC Pro	CCC Pro	GTG Val	CCG Pro	CCC Pro	ACG Thr 620	GGT Gly	GAC Asp	TCC Ser	GGG Gly 625	GCC Ala	CCC Pro	CCC Pro	2031
GTG Val	CCG Pro 630	CCC Pro	ACG Thr	GGT Gly	GAC Asp	TCC Ser	GGC Gly 635	GCC Ala	CCC Pro	CCC Pro	GTG Val 640	CCG Pro	CCC Pro	ACG Thr	GGT Gly	2079
GAC Asp 645	GCC Ala	GGG Gly	CCC Pro	CCC Pro	CCC Pro	GTG Val 650	CCG Pro	CCC Pro	ACG Thr	GGT Gly	GAC Asp 655	TCC Ser	GGC Gly	GCC Ala	CCC Pro	2127

CCC GTG CCG CCC ACG GGT GAC TCC GGG GCC CCC CCC GTG ACC CCC ACG Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Thr Pro Thr 660 665 670 675	2175
GGT GAC TCC GAG ACC GCC CCC GTG CCG CCC ACG GGT GAC TCC GGG GCC Gly Asp Ser Glu Thr Ala Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala 680 685 690	2223
CCC CCT GTG CCC CCC ACG GGT GAC TCT GAG GCT GCC CCT GTG CCC CCC Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Glu Ala Ala Pro Val Pro Pro 695 700 705	2271
ACA GAT GAC TCC AAG GAA GCT CAG ATG CCT GCA GTC ATT AGG TTT TAG Thr Asp Asp Ser Lys Glu Ala Gln Met Pro Ala Val Ile Arg Phe * 710 715 720	2319
CGTCCCATGA GCCTTGGTAT CAAGAGGCCA CAAGAGTGGG ACCCCAGGGG CTCCCCCTCCC	2379
ATCTTGAGCT CTTCTGAAT AAAGCCTCAT ACCCCTAAAA AAAAAAAAAA	2428

(2) информация для : SEQ ID NO: 2:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 746 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(D) топология: линейная

(ii) молекулярный тип: белок

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 2:

Met Leu Thr Met Gly Arg Leu Gln Leu Val Val Leu Gly Leu Thr Cys -23 -20 -15 -10
Cys Trp Ala Val Ala Ser Ala Ala Lys Leu Gly Ala Val Tyr Thr Glu -5 1 5
Gly Gly Phe Val Glu Gly Val Asn Lys Lys Leu Gly Leu Leu Gly Asp 10 15 20 25
Ser Val Asp Ile Phe Lys Gly Ile Pro Phe Ala Ala Pro Thr Lys Ala 30 35 40
Leu Glu Asn Pro Gln Pro His Pro Gly Trp Gln Gly Thr Leu Lys Ala 45 50 55
Lys Asn Phe Lys Lys Arg Cys Leu Gln Ala Thr Ile Thr Gln Asp Ser 60 65 70
Thr Tyr Gly Asp Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Trp Val Pro Gln 75 80 85
Gly Arg Lys Gln Val Ser Arg Asp Leu Pro Val Met Ile Trp Ile Tyr 90 95 100 105
Gly Gly Ala Phe Leu Met Gly Ser Gly His Gly Ala Asn Phe Leu Asn 110 115 120
Asn Tyr Leu Tyr Asp Gly Glu Glu Ile Ala Thr Arg Gly Asn Val Ile 125 130 135
Val Val Thr Phe Asn Tyr Arg Val Gly Pro Leu Gly Phe Leu Ser Thr 140 145 150
Gly Asp Ala Asn Leu Pro Gly Asn Tyr Gly Leu Arg Asp Gln His Met 155 160 165

RU 2157847 C2

Ala	Ile	Ala	Trp	Val	Lys	Arg	Asn	Ile	Ala	Ala	Phe	Gly	Gly	Asp	Pro	170	175	180	185
Asn	Asn	Ile	Thr	Leu	Phe	Gly	Glu	Ser	Ala	Gly	Gly	Ala	Ser	Val	Ser	190	195	200	
Leu	Gln	Thr	Leu	Ser	Pro	Tyr	Asn	Lys	Gly	Leu	Ile	Arg	Arg	Ala	Ile	205	210	215	
Ser	Gln	Ser	Gly	Val	Ala	Leu	Ser	Pro	Trp	Val	Ile	Gln	Lys	Asn	Pro	220	225	230	
Leu	Phe	Trp	Ala	Lys	Lys	Val	Ala	Glu	Lys	Val	Gly	Cys	Pro	Val	Gly	235	240	245	
Asp	Ala	Ala	Arg	Met	Ala	Gln	Cys	Leu	Lys	Val	Thr	Asp	Pro	Arg	Ala	250	255	260	265
Leu	Thr	Leu	Ala	Tyr	Lys	Val	Pro	Leu	Ala	Gly	Leu	Glu	Tyr	Pro	Met	270	275	280	
Leu	His	Tyr	Val	Gly	Phe	Val	Pro	Val	Ile	Asp	Gly	Asp	Phe	Ile	Pro	285	290	295	
Ala	Asp	Pro	Ile	Asn	Leu	Tyr	Ala	Asn	Ala	Ala	Asp	Ile	Asp	Tyr	Ile	300	305	310	
Ala	Gly	Thr	Asn	Asn	Met	Asp	Gly	His	Ile	Phe	Ala	Ser	Ile	Asp	Met	315	320	325	
Pro	Ala	Ile	Asn	Lys	Gly	Asn	Lys	Lys	Val	Thr	Glu	Glu	Asp	Phe	Tyr	330	335	340	345
Lys	Leu	Val	Ser	Glu	Phe	Thr	Ile	Thr	Lys	Gly	Leu	Arg	Gly	Ala	Lys	350	355	360	
Thr	Thr	Phe	Asp	Val	Tyr	Thr	Glu	Ser	Trp	Ala	Gln	Asp	Pro	Ser	Gln	365	370	375	
Glu	Asn	Lys	Lys	Lys	Thr	Val	Val	Asp	Phe	Glu	Thr	Asp	Val	Leu	Ph	380	385	390	
Leu	Val	Pro	Thr	Glu	Ile	Ala	Leu	Ala	Gln	His	Arg	Ala	Asn	Ala	Lys	395	400	405	
Ser	Ala	Lys	Thr	Tyr	Ala	Tyr	Leu	Phe	Ser	His	Pro	Ser	Arg	Met	Pro	410	415	420	425
Val	Tyr	Pro	Lys	Trp	Val	Gly	Ala	Asp	His	Ala	Asp	Asp	Ile	Gln	Tyr	430	435	440	
Val	Phe	Gly	Lys	Pro	Phe	Ala	Thr	Pro	Thr	Gly	Tyr	Arg	Pro	Gln	Asp	445	450	455	
Arg	Thr	Val	Ser	Lys	Ala	Met	Ile	Ala	Tyr	Trp	Thr	Asn	Phe	Ala	Lys	460	465	470	
Thr	Gly	Asp	Pro	Asn	Met	Gly	Asp	Ser	Ala	Val	Pro	Thr	His	Trp	Glu	475	480	485	
Pro	Tyr	Thr	Thr	Glu	Asn	Ser	Gly	Tyr	Leu	Glu	Ile	Thr	Lys	Lys	Met	490	495	500	505
Gly	Ser	Ser	Ser	Met	Lys	Arg	Ser	Leu	Arg	Thr	Asn	Phe	Leu	Arg	Tyr	510	515	520	
Trp	Thr	Leu	Thr	Tyr	Leu	Ala	Leu	Pro	Thr	Val	Thr	Asp	Gln	Glu	Ala	525	530	535	

RU 2157847 C2

Thr Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Glu Ala Thr Pro Val Pro Pro
540 545 550

Thr Gly Asp Ser Glu Thr Ala Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly
555 560 565

Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro
570 575 580 585

Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser
590 595 600

Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val
605 610 615

Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp
620 625 630

Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ala Gly Pro Pro Pro
635 640 645

Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly
650 655 660 665

Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Thr Pro Thr Gly Asp Ser Glu Thr Ala
670 675 680

Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr
685 690 695

Gly Asp Ser Glu Ala Ala Pro Val Pro Pro Thr Asp Asp Ser Lys Glu
700 705 710

Ala Gln Met Pro Ala Val Ile Arg Phe
715 720

(2) информация для : SEQ ID NO: 3:

(i) характеристики последовательности:

- (A) длина: 722 аминокислоты
- (B) тип: аминокислота
- (C) нитевидность:
- (D) топология: линейная

(ii) молекулярный тип: белок

(iii) гипотетические признаки: нет

(vi) источник происхождения:

- (A) организм: Homo sapiens
- (F) тканевый тип: молочная железа

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 3:

Ala Lys Leu Gly Ala Val Tyr Thr Glu Gly Gly Phe Val Glu Gly Val
1 5 10 15

Asn Lys Lys Leu Gly Leu Leu Gly Asp Ser Val Asp Ile Phe Lys Gly
20 25 30

Ile Pro Phe Ala Ala Pro Thr Lys Ala Leu Glu Asn Pro Gln Pro His
35 40 45

Pro Gly Trp Gln Gly Thr Leu Lys Ala Lys Asn Phe Lys Lys Arg Cys
50 55 60

RU 2157847 C2

Leu	Gln	Ala	Thr	Ile	Thr	Gln	Asp	Ser	Thr	Tyr	Gly	Asp	Glu	Asp	Cys	65	70	75	80
Leu	Tyr	Leu	Asn	Ile	Trp	Val	Pro	Gln	Gly	Arg	Lys	Gln	Val	Ser	Arg	85	90	95	
Asp	Leu	Pro	Val	Met	Ile	Trp	Ile	Tyr	Gly	Gly	Ala	Phe	Leu	Met	Gly	100	105	110	
Ser	Gly	His	Gly	Ala	Asn	Phe	Leu	Asn	Asn	Tyr	Leu	Tyr	Asp	Gly	Glu	115	120	125	
Glu	Ile	Ala	Thr	Arg	Gly	Asn	Val	Ile	Val	Val	Thr	Phe	Asn	Tyr	Arg	130	135	140	
Val	Gly	Pro	Leu	Gly	Phe	Leu	Ser	Thr	Gly	Asp	Ala	Asn	Leu	Pro	Gly	145	150	155	160
Asn	Tyr	Gly	Leu	Arg	Asp	Gln	His	Met	Ala	Ile	Ala	Trp	Val	Lys	Arg	165	170	175	
Asn	Ile	Ala	Ala	Phe	Gly	Gly	Asp	Pro	Asn	Asn	Ile	Thr	Leu	Phe	Gly	180	185	190	
Glu	Ser	Ala	Gly	Gly	Ala	Ser	Val	Ser	Leu	Gln	Thr	Leu	Ser	Pro	Tyr	195	200	205	
Asn	Lys	Gly	Leu	Ile	Arg	Arg	Ala	Ile	Ser	Gln	Ser	Gly	Val	Ala	Leu	210	215	220	
Ser	Pro	Trp	Val	Ile	Gln	Lys	Asn	Pro	Leu	Phe	Trp	Ala	Lys	Lys	Val	225	230	235	240
Ala	Glu	Lys	Val	Gly	Cys	Pro	Val	Gly	Asp	Ala	Ala	Arg	Met	Ala	Gln	245	250	255	
Cys	Leu	Lys	Val	Thr	Asp	Pro	Arg	Ala	Leu	Thr	Leu	Ala	Tyr	Lys	Val	260	265	270	
Pro	Leu	Ala	Gly	Leu	Glu	Tyr	Pro	Met	Leu	His	Tyr	Val	Gly	Phe	Val	275	280	285	
Pro	Val	Ile	Asp	Gly	Asp	Phe	Ile	Pro	Ala	Asp	Pro	Ile	Asn	Leu	Tyr	290	295	300	
Ala	Asn	Ala	Ala	Asp	Ile	Asp	Tyr	Ile	Ala	Gly	Thr	Asn	Asn	Met	Asp	305	310	315	320
Gly	His	Ile	Phe	Ala	Ser	Ile	Asp	Met	Pro	Ala	Ile	Asn	Lys	Gly	Asn	325	330	335	
Lys	Lys	Val	Thr	Glu	Glu	Asp	Phe	Tyr	Lys	Leu	Val	Ser	Glu	Phe	Thr	340	345	350	
Ile	Thr	Lys	Gly	Leu	Arg	Gly	Ala	Lys	Thr	Thr	Phe	Asp	Val	Tyr	Thr	355	360	365	
Glu	Ser	Trp	Ala	Gln	Asp	Pro	Ser	Gln	Glu	Asn	Lys	Lys	Lys	Thr	Val	370	375	380	
Val	Asp	Phe	Glu	Thr	Asp	Val	Leu	Phe	Leu	Val	Pro	Thr	Glu	Ile	Ala	385	390	395	400
Leu	Ala	Gln	His	Arg	Ala	Asn	Ala	Lys	Ser	Ala	Lys	Thr	Tyr	Ala	Tyr	405	410	415	
Leu	Phe	Ser	His	Pro	Ser	Arg	Met	Pro	Val	Tyr	Pro	Lys	Trp	Val	Gly	420	425	430	

RU 2157847 C2

RU 2157847 C2

Ala	Asp	His	Ala	Asp	Asp	Ile	Gln	Tyr	Val	Phe	Gly	Lys	Pro	Phe	Ala	
		435					440					445				
Thr	Pro	Thr	Gly	Tyr	Arg	Pro	Gln	Asp	Arg	Thr	Val	Ser	Lys	Ala	Met	
	450					455					460					
Ile	Ala	Tyr	Trp	Thr	Asn	Phe	Ala	Lys	Thr	Gly	Asp	Pro	Asn	Met	Gly	
465					470					475					480	
Asp	Ser	Ala	Val	Pro	Thr	His	Trp	Glu	Pro	Tyr	Thr	Thr	Glu	Asn	Ser	
				485					490					495		
Gly	Tyr	Leu	Glu	Ile	Thr	Lys	Lys	Met	Gly	Ser	Ser	Ser	Met	Lys	Arg	
			500					505					510			
Ser	Leu	Arg	Thr	Asn	Phe	Leu	Arg	Tyr	Trp	Thr	Leu	Thr	Tyr	Leu	Ala	
		515					520					525				
Leu	Pro	Thr	Val	Thr	Asp	Gln	Glu	Ala	Thr	Pro	Val	Pro	Pro	Thr	Gly	
	530					535					540					
Asp	Ser	Glu	Ala	Thr	Pro	Val	Pro	Pro	Thr	Gly	Asp	Ser	Glu	Thr	Ala	
545					550					555					560	
Pro	Val	Pro	Pro	Thr	Gly	Asp	Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Val	Pro	Pro	Thr	
				565					570						575	
Gly	Asp	Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Val	Pro	Pro	Thr	Gly	Asp	Ser	Gly	Ala	
			580					585					590			
Pro	Pro	Val	Pro	Pro	Thr	Gly	Asp	Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Val	Pro	Pro	
		595					600					605				
Thr	Gly	Asp	Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Val	Pro	Pro	Thr	Gly	Asp	Ser	Gly	
	610					615					620					
Ala	Pro	Pro	Val	Pro	Pro	Thr	Gly	Asp	Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Val	Pro	
625					630					635					640	
Pro	Thr	Gly	Asp	Ala	Gly	Pro	Pro	Pro	Val	Pro	Pro	Thr	Gly	Asp	Ser	
				645					650					655		
Gly	Ala	Pro	Pro	Val	Pro	Pro	Thr	Gly	Asp	Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Val	
			660					665					670			
Thr	Pro	Thr	Gly	Asp	Ser	Glu	Thr	Ala	Pro	Val	Pro	Pro	Thr	Gly	Asp	
		675					680					685				
Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Val	Pro	Pro	Thr	Gly	Asp	Ser	Glu	Ala	Ala	Pro	
	690					695					700					
Val	Pro	Pro	Thr	Asp	Asp	Ser	Lys	Glu	Ala	Gln	Met	Pro	Ala	Val	Ile	
705					710					715					720	
Arg	Phe															

RU 2157847 C2

(2) информация для : SEQ ID NO: 4:

(i) характеристики последовательности:

- (A) длина: 568 аминокислот
- (B) тип: аминокислота
- (C) нитевидность:
- (D) топология: линейная

(ii) молекулярный тип: белок

(iii) гипотетические признаки: нет

(vi) источник происхождения:

- (A) организм: Homo sapiens
- (F) тканевый тип: молочная железа

(ix) отличительный признак:

- (A) имя/ключ: пептид
- (B) местоположение: 1..568
- (D) другая информация: метка = вариант C

(x) информация о публикации

(A) Авторы: Hansson, Lennart , Blackberg, Lars, Edlund, Michael, Lundberg, Lennart, Stromqvist, Mats. Hernell, Olle

(B) название: Рекомбинантная стимулированная желочной солью липаза человеческого молока

(C) журнал: J. Biol. Chem.

(D) том: 268

(E) выпуск: 35

(F) стр.: 26692-26698

(G) дата: 15 декабря 1993г.

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 4:

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

RU 2157847 C2

Asn	Lys	Gly	Leu	Ile	Arg	Arg	Ala	Ile	Ser	Gln	Ser	Gly	Val	Ala	Leu
210						215					220				
Ser	Pro	Trp	Val	Ile	Gln	Lys	Asn	Pro	Leu	Phe	Trp	Ala	Lys	Lys	Val
225					230					235					240
Ala	Glu	Lys	Val	Gly	Cys	Pro	Val	Gly	Asp	Ala	Ala	Arg	Met	Ala	Gln
				245					250					255	
Cys	Leu	Lys	Val	Thr	Asp	Pro	Arg	Ala	Leu	Thr	Leu	Ala	Tyr	Lys	Val
			260					265					270		
Pro	Leu	Ala	Gly	Leu	Glu	Tyr	Pro	Met	Leu	His	Tyr	Val	Gly	Phe	Val
		275					280					285			
Pro	Val	Ile	Asp	Gly	Asp	Phe	Ile	Pro	Ala	Asp	Pro	Ile	Asn	Leu	Tyr
	290					295					300				
Ala	Asn	Ala	Ala	Asp	Ile	Asp	Tyr	Ile	Ala	Gly	Thr	Asn	Asn	Met	Asp
305					310					315					320
Gly	His	Ile	Phe	Ala	Ser	Ile	Asp	Met	Pro	Ala	Ile	Asn	Lys	Gly	Asn
				325					330					335	
Lys	Lys	Val	Thr	Glu	Glu	Asp	Phe	Tyr	Lys	Leu	Val	Ser	Glu	Phe	Thr
			340					345					350		
Ile	Thr	Lys	Gly	Leu	Arg	Gly	Ala	Lys	Thr	Thr	Phe	Asp	Val	Tyr	Thr
		355					360					365			
Glu	Ser	Trp	Ala	Gln	Asp	Pro	Ser	Gln	Glu	Asn	Lys	Lys	Lys	Thr	Val
		370				375					380				
Val	Asp	Phe	Glu	Thr	Asp	Val	Leu	Phe	Leu	Val	Pro	Thr	Glu	Ile	Ala
385					390					395					400
Leu	Ala	Gln	His	Arg	Ala	Asn	Ala	Lys	Ser	Ala	Lys	Thr	Tyr	Ala	Tyr
				405					410					415	
Leu	Phe	Ser	His	Pro	Ser	Arg	Met	Pro	Val	Tyr	Pro	Lys	Trp	Val	Gly
			420					425					430		
Ala	Asp	His	Ala	Asp	Asp	Ile	Gln	Tyr	Val	Phe	Gly	Lys	Pro	Phe	Ala
		435					440					445			
Thr	Pro	Thr	Gly	Tyr	Arg	Pro	Gln	Asp	Arg	Thr	Val	Ser	Lys	Ala	Met
		450				455					460				
Ile	Ala	Tyr	Trp	Thr	Asn	Phe	Ala	Lys	Thr	Gly	Asp	Pro	Asn	Met	Gly
465					470					475					480
Asp	Ser	Ala	Val	Pro	Thr	His	Trp	Glu	Pro	Tyr	Thr	Thr	Glu	Asn	Ser
				485					490					495	
Gly	Tyr	Leu	Glu	Ile	Thr	Lys	Lys	Met	Gly	Ser	Ser	Ser	Met	Lys	Arg
			500					505					510		
Ser	Leu	Arg	Thr	Asn	Phe	Leu	Arg	Tyr	Trp	Thr	Leu	Thr	Tyr	Leu	Ala
		515					520					525			
Leu	Pro	Thr	Val	Thr	Asp	Gln	Gly	Ala	Pro	Pro	Val	Pro	Pro	Thr	Gly
		530				535					540				
Asp	Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Val	Pro	Pro	Thr	Gly	Asp	Ser	Lys	Glu	Ala
545					550					555					560
Gln	Met	Pro	Ala	Val	Ile	Arg	Phe								
				565											

RU 2157847 C2

ТАБЛИЦА

Ферментативная активность в культуральных супер-
натантах трансформантов Pichia pastoris

Время после индук- ции (час.)	Ферментативная активность в мг/л эквивалента на- тивной BSSL				
	PPF-1 [pARC 5771]		GS115 [pARC 5799]		GS115 [pARC 5797]
	№ 39	№ 86	№ 9	№ 21	№ 3
24	0.254	0.135	1.53	1.72	0.37
48	2.69	3.12	17.28	34.70	40.9
72	3.96	8.25	37.37	50.60	44.9
96	11.26	13.60	26.34	50.60	35.6
120	8.42	13.13	13.60	22.30	17.8

RU 2157847 C2

RU 2157847 C2