

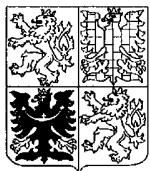
PŘÍHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 4842

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **25.06.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **25.06.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/98305033**

(33) Země priority: **EP**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.11.2001**
(Věstník č. 11/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/EP99/04416**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/67356**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/31

C 12 N 15/63

A 23 K 1/00

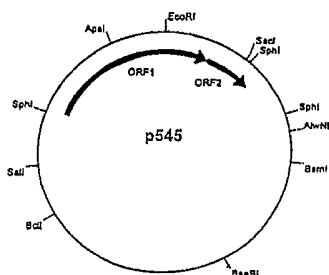
(71) Přihlašovatel:
DSM N. V., Heerlen, NL;

(72) Původce:
Pouwels Pieter Hendrik, Rijswijk, NL;
Van Luijk Nicole, Utrecht, NL;
Jore Johannes Petrus Maria, Gouda, NL;
Luiten Rudolf Gijsbertus Maria, Leiden, NL;

(74) Zástupce:
Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Polynukleotid, vektor a hostitelské buňky k
produkci rekombinantních proteinů a k výrobě
potravin**

(57) Anotace:
Řešení poskytuje plazmid z *Propionibacterium*, izolovaný z kmenu LMG 16545 *Propionibacterium freudenreichii* (uložen jako CBS 101022) a jeho sekvenci. Tento plazmid lze využít pro transformaci *Propionibacterium* pro expresi homologních nebo heterologních proteinů, k výrobě rekombinantních proteinů nebo produktů enzymatických procesů, např. vitamínu B₁₂.



4544

Polynukleotid, vektor a hostitelské buňky k produkci rekombinantních proteinů a k výrobě potravin

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká endogenního plazmidu *Propionibacterium*, vektorů odvozených z tohoto plazmidu a použití těchto vektorů pro (heterologní) expresi proteinů v baktériích, zejména druhu *Propionibacterium*. Tyto transformované bakterie mohou být použity k fermentační výrobě vitamínu B₁₂ nebo při výrobě sýra.

Dosavadní stav techniky

Bakterie rodu *Propionibacterium* jsou Gram-pozitivní bakterie schopné produkovat různé užitečné sloučeniny v různých průmyslových procesech. Tak např. několik druhů bakterií *Propionibacterium* je známo tím, že produkuje vitamín B₁₂ (kobalamin) při průmyslové fermentaci. Některé jiné druhy jsou užívány v mlékárenském průmyslu při výrobě sýrů, kde přispívají, a v mnohých případech jsou hlavními činidly, ke specifické chuti a textuře sýrů. Mnohé druhy *Propionibacterium* jsou považovány za zcela bezpečné, že jsou jakožto živé organismy přidávány do potravin pro lidi nebo potraviny pro zvířata.

Pro plné využití biotechnologického potenciálu bakterií *Propionibacterium* jsou potřebné účinné a flexibilní metody genového inženýrství. A takové metody jsou závislé na dostupnosti plazmidů vhodných pro expresi proteinu z heterologního genu v *Propionibacterium*.

Dokument EP-A-0400931 (Nippon Oil) popisuje endogenní plazmid (pTY-1) z *Propionibacterium pentosaceum* (ATCC 4875), ale neuvádí jeho sekvenci ani neuvádí příklad, jak ho využít pro expresi heterologního genu.

Dokument JP 08-56673 popisuje plazmid pTY-1 pro produkci vitamínu B12, ale neposkytuje žádný důkaz, že plazmid zůstává volně se replikujícím extrachromozomálním elementem, ani že je plazmid stálý uvnitř transformovaných buněk.

Cílem předkládaného vynálezu je proto poskytnout vektor, které jsou účinnější než dosud známé vektory, zůstávají extrachromozomální a/nebo jsou stabilní. Cílem vynálezu je zejména poskytnout účinný vektor pro klonování a/nebo expresi cizorodých genů nebo genomových fragmentů nebo genů či fragmentů z *Propionibacterium* v hostitelském kmenu *Propionibacterium*. To by umožnilo zabránit působení specifických restričních enzymů hostitele a tudíž zabránit tomu, aby hostitel vnímal plazmid jako cizorodý polynukleotid.

Podstata vynálezu

První aspekt předkládaného vynálezu poskytuje polynukleotid, který je schopen selektivně hybridizovat se

- a) sekvencí id. č. 1 nebo k ní komplementární sekvencí,
- b) sekvencí z plazmidu velikosti 3,6 kb z *Propionibacterium freudenreichii* CBS 101022,
- c) sekvencí z plazmidu velikosti 3,6 kb z *Propionibacterium freudenreichii* CBS 101023,
- d) sekvencí kódující polypeptid podle vynálezu, jako je např. aminokyselinová sekvence id. č. 2 nebo 3 (nebo alespoň část), nebo sekvencí k ní komplementární.

Sekvence id. č. 1 popisuje DNA sekvenci endogenního plazmidu z *Propionibacterium* LMG 16545, který byl objeven původci. První kódující sekvence jde od nukleotidu 273 do nukleotidu 1184 a predikovaná aminokyselinové sekvence této kódující sekvence je ukázána jako sekvence id. č. 3.

Původci vynálezu provedli screening rozsáhlé kolekce izolátů *Propionibacterium* a identifikovali dva kmeny nesoucí kryptické plazmidy velikosti 3,6 kb. Jeden z těchto kmenů byl *Propionibacterium freudenreichii* LMG 16545, který byl deponován 19. června 1998 ve sbírce CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Oosterstraat 1, Postbus 273, NL-3740 Ag Baarn, Nizozemí 101022) jménem přihlašovatele (Gist-Brocades, B.V., Wateringsweg 1, P.O. Box 1, 2600 MA Delft, Nizozemí) v souladu s Budapešťskou smlouvou, pod přírůstkovým číslem CBS 101022. Druhý kmen *Propionibacterium freudenreichii* LMG 16546 byl stejným ukladatelem deponován také 19. června 1998 ve stejné sbírce (CBS) pod přírůstkovým číslem CBS 101023.

Díky úplné charakterizaci a počítačové analýze nukleotidové sekvence LMG 16545 byli původci schopni identifikovat inzerční místa pro fragmenty cizorodé DNA. Tato místa pak umožnila konstrukci plazmidů, které jsou stále schopny autonomní replikace v *Propionibacterium*.

Překvapivě bylo zjištěno, že gen rezistence k erytromycinu z aktinomycety *Saccharopolyspora erythraea* je účinně exprimován v *Propionibacterium*, a může být tudíž využit jako selekční marker pro transformované buňky.

Byly také připraveny bifunkční vektory, které mohou být trvale udržovány a selektovány jak v *E. coli* tak i v *Propionibacterium*. To umožnilo využít pro konstrukci vektorů *E. coli* a současně funkční expresi homologních nebo hetrologních genů v *Propionibacterium*. Konstrukce vektorů pomocí *E. coli* je nesrovnatelně snazší a je možné ji

realizovat rychle.

Polynukleotid podle předkládaného vynálezu je autonomně se replikující nebo extrachromozomální, např. v baktérii jako je *Propionibacterium*.

Další aspekt předkládaného vynálezu poskytuje vektor, který obsahuje polynukleotid podle vynálezu.

Předkládaný vynález dále poskytuje způsob přípravy polypeptidu, kterýžto způsob obsahuje krok kultivace hostitelských buněk transformovaných nebo transfekovaných pomocí vektoru podle vynálezu v podmínkách, které vedou k expresi polypeptidu.

Vynález dále poskytuje polypeptid, který obsahuje sekvenci uvedenou zde jako sekvence id. č. 2 nebo 3 nebo sekvenci v podstatě s ní homologní, nebo fragment kterékoliv z těchto sekvencí, nebo protein kódovaný polynukleotidem podle vynálezu.

Polynukleotidy

Polynukleotidy podle vynálezu jsou schopné selektivně hybridizovat se sekvencí id. č. 1 nebo s úsekem sekvence id. č.1 nebo sekvencí k těmto sekvencím nebo úsekům komplementární. Polynukleotid podle vynálezu je schopen selektivně hybridizovat se sekvencí plazmidu o velikosti 3,6 kb z *P. freudenreichii* CBS 101022 nebo CBS 101023 nebo s úsekem těchto sekvencí. Typicky polynukleotid podle vynálezu je souvislá sekvence nukleotidů, která je schopna selektivně hybridizovat se sekvencí id. č. 1 nebo s plazmidem velikosti 3,6 kb nebo částí těchto sekvencí, nebo sekvencí, která je komplementární ke kterékoliv z těchto sekvencí nebo úsekům kterýchkoliv z těchto sekvencí.

Polynukleotid podle vynálezu a sekvence id. č. 1 nebo

sekvence jednoho z plazmidů velikosti 3,6 kb nebo sekvence kódující polypeptid, nebo úseky těchto sekvencí, hybridizují na hladině významně vyšší než je základní hybridizace (pozadí hybridizace). K základní hybridizaci může dojít např. v důsledku přítomnosti dalších polynukleotidů v preparátu. Hladina signálu generovaného interakcí mezi polynukleotidem podle vynálezu a sekvencí id. č. 1 nebo jedním z plazmidů velikosti 3,6 kb nebo úseky těchto sekvencí, je typicky alespoň 10x, výhodně alespoň 100x intenzivnější než interakce jiných polynukleotidů se sekvencí id. č. 1 nebo jedním z plazmidů velikosti 3,6 kb nebo úseky těchto sekvencí. Intenzita interakce se měří např. pomocí radioaktivního značení sondy užitím ^{32}P . Selektivní hybridizace je typicky dosaženo v podmínkách střední stringence (tj. např. 0,3M chlorid sodný a 0,03M citrát sodný při 50 °C) až vysoké stringence (stejně koncentrace ale při 60 °C).

Polynukleotidy podle vynálezu jsou obecně ze 70 %, výhodně alespoň 80 až 90 %, výhodněji alespoň 95 % a nejvýhodněji alespoň 98 % homologní se sekvencí podle bodů a) až d) v úseku souvislé sekvence alespoň 20 nukleotidů, výhodně alespoň 30 nukleotidů, např. alespoň 40, 60 nebo 100 a více nukleotidů.

Jakákoliv kombinace výše uvedených stupňů homologie a minimální velikosti definuje polynukleotid podle vynálezu, přičemž výhodnější jsou více stringentní kombinace (tj. vyšší míra homologie na delším úseku). Tak např. polynukleotid který je homologní alespoň z 80 až 90 % na úseku 25 nukleotidů, výhodně 30 nukleotidů je jedním provedením předkládaného vynálezu, stejně jako polynukleotid s 90 až 95% homologií na úseku delším než 40 nukleotidů.

Úseky zmíněné výše mohou být kódující sekvence id. č. 1 nebo jeden z plazmidů velikosti 3,6 kb. Jinými výhodnými

úseky sekvence id. č. 1 jsou replikační počátek, promotor nebo regulační sekvence, nebo sekvence schopné zajistit nebo se alespoň podílet na autonomní replikaci v hostitelské buňce jako je např. *Propionibacterium*.

Bylo zjištěno, že úsek plazmidu od restrikčního místa *Sall* do místa *AlwNI* je úsekem, který je nezbytný pro replikaci plazmidu. Jiné části plazmidu byly odstraněny (deletovány) a přesto to nemělo žádný škodlivý dopad na replikaci. Tudiž sekvence podle vynálezu v bodech b) a c) mohou být úseky vymezené restrikčními místy *Sall* a *AlwNI*. To představuje úsek asi velikosti 1,7 kb. Alternativně sekvence uvedené v bodech b) nebo c) mohou být nahrazeny sekvencí odpovídající nukleotidům 1 až 1800, např. 100 až 1700, případně 150 až 1500, výhodně 200 až 1300 a nejvýhodněji 250 až 1200 ze sekvence id. č. 1.

Proteiny (sekvence id. č. 2 a 3) kódované ORF 1 a ORF2 zřejmě napomáhají replikaci plazmidu. Plazmid se replikuje metodou tzv. otáčejícího se kruhu, kdy je původní plazmidová dsDNA rozštěpena jedním z proteinů, což napomáhá vytvoření kopie vnějšího řetězce za užití vnitřního řetězce jakožto templátu. Kopie vnějšího řetězce je pak odstraněna a konce řetězce jsou spojeny (ligovány). Hostitel pak replikuje vnitřní kruh pomocí vnějšího kruhu užitého jako templát.

Kódující sekvence podle vynálezu může být modifikována substitucí nukleotidů, např. 1, 2, 3 až 10, 25, 50 nebo 100 substitucemi. Polynukleotidy sekvencí podle bodu a) až d) mohou být alternativně nebo navíc modifikovány jednou nebo několika inzercemi nebo delecemi a/nebo extenzí (prodloužením) na jednom z konců nebo na obou koncích. Mohou být provedeny degenerované substituce a/nebo substituce, které vedou ke konzervativní aminokyselinové substituci, když je modifikovaná sekvence translatována, jak bude pro

polynukleotidy podle vynálezu ještě podrobněji diskutováno dále.

Polynukleotidy podle vynálezu mohou obsahovat RNA nebo DNA. Mohou to být polynukleotidy, které obsahují syntetické nebo modifikované nukleotidy. V oboru je známa celá řada různých typů modifikací polynukleotidů. Patří sem např. methylyfosfonátová nebo fosforothioátová kostra, adice akridinového nebo polylysinového řetězce na 3'- nebo 5'-konec molekuly. Ve smyslu předkládaného vynálezu je třeba chápat, že polynukleotid podle vynálezu může být modifikován jakýmkoliv odborníkovi známým způsobem. Takové modifikace jsou prováděny s cílem zvýšit *in vivo* aktivitu a/nebo prodloužit životnost.

Polynukleotidy podle vynálezu se mohou užít jako primery, např. primery pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR), primery pro alternativní amplifikační reakce, jako sonda, např. jako sonda značená detekovatelnou značkou konvenčním způsobem užitím radioaktivní nebo neradioaktivní značka, nebo polynukleotid může být klonován do vektoru.

Takové primery, sondy nebo jiné fragmenty jsou dlouhé alespoň 15, výhodně alespoň 20, např. alespoň 25, 30 nebo 40 nukleotidů. typicky mají velikost do 40, 50, 60, 70, 100 nebo 150 nukleotidů. Sondy a fragmenty mohou být i delší než 150 nukleotidů, např. až 200, 300, 500, 1000 nebo 1500 nukleotidů, nebo naopak krátké jen málo několik nukleotidů, jako např. 5 nebo 10 nukleotidů ze sekvence a) až d).

Polynukleotidy jako DNA polynukleotidy nebo primery podle vynálezu mohou být připraveny rekombinantní technikou, synteticky nebo jakýmkoliv jiným způsobem odborníkovi známým. Mohou být také standardním způsobem klonovány. Polynukleotidy jsou typicky připraveny v izolované a/nebo purifikované formě.

Obecně jsou primery připravovány synteticky, což představuje přípravu sekvence nukleové kyseliny postupným přidáváním jednoho nukleotidu. Způsoby pro takové syntézy užitím automatických zařízení jsou v oboru k dispozici.

Delší polynukleotidy se připravují rekombinantní technikou, např. užitím PCR klonování. Tento způsob zahrnuje přípravu dvou oligonukleotidových primerů (např. velikosti 15 až 30 nukleotidů) pro úsek sekvence id. č. 1 nebo jeden z plazmidů velikosti 3,6 kb, který má být klonován, dále se tyto primery přivedou do kontaktu s DNA získanou z *Propionibacterium*, provede se PCR ve vhodných podmínkách, aby se amplifikoval požadovaný úsek sekvence, amplifikovaný fragment se izoluje (např. purifikací reakční směsi elektroforézou na agarózovém gelu). Primery mohou být navrženy tak, aby obsahovaly vhodná rozpoznávací místa pro restriktční enzymy, takže amplifikovaná DNA pak může být snadno klonována do vhodného vektoru. Tento způsob může být využit k získání buďto částí nebo i celých sekvencí id. č. 1 nebo obou plazmidů velikosti 3,6 kb.

Všechny tyto uvedené metody jsou odborníkům známy¹⁰.

Polynukleotidy, které nejsou ve 100 % homologní se sekvencí id. č. 1 nebo jedním z plazmidů velikosti 3,6 kb mohou být získány různými způsoby.

Polynukleotidy homologické se sekvencí id. č. 1 nebo jedním z plazmidů velikosti 3,6 kb mohou být získány např. prohledáváním knihoven genomové DNA připravených z různých druhů *Propionibacterium*, např. *P. freudenreichii*, *P. jensenii*, *P. thoenii*, *P. acidipropionici* nebo kmenů bakterií ze třídy *Actinomycetes*, nebo jiných Gram-pozitivních bakterií, nebo bakterií bohatých na G:C páry. Všechny tyto organismy jsou vhodnými zdroji homologních nebo heterologních genů, promotorů, enhancerů (zesilujících elementů) nebo

hostitelských buněk pro použití podle vynálezu.

Takové homology a jejich fragmenty jsou obecně schopné selektivně hybridizovat s kódující sekvencí sekvence id. č. 1 nebo sekvencí k ní komplementární nebo jednou ze sekvencí plazmidů velikosti 3,6 kb. takové sekvence lze získat prohledáváním DNA knihoven z *Propionibacterium* pomocí sond, které obsahují část nebo celou sekvenci id. č. 1 nebo jednoho z plazmidů velikosti 3,6 kb v podmínkách střední až vysoké stringence (tj. např. 0,03M chlorid sodný a 0,3M citrát sodný při 50 až 60 °C).

Homology lze také získat pomocí degenerované PCR, kdy se užijí primery zacílené na konzervativní úseky v homologu. Konzervativní sekvence lze predikovat srovnáním sekvence id. č. 1 nebo sekvence plazmidů velikosti 3,6 kb se sekvencí homologa. Primery obsahují jedno nebo několik degenerovaných míst a použijí se za podmínek nižší stringence, než když se užívají primery s jedinečnou sekvencí pro známou sekvenci.

Alternativně lze takové polynukleotidy získat místně cílenou mutagenezí sekvence id. č. 1 nebo plazmidů velikosti 3,6 kb nebo jejich homologů. To je užitečné např. tehdy, když jsou požadovány umlčené záměny kodonů kvůli optimalizaci preference kodonů pro určitou hostitelskou buňku, kde má být polynukleotidová sekvence exprimována. Jiné změny sekvencí jsou třeba pro vnesení rozpoznávacích míst pro restriční enzymy nebo je-li cílem změnit vlastnosti nebo funkci polypeptidu, který je polynukleotidem kódován.

Metody stanovení homologie polynukleotidu jsou odborníkovi známy. Tak např. soubor programů UW GCG poskytuje program BESTFIT, který lze užít pro výpočet homologie, např. se standardním nastavením parametrů⁷. Pro homologii aminokyselinových sekvencí týkajících se polynukleotidů podle vynálezu lze užít program BLAST (Basic Local Alignment

Tool¹), který umožňuje srovnávání aminokyselinových sekvencí (a pokud je třeba i nukleotidových sekvencí) pro stanovení sekvenční podobnosti. Program BLAST může být užit ke stanovení míry přesného párování nebo pro identifikaci homologů a je zejména užitečný při takovém párování, které neobsahuje mezery. Metoda BLAST užívá algoritmus založený na metodě HSP (High-scoring Segment Pair).

Předmětem vynálezu jsou také dvouřetězcové polynukleotidy, které obsahují polynukleotidovou sekvenci podle vynálezu a sekvenci k ní komplementární.

Polynukleotidy (např. sondy nebo primery) podle vynálezu mohou obsahovat detekovatelnou značku. K vhodným značkám patří radioizotopy jako např. ³²P nebo ³⁵S, enzymové značky nebo jiné proteiny jako např. biotin. Detekční metody těchto značek jsou známy.

Polynukleotidy (značené nebo neznačené) se mohou využít v testech založených na nukleových kyselinách pro detekci nebo sekvencování jiného polynukleotidu podle vynálezu.

K polynukleotidům podle vynálezu patří také varianty sekvence id. č. 1 nebo obou plazmidů velikosti 3,6 kb, které jsou schopné autonomní replikace nebo zůstávají extrachromozomální v hostitelské buňce. Takové varianty jsou stabilní v baktérii jako je např. *Propionibacterium*.

Obecně polynukleotid podle vynálezu obsahuje replikační počátek a/nebo kódující úsek (úseky) sekvence id. č. 1 nebo jednoho z plazmidů velikosti 3,6 kb, nebo homology těchto sekvencí. Polynukleotid podle vynálezu, který je stabilní v hostitelské buňce, jak např. v *Propionibacterium* nebo *E. coli*, je takový polynukleotid, který není ztracen z hostitele v průběhu pěti generací, případně 15 generací, výhodně 30 generací. Obecně je takový polynukleotid zděděn oběma dceřinými buňkami v každé generaci.

Polynukleotid může obsahovat promotor nebo replikační počátek (např. "upstream", tj. proti směru transkripce, od sekvence kódující replikační protein).

Polynukleotid podle vynálezu může být transformací nebo transfekcí vnesen do bakterie, jako je např. *E. coli* nebo *Propionibacterium*, metodou k tomu vhodnou¹¹. Může být přítomen v bakterii v počtu 5 až 500 kopií, např. 10 až 100 kopií.

Polynukleotid je schopen autonomní replikace v bakterii jiné než *Propionibacterium*. takovou bakterií jenapř. *E. coli*, nebo Gram-pozitivní, na G:C bohatá bakterie, nebo bakterie ze třídy *Actinomycetes*. Takový polynukleotid obecně obsahuje sekvence, které umožňují, aby byl polynukleotid v bakterii autonomně replikován. Takové sekvence mohou být odvozeny z plazmidů, které jsou schopné replikace v bakterii.

Polynukleotid podle vynálezu může být polynukleotid, který byl připraven replikací v *Propionibacterium*. Alternativně může být připraven replikací v jiné bakterii, např. v *E. coli*. Polynukleotid je schopen obejít restriční systém hostitele *Propionibacterium*.

Vektory

Druhý aspekt předkládaného vynálezu se týká vektoru, který obsahuje polynukleotid podle vynálezu. Vektor je schopen replikace v hostitelské buňce jako je např. bakterie, např. *Actinomycetes*, *Propionibacterium* nebo *E. coli*. Vektor je lineární polynukleotid nebo, což je častější, kruhový polynukleotid. Vektor může být hybridem polynukleotidu podle vynálezu a jiného vektoru. Jiným vektor v tomto případě je např. vektor *E. coli* jako je pBR322 nebo vektory z rodiny pUC vektorů, R1, ColD nebo RSF1010 nebo z nich odvozené vektory.

Polynukleotid nebo vektor podle vynálezu může být

plazmid. Takový plazmid má restriční mapu stejnou nebo v podstatě podobnou s restričními mapami uvedenými na obr. 1, 2a a 2b.

Polynukleotid nebo vektor podle vynálezu má velikost 1 až 20 kb, např. 2 až 10 kb, výhodně 3 až 7 kb.

Polynukleotid nebo vektor podle vynálezu může obsahovat vícečetná funkční klonovací místa. Taková klonovací místa obecně obsahují rozpoznávací sekvence restričních enzymů. Polynukleotid nebo vektor může obsahovat sekvenci ukázanou zde jako sekvence id. č. 1 a/nebo obsahuje restriční místa EcoRI, SacI, AlwNI, BSMI, BsaBI, BclI, ApaI, HindIII, SalI, HpaI, PstI, SphI, BamHI, Acc65I, EcoRV a BglII. Polynukleotid nebo vektor podle vynálezu tedy obsahuje jedno, více než jedno nebo všechna tato výše uvedená restriční místa, obecně v pořadí, které je ukázáno na obrázcích.

Výhodně, pokud je přítomen v baktérii, jako je např. *Propionibacterium* nebo *E. coli*, se polynukleotid nebo vektor podle vynálezu neintegruje do chromozómu bakterie. Obecně neintegruje do chromozómu bakterie po 5 generací, výhodně po 20 nebo 30 generací.

Polynukleotid nebo vektor může být autonomně se replikující plazmid, který se udržuje extrachromozomálně uvnitř hostitelské buňky, přičemž plazmid je odvozen z endogenního plazmidu *Propionibacterium*, a když obsahuje heterologní gen (vzhledem k hostiteli) je schopen tento gen exprimovat uvnitř hostitelské buňky. Termín "derivovaná forma" nebo "odvozená forma" znamená, že autonomně se replikující plazmid obsahuje sekvenci shodnou s polynukleotidem podle vynálezu.

Vektor podle vynálezu může obsahovat selekční marker. Selekční marker může být gen poskytující rezistenci k antibiotiku, např. gen rezistence k ampicilinu, kanamycinu

nebo tetracyklinu. Může to také být gen rezistence k erytromycinu. Gen rezistence k erytromycinu pochází z *Actinomycetes* jako např. *Saccharopolyspora erythraea*, např. *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338. K dalším selekčním markerům, které mohou být ve vektor podle vynálezu, patří geny rezistence ke chloramfenikolu, thiosterptonu, viomycinu, neomycinu, apramycinu, hygromycinu, bleomycinu nebo streptomycinu.

Vektor může být expresní vektor, takže obsahuje heterologní gen (který se přirozeně nevyskytuje v hostitelské buňce, např. *Propionibacterium*), nebo endogenní nebo homologní gen hostitelské buňky, např. *Propionibacterium*. V expresním vektoru je obvykle gen, který má být exprimován, operativně spojen s kontrolní sekvencí, která je schopna exprimovat gen v hostitelské buňce.

Termín "operativně spojený" znamená takové vzájemné spojení (přiložení), že výše popsané složky jsou v takovém vztahu, který umožňuje zamýšlenou funkci. Kontrolní sekvence "operativně spojená" s kódující sekvencí je ligována takovým způsobem, že je dosaženo exprese kódující sekvence v podmínkách, které jsou kompatibilní s kontrolní sekvencí.

Heterologní nebo endogenní geny mohou být vloženy mezi nukleotidy 1 a 200 nebo mezi nukleotidy 1500 až 3555 sekvence id. č. 1 nebo do ekvivalentní pozice v homologním polynukleotidu.

Takové geny obsahují homologní nebo endogenní geny např. pro elongační faktory, promotorové regulační sekvence nebo elementy a replikační proteiny. K další genům (které mohou být vzhledem k hostiteli heterologní) patří geny, kódující přímo nebo podílející se na tvorbě výživových faktorů, imunomodulátorů, hormonů, proteinů nebo enzymů (jako jsou např. proteázy, amylázy, peptidázy a lipázy), činidla

ovlivňující texturu, chuťové látky (např. diacetyl, aceton), genové klustry, antimikrobiální činidla (např. nisin), látky používané v potravinách (např. v klobásách, sýrech), metabolické enzymy, vitamíny (např. B₁₂), uroporfyrinogen (III)methyltransferáza (UP III MT), *cobA*, antigeny (např. pro očkování) a terapeutická činidla. Jak se ještě objasní dále, hostitelské buňky mohou produkovat celou řadu různých látek, nejen polypeptidů, které jsou přímo požadovaným produktem nebo se užívají k přípravě požadovaného produktu.

Heterologní gen může mít terapeutický účinek pro člověka nebo zvíře. Takový gen může být gen pro antigen, např. z patogenního organismu. Hostitel, např. *Propionibacterium*, obsahující polynukleotid s takovým heterologním genem se může užít jako vakcína a může poskytovat ochranu proti patogenu.

Heterologní antigen může být celý protein nebo část proteinu obsahující epitop. Antigen může pocházet z bakterie, kvasinky, viru nebo houby.

Hostitelské buňky a exprese

Třetí aspekt předkládaného vynálezu představují hostitelské buňky, které obsahují polynukleotid nebo vektor podle vynálezu. Hostitelské buňky jsou bakterie, např. třídy Actinomycetes. Mohou to být bakterie *E. coli* nebo *Propionibacterium*. V případě *Propionibacterium* jde o bakterie *P. freudenreichii*, *P. jensenii*, *P. thoenii* nebo *P. acidopropionci*.

Čtvrtý aspekt vynálezu poskytuje způsob přípravy hostitelských buněk, který obsahuje transformaci nebo transfekci hostitelských buněk polynukleotidem nebo vektorem podle vynálezu, např. způsobem transformace¹¹, který je odborníkovi známý.

Pátý aspekt vynálezu poskytuje způsob přípravy polypeptidu kódovaného polynukleotidem nebo vektorem podle vynálezu přítomným v hostitelské buňce podle vynálezu, kterýžto způsob obsahuje umístění nebo kultivaci hostitelských buněk v podmínkách, kde dojde k expresi polypeptidu.

Tento aspekt vynálezu dále poskytuje způsob přípravy polypeptidu kódovaného daným genem, kterýžto způsob obsahuje kultivaci hostitelské buňky transformované nebo transfekované expresním vektorem obsahujícím gen, v podmínkách, které vedou k expresi polypeptidu, a případě izolaci exprimovaného polypeptidu. Hostitelské buňky mohou být ze třídy *Actinomycetes*, nebo Gram-pozitivní bakterie jako např. *Propionibacterium* nebo *E. coli*.

Promotory, iniciátory translace, terminátory translace, geny elongačních faktorů, geny ribozomové RNA, geny rezistence k antibiotikům, syntetické promotory (např. zkonstruované na základě kanonických sekvencí) nebo další signály regulující expresi přítomné v polynukleotid nebo vektor podle vynálezu jsou takové, že jsou kompatibilní s expresí v hostitelské buňce. K promotorům patří také promotory endogenních genů hostitelské buňky.

Kultivační podmínky mohou být jak aerobní tak i anaerobní, v závislosti na hostiteli. Pro fermentační proces se umístí hostitel do anaerobních podmínek a pak případě do aerobních podmínek. produkované sloučeniny, např. exprimované polypeptidy, se pak izolují, např. z hostitelských buněk nebo fermentačního média. Exprimované polypeptidy mohou být secernovány hostitelskými buňkami do média. V takovém případě jsou polypeptidy exprimovány na povrchu hostitelských buněk. To je žádoucí např. tehdy, když polypeptid obsahuje antigen, na který má reagovat imunitní systém člověka nebo zvířete.

Homologní gen přítomný ve vektoru podle vynálezu může být *cobA*. Hostitelská buňky obsahující tento vektor je tudíž schopna produkovat ze substrátu sloučeniny jako je vitamín B₁₂ nebo enzymový produkt. Předkládaný vynález specificky poskytuje způsob přípravy vitamínu B₁₂, který obsahuje kultivaci nebo-li fermentaci hostitelských buněk v podmínkách, kde je exprimován gen UP(III)MT. Takto exprimovaný enzym je přiveden do kontaktu s vhodným substrátem v podmínkách, kde je substrát přeměněn na vitamín B₁₂. To vede ke zvýšení produkce vitamínu B₁₂.

Léčiva

Jak bylo již popsáno výše, polynukleotid podle vynálezu může obsahovat heterologní gen, který je terapeutickým (léčivým) genem. Takže předmětem vynálezu je i hostitelská buňky obsahující vektor podle vynálezu, který obsahuje terapeutický gen, pro použití při léčení člověk a nebo zvířete. Hostitelkou buňkou může být *Propionibacterium*. Hostitelská buňka může být živá nebo mrtvá.

Hostitelské buňky jsou pro klinické podávání formulovány smícháním s farmaceuticky přijatelnými nosiči nebo rozpouštědly. Mohou být formulovány např. pro topické, parenterální, intravenózní, intramuskulární, subkutánní, perorální nebo transdermální podávání. Hostitelské buňky mohou být smíchány s vehikulem, které musí být farmaceuticky přijatelné a vhodné pro požadovaný způsob podávání. Farmaceuticky přijatelný nosič nebo rozpouštědlo pro injekční podávání je např. sterilní isotonický roztok, např. voda pro injekce nebo fyziologický roztok.

Dávka hostitelských buněk se určí v závislosti na různých parametrech, zejména v závislosti na typu použitých

buněk, věku, hmotnosti a stavu léčeného pacienta, způsobu podávání, nemoci, která má být léčena a požadovaném klinickém režimu. Jako základní vodítko, počet podávaných hostitelských buněk při perorálním podávání je 107 až 1011 hostitelských buněk v jedné dávce pro dospělého člověka o hmotnosti 70 kg.

Způsoby podávání a popsané dávky jsou zamýšleny pouze jako vodítko či ilustrace, neboť zkušený odborník je schopen okamžitě určit nejvhodnější způsob podávání a optimální dávku pro určitého pacienta a určitý stav.

Polypeptidy

Šestý aspekt předkládaného vynálezu poskytuje polypeptid, který obsahuje jednu z následujících aminokyselinových sekvencí: sekvence id. č. 2 nebo 3 nebo v podstatě homologní sekvence, nebo fragment jedné z těchto sekvencí. Polypeptid podle vynálezu je polypeptid kódovaný polynukleotidem podle prvního aspektu předkládaného vynálezu. Obecně řečeno, výhodné jsou přirozeně se vyskytující aminokyselinové sekvence uvedené zde jako sekvence id. č. 2 a 3. Avšak k polypeptidům podle vynálezu patří homology těchto přírodních sekvencí, a také fragmenty těchto sekvencí a jejich homology, které mají aktivitu přirozeně se vyskytujícího polypeptidu. Jednou takovou aktivitou je replikace polynukleotidu podle vynálezu.

Polypeptid podle vynálezu obsahuje:

- a) protein se sekvencí id. č. 2 nebo 3, nebo
- b) jejich homolog z *Actinomycetes*, jako např. z *Propionibacterium freudenreichii* nebo jiného kmenu *Propionibacterium*, nebo
- c) protein s alespoň 70% homologií s a) nebo b).

Homolog se může přirozeně vyskytnout v *Propionibacterium*

a fungovat v podstatě podobně jako polypeptid se sekvencí id. č. 2 nebo 3. Takový homolog se může vyskytovat v *Actinomycetes* i Gram-pozitivních bakteriích.

Protein homologní alespoň v 70 % k proteinům se sekvencí id. č. 2 nebo 3 nebo jejich homologům je výhodně z 80 % nebo 90 % homologní, výhodněji z 95, 97 a 99 % homologní v úseku alespoň 20 nukleotidů, výhodně alespoň 30, např. 40, 60 nebo 100 po sobě souvisle následujících aminokyselin. Způsoby stanovení homologie proteinů jsou odborníkům známy a v kontextu popisu vynálezu je odborníkům zřejmé, že homologie je určována na základě identity aminokyselin (tato homologie je někdy označována jako "tvrdá" homologie).

Sekvence proteinů se sekvencí id. č. 2 nebo 3 nebo homologními mohou být modifikovány, čímž poskytnou další polypeptidy podle vynálezu.

Mohou být provedeny substituce aminokyselin, např. 1, 2 nebo 3 až 10, 20 nebo 30 aminokyselin. Modifikovaný peptid si uchovává svou původní aktivitu. Lze provést konzervativní substituce, např. podle následující tabulky. Aminokyseliny ve stejném bloku ve druhém sloupci a výhodně v tomtéž řádku ve třetím sloupci mohou být vzájemně substituovány.

ALIFATICKÉ	Nepolární	G A P
		I L V
	Polární-nenabité	C S T M
		N Q
	Polární-nabité	D E
		K R
AROMATICKÉ		H F W Y

K polypeptidům podle vynálezu patří také fragmenty výše

uvedených polypeptidů plné délky a jejich varianty, včetně fragmentů sekvencí uvedených jako sekvence id. č. 2 a 3. takové fragmenty si uchovávají přírodní aktivitu polypeptidů plné délky.

Vhodné fragmenty jsou alespoň 5, např. 10, 12, 15 nebo 20 aminokyselin dlouhé. Fragmenty polypeptidů sekvencí id. č. 2 nebo 3 a jejich homology mohou obsahovat jednu nebo více (např. 2, 3 nebo 10) substitucí, delecí nebo inzercí, včetně konzervativních substitucí.

Polypeptidy podle vynálezu jsou v podstatě izolované formě. Polypeptidy podle vynálezu mohou být také v podstatě purifikované formě. V takovém případě obecně polypeptid podle vynálezu představuje v polypeptidovém preparátu více než 90 %, např. 95, 98 nebo 99 %.

Polypeptidy podle vynálezu může být označen detekovatelnou značkou. Detekovatelná značka je vhodná značka, která dovoluje aby byl polypeptid detekován. K vhodným značkám patří radioizotopy, např. ^{125}I , ^{35}S , enzymy, protilátky, polynukleotidy a linkery, jako např. biotin.

Průmyslová využitelnost

Hostitelské buňky podle vynálezu mohou být použity nejen pro přípravu rekombinantních proteinů, ale také jiných požadovaných sloučenin včetně sloučenin neproteinové povahy jako jsou např. anorganické sloučeniny, a zejména vitamínů.

Sedmý aspekt předkládaného vynálezu se proto týká způsobu výroby sloučenin, který obsahuje kultivaci nebo-li fermentaci hostitelských buněk podle vynálezu v podmínkách, kde se tvoří požadovaná sloučenina. Ačkoliv sloučenina může být polypeptid, např. polypeptid podle 6. aspektu vynálezu,

může to být také sloučenina zmíněná v diskusi týkající se exprimovaných genů. Zjevně anorganické sloučeniny nejsou exprimovány z genů, ale mohou být připraveny pomocí enzymů nebo polypeptidů, kdy enzym nebo polypeptid napomáhá hostitelské buňce ve tvorbě požadované sloučeniny. Tyto sloučeniny mohou být tvořeny uvnitř buňky a pak izolovány, např. po lýzi hostitelské buňky, nebo mohou procházet stěnou hostitelské buňky do okolního média, což může být fermentační médium, např. vodný roztok. Takže hostitelské buňky se mohou kultivovat ve vodném médiu, které obsahuje buňky a živiny potřebné pro buňky, např. asimilovatelné zdroje uhlíku a/nebo dusíku.

Takto vyráběné polypeptidy mohou sloužit také pro terapeutické použití. Mohou to být léčiva nebo jiné farmakologicky účinné sloučeniny, nebo to mohou být antigenní nebo imunogenní sloučeniny, které mohou být užity jako vakcíny.

Vynález dále zahrnuje sloučeniny vyráběné tímto způsobem, ať se jedná o rekombinantní polypeptid nebo jinou sloučeninu. Specifickou sloučeninou podle vynálezu jsou vitamíny, zejména B₁₂ (kobalamin).

V některých případech se nemusejí sloučeniny izolovat ani z hostitelských buněk ani z fermentačního média. Hostitelské buňky samy o sobě se užívají pro speciální účely, např. při výrobě potravin, jako jsou např. klobásy nebo sýry, nebo jsou hostitelské buňky součástí potravy pro zvířata, např. když hostitelská buňky obsahuje sloučeninu, která má být zvířetem strávena. vynález se tedy týká také použití těchto sloučenin nebo hostitelských buněk pro výrobu potravin jako jsou např. klobásy nebo sýry. Vynález také zahrnuje potraviny a krmiva pro zvířata obsahující hostitelské buňky nebo sloučeniny vyráběné způsobem podle vynálezu.

Ve zvláště výhodném provedení vynálezu se hostitelské buňky užívají při výrobě sýrů, takže vynález zahrnuje i výrobu sýrů, kdy se jako mikroorganismy užívají hostitelské buňky podle vynálezu. Hostitelské buňky podle vynálezu se užijí místo a nebo navíc k obvykle užívaným bakteriím, např. bakteriím mléčného kvašení (tvořícím kyselinu mléčnou). Baktérie tvořící kyselinu propionovou se užívají při výrobě sýrů např. s mesofilními kulturami (typ sýru "Maasdam") nebo termofilními kulturami (typ sýru "Emmental"). Jak mesofilní tak i termofilní kultury jsou zodpovědné za kysnutí mléka nebo sýrů. Hostitelské buňky podle vynálezu mohou být využity nejen pro výrobu sýrů, ale i jiných fermentovaných potravinářských výrobků (např. jogurtů). Baktérie tvořící kyselinu propionovou se užívají při výrobě sýrů pro jejich schopnost přeměňovat laktát a cukry na kyselinu propionovou, kyselinu octovou a oxid uhličitý. Hostitelské buňky podle vynálezu, zejména pokud jde o *Propionibacterium*, mohou být použity, neboť jsou málo citlivé k nitrátům a soli, což umožní redukci nebo vynechání baktofugace mléka (která se užívá ke snížení hladiny *Clostridia*).

Fermentace hostitelských buněk může probíhat v jedné fázi nebo dvoufázově. To mohou být např. růstová fáze a/nebo produkční fáze, nebo anaerobní a/nebo aerobní fáze. Výhodná je růstová a/nebo anaerobní fáze a případně (např. jako následující) produkční a/nebo aerobní fáze.

Jak zdroj uhlíku tak i dusíku jsou komplexní zdroje nebo jednoduché sloučeniny. Výhodným zdrojem uhlíku je glukóza. Vhodným zdrojem dusíku je např. kvasinkový extrakt, amoniak nebo amonné ionty.

Výhodné charakteristiky jednoho aspektu vynálezu jsou vhodné pro ostatní aspekty vynálezu *mutatis mutandis*.

Popis obrázků

Vynález je ilustrován připojenými obrázky.

Obr. 1 je restriční mapa vektoru podle vynálezu, p545 byl získán z *P. freudenreichii* LMG 16545 (CBS 101022).

Obr. 2a a 2b jsou mapy dvou a dvou vektorů podle vynálezu.

Vynález je dále podrobněji vysvětlen a ilustrován následujícími příklady, přičemž tyto příklady vynález nijak neomezuji.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Screening kmenů *Propionibacterium*

Soubor 75 nepatogenních kmenů *Propionibacterium* byl podroben screeningu na přítomnost původních plazmidů. Většina kmenů byla získána ze sbírky BCCM/LMG (Ghent, Belgium), a některé kmeny pocházely ze sbírky ATCC (Rockville, Md., USA) nebo DSM (Braunschweig, Německo). Screening se prováděl izolací plazmidů v malém měřítku. Baktérie byly nejprve kultivovány anaerobně v médiu MRS po dobu 48 hodin při teplotě 30 °C.

Plazmidy pak byly purifikovány z baktérií postupem, který byl původně vypracován pro *E. coli*⁴, s určitými modifikacemi: Buňky z 5 ml kultivačního média byly opláchnuty v roztoku 25% sacharózy v 50mM Tris-HCl, pH 8, pak

resuspendovány v 250 μ l roztoku TENS (25% sacharóza + 50mM NaCl + 50 mM Tris-HCl + 5mM EDTA, pH 8), obsahujícím 10 mg/ml lysozymu (Boehringer Mannheim), a pak inkubovány 20 až 30 minut ve 37 °C. Bakteriální buňky pak byly lyzovány v 500 μ l 0,2N NaOH/1% SDS (2 až 5 minut inkubovány na ledu). Po přidání 400 μ l 3M NaAc, pH 4,8 (inkubace 5 minut na ledu) a následné extrakci směsí fenol/chloroform byla DNA precipitována přidáním isopropanolu.

DNA pak byla analyzována elektroforézou na 1% agarózovém gelu a vizualizována etidiumbromidem. Ačkoliv většina kmenů byla negativní, tj. neobsahovaly žádný vlastní vnitřní plazmid, z kmenů, které byly pozitivní, většina obsahovala velký plazmid (velikosti 20 kb nebo větší). Menší plazmidy byly pozorovány u šesti kmenů. Z nich *P. jensenii* LMG16453, *P. acidipropionici* ATCC4875, *P. acidipropionici* LMG16447 a nespecifikovaný kmen *Propionibacterium* (LMG16550) obsahovaly plazmidy velikosti 6 až 10 kb. Dva kmeny *P. freudenreichii* LMG16545 a *P. freudenreichii* LMG16546 ukázaly identický profil dvou plazmidů. Jeden plazmid byl velký (přesná velikost nebyla určena) a druhý plazmid byl menší, přítomný ve větším počtu a měl velikost 3,6 kb. Tyto plazmidy velikosti 3,6 kb z kmenů LMG16545 a LMG16546 byly vybrány pro další analýzy.

Příklad 2

Analýza vlastních plazmidů z kmenů LMG16545 a LMG16546

Plazmidy velikosti 3,6 kb byly izolovány z obou kmenů a dále purifikovány pomocí centrifugace na hustotním gradientu CsCl-etidiumbromid¹¹. Z obou preparátů byly

provedeny omezené restriční mapy, které se ukázaly jako shodné¹¹. Restriční mapa plazmidu velikosti 3,6 kb je uvedena na obr. 1. restriční enzymy a T4 ligáza byly od firem New England Biolabs nebo GIBCO BRL. Plazmid velikosti 3,6 kb z kmenu LMG16545 (dále označovaný jako p545) byl radioaktivně označen a použit v Southernově hybridizaci. Hybridizační podmínky byly 0,2 x SSC, 65°C. Reagoval stejně dobře s DNA extrakty z obou kmenů, LMG16545 a LMG16546, což ukazuje na blízkou příbuznost těchto kmenů, zatímco extrakty plazmidové DNA z *P.acidipropionici* ATCC4875, nesoucí plazmid pTYI nebo pR501B velikosti 6,6 kb, nereagovaly.

Sekvence DNA plazmidu byla určena užitím dideoxyribonukleotidů značených fluorescenčním barvivem pomocí autoamatického zařízení pro sekvencování Applied Biosystems 373A, tato sekvence je zde v seznamu sekvencí uvedena jako sekvence id. č. 1. Analýza sekvence byla provedena na plazmidu, který byl linearizován *EcoRI* a vložen do plazmidu pBluescript SKII+ DNA (Stratagene, La Jolla, Ca., USA) předtím naštěpeného také *EcoRI*. Počítačová analýza sekvence pomocí programu BLAST ukázala homologie s proteinem, který se účastní replikace plazmidů z několika organismů bohatých na GC (např. pAL5000 kódující *repA* and *repB* z *Mycobacterium fortuitum*^{8, 14} vykazuje 28 až 30% identitu a 34 až 38% podobnost s předpokládaným replikačním proteinem z plazmidu p545, pXZ 10142 z *Corynebacterium glutamicum* [PIR S32701] je jiným příkladem plazmidu kódujícího replikační protein homologní s předpokládaným replikačním proteinem p545). Výsledky srovnávání homologních sekvencí a sekvencí z databází jsou podrobně shrnuty v příkladech 7 a 8.

Příklad 3

Konstrukce kyvadlového vektoru *E. coli*/*Propionibacterium*

Plazmid pBR322 z *E. coli* byl štěpen *EcoRI* a *AvaI* a menší fragment takto získaný (velikosti 1,4 kb a nesoucí gen rezistence k tetracyklinu) byl nahrazen syntetickou duplexní (dvouřetězcovou) DNA. Syntetické duplexy DNA byly konstruovány tak, aby spojily *EcoRI* a *AvaI* konce a přitom poskytl řadu restrikčních míst:

5'- AATCAAGCTTGTGACGTTAACCTGCAGGCATGCGGATCCGGTACCGAT
ATCAGATCT - 3' (sekvence id. č. 4)

3' - GTTCGAACAGCTGCAATTGGACGTCCGTACGCCTAGGCCATGGCTATAGT
CTAGAAGCC - 5' (sekvence id. č. 5)

Tímto způsobem byla vnesena rozpoznávací místa pro následující restrikčními enzymy:

EcoRI (obnoveno), *HindIII*, *SalI*, *HpaI*, *PstI*, *SphI*, *BamHI*, *Acc6SI*, *EcoRV*, *BglIII* (*AvaI* nebylo obnoveno).

Syntetická DNA byla ligována s velkým fragmentem a ligační směs byla přenesena do *E. coli* (byla užita T4 ligáza). Byl tak získán plazmid požadovaného složení (pBR322ΔI). Vícečetné klonovací místo může být využito pro vložení selekčního markeru a také plazmidu p545 DNA.

Dále příklad popisuje, jak byla provedena konstrukce kyvadlového plazmidu *E. coli*/*Propionibacterium* nesoucího rezistenci k erytromycinu.

Acc65I fragment velikosti 1,7 kb z klastru genů biosyntézy erytromycinu ze *Saccharopolyspora erythraea* NRRL2338 nesoucí gen rezistence k erytromycinu^{5, 2}, -byl

vložen do plazmidu pBR322ΔI linearizovaného Acc65I. Nově připravený konstrukt nazvaný pBRES, byl linearizován EcoRV a ligován s p545 DNA, která byla předtím naštěpena BsaBI. Byly pak nalezeny transformanty *E. coli* nesoucí vektor se správným inzertem v obou orientacích. Výsledné plazmidové vektory byly označeny pBRESP36B1 a pBRESP36B2 (obrázky 2a a 2b).

Konstrukty plazmidových vektorů byly také připraveny s p545 DNA linearizovanou v jiném restrikčním místě ležícím vně předpokládaného replikačního úseku, zejména AlwNI. Pro tyto konstrukce musel být vektor pBRES opatřen vhodným klonovacím místem. Byl zkonstruován adaptor, složený ze dvou komplementárních oligonukleotidů následujících sekvencí (sekvence id. č. 6 a 7):

5'- GTACCGGCCGCTGCGGCCAAGCTT -3'

5'- GATCAAGCTTGGCCGCAGCGGCCG -3'

Nasednutí těchto oligonukleotidů vytvořilo fragment dvouřetězcové DNA s kohezivními konci Acc65I 5 a BgIII, který navíc obsahoval vnitřní místo SfiI, které poskytlo kompatibilitu s plazmidem p545 naštěpeným AlwNI. Tento adaptor byl klonován do pBRES mezi místo BgIII a proximální místo Acc65I. Takto získaný vektor pBRES-Sfi byl pak štěpen SfiI a ligován do plazmidu p545 naštěpeného AlwNI. Transformace *E. coli* poskytla transformanty se správným vektorem, jak bylo potvrzeno restriční analýzou. Takto připravený vektor byl označen pBRESP36A (obr. 2).

Příklad 4

Transformace *Propionibacterium* kyvadlovými vektory
E. coli/Propionibacterium

Tento příklad popisuje transformaci bakterií *Propionibacterium freudenreichii* kmenu ATCC 6207 vektorem pBRESP36B.

Bakteriální buňky byly kultivovány v médiu SLB (médiu obsahující laktát sodný¹⁷) při 30 °C až do stacionární fáze a pak bylo kultivační médium naředěno 1:50 čerstvým médiem SLB. Po inkubaci přibližně 20 hodin ve 30 °C byly buňky (nyní v exponenciální růstové fázi) sklizeny a důkladně propláchnuty v chladném roztoku 0,5M sacharózy. Pak byly buňky jednou opláchnuty elektroporačním pufrem, což je 0,5M sacharóza pufrovaná 1mM acetátem draselným, pH 5,5, a nakonec resuspendovány v totéž elektroporačním pufru v 1/100 původního objemu. V průběhu celého postupu byly buňky drženy na ledu.

Pro elektroporaci (na zařízení od firmy BIORAD) bylo 80 až 100 µl suspenze buněk smícháno s přibližně 1 µg DNA (nebo menším množstvím) v chlazené 1 nebo 2 mm elektroporační kyvetě a pak byly aplikovány elektrické pulzy. Optimální parametry byly 25kV/cm při rezistanci 200 Ω a kapacitanci 25 µF. Avšak i použití nižšího a vyššího napětí (také při 100 Ω) poskytlo transformanty.

Bezprostředně po aplikaci pulzu bylo k suspenzi buněk přidáno 900 µl SLB obsahujícího 0,5M sacharózu a buňky pak byly inkubovány 2,5 až 3 hodiny ve 30 °C ještě před tím, než byly vysety ve vhodném ředění na SLB/agarové plotny obsahující 0,5M sacharózu a 10 µg/ml erytromycinu. Po 5 až 7

dnech inkubace ve 30 °C v anaerobních podmínkách byly detekovány transformanty.

Použití DNA izolované z *E. coli* DH5 α (Promega) vedlo k transformační účinnosti 20 až 30 transformant na 1 μ g DNA. 10x až 100x vyšší účinnosti bylo dosaženo, když DNA byla izolována z kmenu *E. coli* JM110 (dam⁻, dcm⁻). Transformace *E. coli* byla provedena podle instrukcí firmy BIORAD.

Transformanty obsahovaly autentický vektor, nerozlišitelný od původní DNA použité pro transformaci ATCC6207. To bylo prokázáno restriční analýzou plazmidové DNA izolované z transformant preparací v malém měřítku, jak bylo již zmíněno výše.

Vektory byly přítomny výlučně jako autonomně se replikující plazmidy. Analýza celkové izolované DNA Southernovou hybridizací¹³ ukázala, že chromozomální DNA nehybridizovala s vektorovou DNA použitou jako sonda, což ukazuje, že nedošlo k žádné integraci plazmidové DNA do chromozómu.

Transformace byla také úspěšná s vektory pBRESP36B2 a pBRESP36A, což ukazuje, že funkčnost těchto vektorů není závislá na orientaci p545 nebo na užitém klonovacím místě. Také v tomto případě byla autenticita vektorů potvrzena.

Kromě toho transformace kmenu *P. freudenreichii* ATCC6207 DNA izolovanou z transformant *Propionibacterium* vedla k 10⁵- až 10⁶-násobnému zvýšení transformační účinnosti ve srovnání s transformační účinností dosaženou s DNA izolovanou z *E. coli* DH5 α .

Transformace dalšího kmenu *P. freudenreichii* LMG16545 (tentýž kmen, ze kterého byl získán plazmid p545) byla se stejnou účinností jako u ATCC kmenů.

Výsledky transformací a vliv na produkci vitamínu B₁₂ jsou ukázány v následující tabulce.

identifikace kmenu	transformovaný plazmid	vitamín B ₁₂ (mg/g sušiny)
COB 1	pBRES36COB	0,57
COB2	pBRES36COB	0,67
COB3	pBRES36COB	0,83
COB4	pBRES36COB	0,68
COB5	pBRES36COB	0,69
COB6	pBRES36COB	0,61
COB7	pBRES36COB	0,53
COB8	pBRES36COB	0,64
COB9	pBRES36COB	0,50
COB10	pBRES36COB	0,74
recATCC6207	pBRESP36B2	0.54

Osm z deseti transformant poskytlo až o 50 % vyšší obsah vitamínu B₁₂ než kontrolní kmen.

Příklad 5

Konstrukce plazmidového vektoru obsahujícího gen *cobA*

Tento příklad popisuje konstrukci a aplikaci plazmidového vektoru ke zvýšení syntézy vitamínu B₁₂ (kobalaminu) v kmenu *P. freudenreichii* ATCC6207.

Promotorový úsek genu kódujícího rezistenci k erytromycinu v *Saccharopolyspora erythraea*^{2,3} byl připraven pomocí PCR užitím následujících oligonukleotidových primerů (sekvence id. č. 8 a 9):

Přímý primer: (5' - 3')

AAACTGCAGCTGCTGGCTTGCGCCCGATGCTAGTC

Zpětný primer: (5' - 3')

AAACTGCAGCAGCTGGGCAGGCCGCTGGACGGCCTGCCCTCGAGCTCGT

CTAGAATGTGCTGCCGATCCTGGTTGC

Takto připravený PCR fragment obsahoval místo AlwNI na 5'-konci následované autentickou promotorovou oblastí a úsekem prvních 19 aminokyselin kódující sekvence genu rezistence k erytromycinu, aby byla zajištěna správná iniciace transkripce a translace. Na 3'-konci jsou místa XbaI a XhoI (pro vložení genu *cobA* v dalším kroku), terminační sekvence "downstream" (po směru transkripce) od genu rezistence k erytromycinu a místo AlwNI.

PCR produkt byl štěpen AlwNI a klonován do pBRESP36B2 parciálně štěpeného AlwNI. Ze dvou míst AlwNI přítomných v pBRESP36B2 je pouze místo přítomné ve specifickém úseku p545 vhodné pro vložení fragmentu. Byly získány transformanty *E. coli* nesoucí očekávaný konstrukt označený pBRES36pEt. tento vektor byl použit pro další konstrukce, jak bude popsáno dále.

Kódující sekvence *cobA*, tj. genu kódujícího uroporfyrinogen III methyltransferázu, byla připravena pomocí PCR z kmenu *Propionibacterium freudenreichii* ATCC6207, užitím následujících oligonukleotidových primerů (sekvence id. č. 10 a 11):

Přímý: (5' - 3')

CTAGTCTAGACACCGATGAGGAAACCCGATGA

Zpětný: (5'- 3')

CCCAAGCTTCTCGAGTCAGTGGTCGCTGGGCGCGCG

Amplifikovaný gen *cobA* nese místo *XbaI* na N-konci kódujícího úseku a místa *HindIII* a *XhoI* na C-konci kódujícího úseku.

Funkčnost tohoto *cobA* genu byla ověřena klonováním PCR produktu jakožto *XbaI-HindIII* fragmentu do vektoru pUC18 a následnou transformací do *E. coli* kmen JM109. Transformanty s funkčním genem *cobA* vykazovaly jasně červenou fluorescenci při ozáření UV světlem. Plazmid izolovaný z těchto transformant byl štěpen *XbaI* a *XhoI* a ligován do stejně naštěpeného pBRESP36B2 a použit pro transformaci *E. coli*. DNA z několika transformant pak byla analyzována štěpením restriktivními enzymy a elektroforézou na agarózovém gelu. Bylo zjištěno, že transformanty obsahovaly v expresním vektoru správný inzert. Tento nový vektor byl označen pBRES36COB. Tento vektor byl poté přenesen do *P. freudenreichii* ATCC6207 způsobem již výše popsáním. Deset transformant bylo analyzováno a bylo zjištěno, že nesou vektor pBRES36COB, který byl nerozlišitelný od původního vektoru použitého pro transformaci, jak ukázala restriktivní analýza. U těchto deseti transformant byla stanovena hladina vitamínu B₁₂ následujícím způsobem:

Zmrazené kultury *Propionibacterium* transformant 1 až 10 a kontrolního kmenu obsahujícího pouze vektorový plazmid pBRBSP36B2 byly inokulovány do 100ml kultivačních lahví obsahujících 50 ml média BHI (Brain Heart Infusion, Difco) a inkubovány 72 hodin ve 28 °C bez třepání. Z těchto předběžných kultur byly 4 ml přeneseny do 200 ml produkčního média následujícího složení: Difco kvasničný extrakt 15 g/l, laktát sodný 30 g/l, KH₂PO₄ 0,5g/l, MnSO₄ 0,01 g/l, a CoCl₂

0,005 g/l, do 500ml protřepávané kultivační lahve a inkubovalo se 56 hodin ve 28 C bez třepání a pak 48 hodin na rotační třepačce (New Brunswick) při 200 rpm.

Titry vitamínu B₁₂ byly měřeny pomocí HPLC známým postupem. Devět z deseti transformant vykazovalo přibližně o 25 % vyšší tvorbu vitamínu B₁₂ než kontrolní kmen.

Příklad 6

Stabilita plazmidů

Všechny tři kyvadlové vektory pBRESP36A, pBRESP36B 1 a pBRESP36B2 byly stabilně udržovány po více než 30 generací kultivace příslušných transformant. Přitom nedošlo ke ztrátě genu rezistence k erytromycinu, jak se dá soudit z vyhodnocení porovnání životaschopnosti na selektivních (tj. obsahujících erytromycin) a neselektivních agarových plotnách. Strukturní stabilita plazmidu v transformantách byla stanovena izolací plazmidové DNA po 30 generacích a restrikcí mapováním jak bylo popsáno výše. Výsledkem bylo, že byly pozorovány pouze stejné fragmenty jako u autentického plazmidu.

Příklad 7

Analýza sekvenční homologie v databázi pro predikci polypeptidu kódovaného prvním otevřeným čtecím rámcem (sekvence id. č. 2)

MDSFETLFPESWLPRKPLASAEKSGAYRHVTRQRALELPYIEANPLVMQSLV
 ITDRDASDADWAADLAGLPSYVSMNRVTTTGHIVYALKNPVCLTDAARR
 RPINLLARVEQGLCDVLGGDASYGHRITKNPLSTAHATLWGPADALYELRA
 LAHTLDEIHALPEAGNPRRNVTSTVGRNVTLFDTTMRWAYRAVRHSWGG
 PVAEWEHTVFEHIHLLNETIIAD

Výše znázorněná sekvence 227 aminokyselin (ORF1) byla přiřazena a porovnána s několika dalšími proteinovými sekvencemi (cíl NBRF-PIR, verze PIR R52.0 březen 1997, parametry "cut-off" 45 a "KTUP" 2).

S proteinem z plazmidu pAL 5,000 (J50052) z *Mycobacterium fortuitum* byla nalezena 37,1% shoda v úseku 194 aminokyselin (INIT 167, 292). S proteinem z *Corynebacterium glutamicum* (532701) byla nalezena 32,0% shoda v úseku 125 aminokyselin (INIT 125, 116). S proteinem Cole2 z *E. coli* (S04455) byla nalezena 29,9% shoda v úseku 221 aminokyselin (INIT 86, 259).

Příklad 8

Analýza sekvenční homologie v databázi pro predikci polypeptidu kódovaného druhým otevřeným čtecím rámcem (sekvence id. č. 3)

MTTRERLPRN GYSIAAAAKK LGVSESTVKR WTSEPREEFV ARVAARHARI
 RELRSEGQSM RAIAAEVGVV VGTVHYALNK NRTDA

Výše znázorněná aminokyselinová sekvence druhého proteinu (ORF2) byla také porovnána s několika dalšími proteiny, a sice stejným programem za užití stejných parametrů jako v předchozím příkladu 7. Tato sekvence je

dlouhá pouze 85 aminokyselin.

Při srovnání sekvence ORF2 s proteinem z *Mycobacterium fortuitum* (532702) byla nalezena 53,3% shoda v úseku 75 aminokyselin (INIT 207, 207).

Příklad 9

Funkční analýza plazmidu p545

Aby bylo možné další zlepšování vektorového systému, byly plazmidové funkce esenciální pro replikaci a stabilitu vymezeny podrobněji pomocí delecí rozsáhlých úseků původního plazmidu p545. Výsledkem byl menší klonovací vektor, který umožňuje použít vektorový systém založený na p545 pro klonování větších fragmentů DNA.

Pro tento účel byl vektor pBRESP36A (Obr. 2) štěpen *SstII* and *BcII*, což poskytlo fragmenty velikosti 1,7 a 6,5 kb. Fragment velikosti 1,7 kb, ve skutečnosti *AlwNI-BcII* fragment velikosti 1,6 kb z plazmidu p545 byl nahrazen syntetickým DNA duplexem (dvoušroubovicovou DNA) vytvořeným ze sekvencí id. č. 12 a 13 s kompatibilními konci *SstII* a *BcII* a řadou rozpoznávacích míst pro restriční enzymy.

sekvence id. č. 12: 5'- GGAGATCTAGATCGATATCTCGAG -3'

sekvence id. č. 13: 5'- GGAGATCTAGATCGATATCTCGAG -3'

Tímto způsobem byla vnesena následující místa:

SstII (obnoveno), *BgIII*, *XbaI*, *ClaI*, *EcoRV*, *XhoI*, (*BcII* nebylo obnoveno).

Ligační směs byla transformována do *E. coli* a byly

selektovány transformanty obsahující vektor očekávaného složení. Vektor byl označen pBRESAAS-B. Následná úspěšná transformace *P. freudenreichii* ATCC6207 tímto vektorem ukázala, že úsek velikosti 1,6 kb mezi místy *AlwNI* a *BclI* v p545 není esenciální pro replikaci plazmidu. Další delece byla provedena odstraněním úseku velikosti 240 bp mezi místy *SalI* a *BclI* v plazmidu p545. Toho bylo dosaženo štěpením pBRESAAS-B enzymy *SalI* se *SstI* a *SstI* s *XhoI* a pak izolací fragmentu *SalI-SstI* velikosti 1,3 kb a fragmentu *SstI-XhoI* velikosti 6,6 kb. Fragmenty pak byly ligovány a ligační směs byla transformována do *P. freudenreichii* ATCC6207, což poskytlo četné transformanty. Nově získaný konstrukt nazvaný pBRESAAS-S byl izolován a jeho struktura byla potvrzena restriční mapováním.

Bylo tak zjištěno, že všechny esenciální informace pro replikaci plazmidu p545 leží na fragmentu velikosti 1,7 kb vymezeném restričními místy *SalI* a *AlwNI* a zahrnujícím predikované replikační proteiny kódované ORF1 a ORF2, a že fragment velikosti 1,8 kb může být odstraněn, aniž by došlo k poškození replikace nebo stability plazmidu.

Příklad 10

Exprese genu rezistence k chloramfenikolu z *Corynebacterium*

Gen rezistence k chloramfenikolu (*cml*) z *Corynebacterium*¹⁸ byl identifikován jako gen kódující protein exportující chloramfenikol. Tento gen byl vložen do kyvadlového vektoru *Propionibacterium* - *E. coli* pBRESP36B2. Vektor byl pak štěpen *BgIII* s *HindIII* a *BgIII* s *HpaI*. Byly izolovány fragmenty *BgIII* - *HindIII* velikosti 2,9 kb

a *BgIII-HpaI* 5,2 kb. fragment obsahující gen *cml* včetně jeho vlastního promotoru byl získán štěpením *PvuII* a *HindIII* a izolováním fragmentu velikosti 3,3 kb. vektorově specifický fragment a fragment obsahující gen byly ligovány. Konce *PvuII* a *HpaI* jsou tupé, takže vložení genu *cml* současně vedlo k obnovení genu *ermE* původního vektoru. Ligační směs pak byla transformována do *E. coli* a bylo selektováno 20 transformant, kde vektor obsahoval správný inzert *cml*. Vektor byl označen pBRESBCM.

Transformace *P. freudenreichii* ATCC6207 tímto vektorem a selekce na plotnách obsahujících 10 µg/ml erytromycinu nebo 5 µg/ml chloramfenikolu poskytla kolonie rezistentní k erytromycinu a chloramfenikolu, což ukázalo, že kromě genu rezistence k erytromycinu (ukázaném již dříve v kyvadlovém *Propionibacterium-E. coli* vektoru) byl v *Propionibacterium* exprimován také gen rezistence k chloramfenikolu. Transformanty mohly být kultivovány v tekutém médiu obsahujícím chloramfenikol v koncentraci až 20 µg/ml.

Příklad 11

Exprese genu lipázy (*gehA*) z *P. acnes*

Pro ilustraci účinnosti klonování a exprese extracelulárního proteinu užitím expresního systému podle předkládaného vynálezu byl vybrán gen *gehA* z *P. acnes*¹⁹.

Vektor pUL6001 nesoucí gen *gehA* na *XhoI* fragmentu byl štěpen *XhoI* a byl izolován fragment velikosti 2,7 kb obsahující požadovaný gen. Vektor pBRESAAS-B (z příkladu 9) byl linearizován *XhoI* a konce byly defosforlyčovány telecí intestinální fosfatázou, aby se zabránilo spojení vlastních

konců (selfligaci). Linearizovaný vektor a fragment obsahující gen *gehA* byly ligovány a ligační směs byla transformována do *E. coli*. Transformanty byly analyzovány restriktčními enzymy na přítomnost správného rekombinantního plazmidu, který byl označen pBRESALIP. Tento plazmid byl pak přenesen do *P. freudenreichii* ATCC6207. Transformanty byly podrobeny screeningu na expresi lipázového genu, a sice na agarových plotnách obsahujících tributyrin jakožto indikátor zvýšené exprese lipázy. Transformované *P. freudenreichii* nesoucí pBRESALIP ukázaly významně větší "aureolu" v tomto testu ve srovnání s netransformovaným kmenem nebo kmenem transformovaným původním vektorem.

CITOVANÉ PUBLIKACE

1. Altschul *et al*, J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)
2. Bibb *et al.*, Gene 38, 215 (1985)
3. Bibb *et al.*, Mol. Microbiol. 14(3), 533 (1984)
4. Birnboim and Doly, Nucleic Acids Res. 7, 1513 (1979)
5. Blanche, Anal. Biochem. 189, 24 (1990)
6. DeMan *et al*, J. Appl. Bacteriol. 36, 130 (1960)
7. Deveraux *et al*, Nucleic Acids Research. 12:387-395 (1984)
8. Labidi *et al*, Plasmid 27, 130 (1992)
9. Rehberger and Glatz, Appl. Environ. Microbiol. 59, 83 (1990)
10. Rossi *et al*, Res. Microbiol. 147, 133 (1996)
11. Sambrook *et al*, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)
12. Sattler *et al*, J. Bact. 177, 1564 (1995)
13. Southern, J. Mol. Biol. 98, 503 (1975)
14. Stolt and Stoker, Microbiol. 142, 2795 (1996)
15. Thompson *et al*, Gene 20, 51 (1982)
16. Uchijama and Weisblum, Gene 38, 103 (1985)
17. de Vries *et al*, J. Gen. Microbiol. 71, 515 (1972)
18. Tauch *et al*, Plasmid 40(2): 126 (1998)
19. Miskin *et al*, Microbiol 143: 1745 (1997)

PŘEHLED UVEDENÝCH SEKVENCÍ

1. Sekvence plazmidu LMG 16545 (CBS 101022), 3,6 kb.
2. Aminokyselinová sekvence proteinu ORF1 (303 zbytků, báze 273 až 1184).
3. Aminokyselinová sekvence proteinu ORF2 (85 zbytků, báze 181 až 1438).
4. až 13. DNA sekvence primerů/oligonukleotidů

SEZNAM SEKVENCÍ

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 3555 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: dvojité
- (D) TOPOLOGIE: kruhová

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iv) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: *Propionibacterium freudenreichii*
- (B) IZOLÁT: CBS 101022 LMG 16545

(ix) DALŠÍ ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
- (C) POZICE: 273...1184
- (D) DALŠÍ INFORMACE: gen="ORF1"

(ix) DALŠÍ ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
- (B) POZICE: 1181...1438
- (D) DALŠÍ INFORMACE: gen="ORF2"

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 1:

GTCGACCCTG ACAGCCGGCG AGCAGTTCAG GCGAAGATCG CACAGCTGCG CGAGGAACTA
60

GCCGCAATGC CCGAACACGC CCCAGCCATC CCTTGGAGCA GGTGGCAGCG TCAGGGGAGT
120

CGGGGGATGT TTGGCAGGGG ATGTGGAAG AGAGTTCGCT TTGCTCACAT GGCTCAACCG
180

GGTAACTAAC TGATATGGGG TCTTCGTCGC CCACTTTGAA CACGCCGAGG AATGGACCAC
240

GCTGAACGTG ACTCGCATGC TTCCTGTCAT GT ATG GAT TCG TTC GAG ACG TTG
293

Met Asp Ser Phe Glu Thr Leu
1 5

TTC CCT GAG AGC TGG CTG CCA CGC AAG CCG CTG GCG TCA GCC GAG AAG
341

Phe Pro Glu Ser Trp Leu Pro Arg Lys Pro Leu Ala Ser Ala Glu Lys
10 15 20

TCT GGG GCG TAC CGG CAC GTG ACT CGG CAG AGG GCG CTG GAG CTG CCT
389

Ser Gly Ala Tyr Arg His Val Thr Arg Gln Arg Ala Leu Glu Leu Pro
25 30 35

TAC ATC GAA GCG AAC CCG TTG GTC ATG CAG TCC TTG GTC ATC ACC GAT
437

Tyr Ile Glu Ala Asn Pro Leu Val Met Gln Ser Leu Val Ile Thr Asp
40 45 50 55

CGA GAT GCT TCG GAT GCT GAC TGG GCC GCA GAC CTC GCT GGG CTG CCT
485

Arg Asp Ala Ser Asp Ala Asp Trp Ala Ala Asp Leu Ala Gly Leu Pro
60 65 70

TCA CCG TCC TAC GTG TCC ATG AAC CGT GTC ACG ACC ACC GGA CAC ATC
533

Ser Pro Ser Tyr Val Ser Met Asn Arg Val Thr Thr Thr Gly His Ile
75 80 85

GTC TAT GCC TTG AAG AAC CCT GTG TGT CTG ACC GAT GCC GCG CGG CGA
581

Val Tyr Ala Leu Lys Asn Pro Val Cys Leu Thr Asp Ala Ala Arg Arg
90 95 100

CGG CCT ATC AAC CTG CTC GCC CGC GTC GAG CAG GGC CTA TGC GAC GTT
629

Arg Pro Ile Asn Leu Leu Ala Arg Val Glu Gln Gly Leu Cys Asp Val
105 110 115

CTC GGC GGC GAT GCA TCC TAC GGG CAC CGG ATC ACA AAG AAC CCG CTC
677

Leu Gly Gly Asp Ala Ser Tyr Gly His Arg Ile Thr Lys Asn Pro Leu
120 125 130 135

AGC ACC GCC CAT GCG ACC CTC TGG GGC CCC GCA GAC GCG CTC TAC GAG
725

Ser Thr Ala His Ala Thr Leu Trp Gly Pro Ala Asp Ala Leu Tyr Glu
140 145 150

CTG CGC GCC CTC GCA CAC ACC CTC GAC GAG ATC CAC GCA CTG CCG GAG
773

Leu Arg Ala Leu Ala His Thr Leu Asp Glu Ile His Ala Leu Pro Glu
155 160 165

GCA GGG AAC CCG CGT CGC AAC GTC ACC CGA TCA ACG GTC GGC CGC AAC
821

Ala Gly Asn Pro Arg Arg Asn Val Thr Arg Ser Thr Val Gly Arg Asn
170 175 180

GTC ACC CTG TTC GAC ACC ACC CGC ATG TGG GCA TAC CGG GCC GTC CGG
869

Val Thr Leu Phe Asp Thr Thr Arg Met Trp Ala Tyr Arg Ala Val Arg
185 190 195

CAC TCC TGG GGC GGC CCG GTC GCC GAA TGG GAG CAC ACC GTA TTC GAG
917

His Ser Trp Gly Gly Pro Val Ala Glu Trp Glu His Thr Val Phe Glu
200 205 210 215

CAC ATC CAC CTA CTG AAC GAG ACG ATC ATC GCC GAC GAA TTC GCC ACA
965

His Ile His Leu Leu Asn Glu Thr Ile Ile Ala Asp Glu Phe Ala Thr
220 225 230

GGC CCC CTC GGC TTG AAC GAA CTT AAG CAC TTA TCT CGA TCC ATT TCC
1013

Gly Pro Leu Gly Leu Asn Glu Leu Lys His Leu Ser Arg Ser Ile Ser
235 240 245

CGA TGG GTC TGG CGC AAC TTC ACC CCC GAA ACC TTC CGC GCA CGC CAG
1061

Arg Trp Val Trp Arg Asn Phe Thr Pro Glu Thr Phe Arg Ala Arg Gln
250 255 260

AAA GCG ATC AGC CTC CGT GGA GCA TCC AAA GGC GGC AAA GAA GGC GGC
1109

Lys Ala Ile Ser Leu Arg Gly Ala Ser Lys Gly Gly Lys Glu Gly Gly
265 270 275

CAC AAA GGC GGC ATT GCC AGT GGC GCA TCA CGG CGC GCC CAT ACC CGT
1157

His Lys Gly Gly Ile Ala Ser Gly Ala Ser Arg Arg Ala His Thr Arg
280 285 290 295

CAA CAG TTC TTG GAG GGT CTC TCA TGACCACACG TGAACGTCTC CCCCACAACG
1211

Gln Gln Phe Leu Glu Gly Leu Ser
300

GCTACAGCAT CGCCGCTGCT GCGAAAAAGC TCGGTGTCTC CGAGTCCACC GTCAAGCGGT
1271

GGACTTCCGA GCCACGCGAG GAGTTCGTGG CCCGCGTTGC CGCAGCCAC GCGCGGATTC
1331

GTGAGCTCCG CTCGGAGGGT CAGAGCATGC GTGCGATTGC TGCCGAGGTC GGGGTTTCCG
1391

TGGGCACCGT GCACTACGCG CTGAACAAGA ATCGAACTGA CGCATGACCG TAACGCCGCA
1451

CGATGAGCAT TTTCTTGATC GTGCACCGCT TGGCACTACG TTCGCGTGCG GTTGACAGT
1511

GCGCGCCACG TTCTTATCCT GCGGCCATTG TGGCTACAGC CAATGGGGGG CATCAGCAAC
1571

GGACGTTGAA CCCGGTGGGC AAGTGTTACT CAGGGGGACA TGCCCACTCT GCGGCGCTCG
1631

GATTGACGGT ATGGCAGTCG TGCATGCGGC CCCACCGTCA AACTCATTCA GGTATCAGTG
1691

AGAACCCTCA TGGCACCCCC TCGTGACACG TTCTCGTTGC GATCAGCTGC TGTGCGTGCG
1751

GGCGTGAGCG TTTCTACGCT GCGGCGCAGG AAATCAGAGC TTGAGGCTGC CGGAGCGACG
1811

GTAGACCCGT CCGGTTGGGT GGTGCCACTG CGTGCACTCA AGGTCGTTTT TGGGGTGTC
1871

GATGAGACCT CGAATGCGCC CGGTCATGAC GCTGAGTTAG TGGCGCAGCT GCGCTCTGAG
1931

AACGAGTTTT TACGGCGTCA GGTGAGCAG CAGGCGCGCA CGATCGAACG GCAGGCTGAG
1991

GCACACGCGG TGGTCTCAGC GCAGCTCACA CGGGTTGGCC AGCTTGAGGC CGGCGACGCA
2051

GCAGCACCGA CACTGGCACC CGTTGAAAGG CCGGCTCCGC GACGGCGGTG GTGGCAGCGT
2111

CGGTAGCGGT CAGGATCGCT CTGGCGTGAC GAGTGTGTCT GGCAGTGCGA ACAGTTGCTC
2171

GACCACTGGC AGCAGAAGCG AGATCGCTGC GTGGTGCTGT TCCTCGGTCA GTTCGTCGAG
2231

GACTGGCGGG TCTTGCTGCG TCCAGCCGAT CGCCTCGGCG GCCAAGGTCA GTTCCAAGCT
2291

GTGCCAACGC ACACGCCCCCT CGGCTGACAG CTGAGTCTCG AACTGTGCAA CTGGACCGGC
2351

CGGAAGATGC ACGTTGCCGA GGTGCTGAGT GGCCAAGCGC ACGTCAAAGA GTGCTGCTTC
2411

GTAGCCGCGC AGAAATGGCA GTGCTCGGTC GATTCCGATC GGCCTGCCCA GGTACATTCC
2471

GGGCCGCTTG ATGAACGCCT CCGCGTAGAA GCGCACCGTT CTCGGCCCCG CTCGCTGATC
2531

TGTCACTGTG CACGCTCCTC TCGATGGTTC TCGACGCTAC CGGAGACCAC CGACGTTTCAT

2591

GGCCAGCGCA GCGACCTGAA AGGACCAAGC CGAGTTAGCC GTGCTAACCG TATAGCTTGC
2651

TCCGTCGCCT CTGAGGGCAA CCACCTGCGC AGCAGGTGGG CGGCAGCCCG CGCGCAAGCG
2711

CCTACCGGGT TTGGGCACAG CCCATAAATC AACGCCTCCG GTGTTGAAGC GATCGTGTGT
2771

CACGATTGCT ATGCTTGCTA CCCCTTCAGG GTTTTCGTAT ACACAAATCA AGTTTTTTCG
2831

TATACGCTAA TGCCATGAGT GAGCATCTAC TGCACGGCAA GCCCCTCACC AACGAGCAGA
2891

TTCAGGCATG GGCAGACGAG GCCGAGGCCG GATACGACCT GCCCAAACCTC CCCAAGCCAC
2951

GGCGCGGACG CCCGCCCGTA GGAGACGGTC CGGGCACCCT CGTACCCGTG CGTCTCGACG
3011

CGGCCACCCT TGCCGCTCTC ACAGAACGAG CAACAGCCGA GGGCATCACG AACCGTTCAG
3071

ACGCGATCCG AGCCGCAGTC CACGAGTGGA CACGGGTTGC CTGACCTCCA CGACTCAGCA
3131

CGCAAGCACT ACCAACGAGA CCGGCTCGAC GACACGGCCG TGCTCTACGC GGCCACCCAC
3191

GTTCTCAACT CCCGGCCACT CGACGACGAA GACGACCCGC GCCGCTGGCT CATGATCGGA
3251

ACCGACCCAG CAGGCCGCCT ACTCGAACTC GTCGCACTGA TCTACGACGA CGGCTACGAA
3311

CTGATCATCC ACGCAATGAA AGCCCGCACC CAATACCTCG ACCAGCTCTA ACCAAGAAAG
3371

GAACCTGATG AGCGACCAGC TAGACAGCGA CCGCAACTAC GACCCGATGA TCTTCGACGT
3431

GATGCGCGAG ACCGCGAACC GCGTCGTCGC CACGTACGTT GCATGGGAAG ATGAAGCCGC
3491

TGATCCCCGC GAGGCTGCGC ACTGGCAGGC CGAGCGATTG CGCACCCGGC ACGAGGTGCG
3551

CGCC
3555

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 303 aminokyselin

(B) TYP: aminokyseliny

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 2:

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

Ile Ala Asp Glu Phe Ala Thr Gly Pro Leu Gly Leu Asn Glu Leu Lys
225 230 235 240

His Leu Ser Arg Ser Ile Ser Arg Trp Val Trp Arg Asn Phe Thr Pro
245 250 255

Glu Thr Phe Arg Ala Arg Gln Lys Ala Ile Ser Leu Arg Gly Ala Ser
260 265 270

Lys Gly Gly Lys Glu Gly Gly His Lys Gly Gly Ile Ala Ser Gly Ala
275 280 285

Ser Arg Arg Ala His Thr Arg Gln Gln Phe Leu Glu Gly Leu Ser
290 295 300

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 85 aminokyselin

(B) TYP: aminokyseliny

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 3:

Met Thr Thr Arg Glu Arg Leu Pro Arg Asn Gly Tyr Ser Ile Ala Ala
1 5 10 15

Ala Ala Lys Lys Leu Gly Val Ser Glu Ser Thr Val Lys Arg Trp Thr
20 25 30

Ser Glu Pro Arg Glu Glu Phe Val Ala Arg Val Ala Ala Arg His Ala
35 40 45

Arg Ile Arg Glu Leu Arg Ser Glu Gly Gln Ser Met Arg Ala Ile Ala
50 55 60

Ala Glu Val Gly Val Ser Val Gly Thr Val His Tyr Ala Leu Asn Lys
65 70 75 80

Asn Arg Thr Asp Ala
85

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 4:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 59 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (syntetická)

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 4:

AATTCAAGCT TGTCGACGTT AACCTGCAGG CATGCGGATC CGGTACCGAT ATCAGATCT
59

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 5:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 59 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (syntetická)

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 5:

CCGAAGATCT GATATCGGTA CCGGATCCGC ATGCCTGCAG GTTAACGTCG ACAAGCTTG
59

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 6:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 24 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (syntetická)

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 4:

GTACCGGCCG CTGCGGCCAA GCTT
24

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 7:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 24 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (syntetická)

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 7:

GATCAAGCTT GGCCGCAGCG GCCG

24

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 8:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 35 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (syntetická)

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 8:

AAACTGCAGC TGCTGGCTTG CGCCCGATGC TAGTC

35

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 9:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 76 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (syntetická)

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 9:

AAACTGCAGC AGCTGGGCAG GCCGCTGGAC GGCCTGCCCT CGAGCTCGTC TAGAATGTGC

60

TGCCGATCCT GGTTC

76

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 10:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 32 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (syntetická)

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 10:

CTAGTCTAGA CACCGATGAG GAAACCCGAT GA
32

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 11:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 36 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (syntetická)

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 11:

CCCAAGCTTC TCGAGTCAGT GGTGCTGGG CGCGCG

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 12:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 24 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (syntetická)

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 12:

GGAGATCTAGATCGATATCTCGAG
24

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 13:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 30 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (syntetická)

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S ID. Č. 13:

GATCCTCGAGATATCGATCTAGATCTCCGC

30

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Polynukleotid obsahující sekvenci schopnou selektivně hybridizovat se
 - a) sekvencí id. č. 1 nebo sekvencí k ní komplementární,
 - b) sekvencí z plazmidu o velikosti 3,6 kb
z *Propionibacterium freudenreichii* CBS 101022,
 - c) sekvencí z plazmidu o velikosti 3,6 kb
z *Propionibacterium freudenreichii* CBS 101023, nebo
 - d) sekvencí kódující polypeptid, který obsahuje sekvenci id. č. 2 nebo 3, nebo aminokyselinovou sekvenci, která je v podstatě homologní k jedné z těchto sekvencí nebo je fragmentem jedné z těchto sekvencí.
2. Polynukleotid, kterým je autonomně se replikující plazmid, který zůstává extrachromozomální uvnitř hostitelské buňky, přičemž tento plazmid je odvozen z endogenního plazmidu *Propionibacterium*, a který obsahuje heterologní gen schopný exprese v hostitelské buňce.
3. Polynukleotid podle nároku 1, který se autonomně replikuje v hostitelské buňce.
4. Polynukleotid podle nároku 3, kde hostitelská buňka je *Propionibacterium*.
5. Polynukleotid podle nároku 4, kde *Propionibacterium* je *Propionibacterium freudenreichii*.
6. Polynukleotid podle kteréhokoliv z předchozích nároků,

který je schopný selektivně hybridizovat s jednou nebo více sekvencemi ze sekvence id. č. 1, které jsou nutné pro autonomní replikaci v *Propionibacterium*.

7. Polynukleotid podle nároku 1, který obsahuje buďto fragment velikosti 1,7 kb ze sekvence id. č. 1 vymezený restrikcčními místy *SalI* a *AlwNI* nebo fragment vymezený nukleotidy 1 až 1750 sekvence id. č. 1.
8. Vektor, který obsahuje polynukleotid podle kteréhokoliv z předchozích nároků.
9. Vektor podle nároku 8, který je plazmid.
10. Vektor podle nároku 8 nebo 9, který navíc obsahuje selekční marker.
11. Vektor podle kteréhokoliv z nároků 8 až 10, který se autonomně replikuje v *E. coli*.
12. Vektor podle kteréhokoliv z nároků 8 až 11, který je expresní vektor.
13. Vektor podle nároku 12, který obsahuje endogenní gen z *Propionibacterium* nebo heterologní gen operativně spojený s kontrolní sekvencí, která je schopna zajistit expresi genu.
14. Vektor podle nároku 13, kde gen je gen *cobA*.
15. Vektor podle nároku 13, kde heterologní gen kóduje polypeptid, který je léčivem pro člověka nebo zvíře.

16. Polypeptid, který obsahuje sekvenci id. č. 2 nebo 3, nebo sekvenci s ní v podstatě homologní, nebo fragment jedné z těchto sekvencí, nebo je kódován polynukleotidem podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7.
17. Hostitelská buňka, která obsahuje heterogenní polynukleotid nebo vektor podle kteréhokoliv z nároků 1 až 15, nebo která je transformována nebo transfekována vektorem podle kteréhokoliv z nároků 13 až 15.
18. Hostitelská buňka podle nároku 17, která je bakterie.
19. Hostitelská buňka podle nároku 18, která je *Propionibacterium* nebo *E. coli*.
20. Způsob přípravy hostitelské buňky podle kteréhokoliv z nároků 17 až 19 v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje krok transformace nebo transfekce hostitelské buňky polynukleotidem nebo vektorem podle kteréhokoliv z nároků 1 až 15.
21. Způsob přípravy polypeptidu nebo jiné sloučeniny v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje krok, kdy se kultivují nebo fermentují hostitelské buňky podle kteréhokoliv z nároků 17 až 19 v podmínkách, které umožní expresi nebo tvorbu polypeptidu nebo jiné sloučeniny.
22. Způsob podle nároku 21 v y z n a č u j í c í s e t í m, že je to fermentační proces, kdy hostitelské buňky jsou kultivovány v aerobních nebo anaerobních podmínkách.

23. Způsob podle nároku 21 nebo 22 v y z n a č u j í c í s e t í m, že exprimovaný polypeptid nebo vytvářená sloučenina se získávají z hostitelských buněk.
24. Způsob podle nároku 23 v y z n a č u j í c í s e t í m, že polypeptid je proteáza, amyláza, lipáza nebo peptidáza, a nebo sloučenina je vitamín B₁₂.
25. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 21. až 24 v y z n a č u j í c í s e t í m, že polypeptid je secernován z hostitelských buněk.
26. Způsob podle nároku 25 v y z n a č u j í c í s e t í m, že polypeptid je exprimován na povrchu hostitelské buňky a/nebo polypeptid je antigen nebo imunogen.
27. Polypeptid nebo sloučenina připravená způsobem podle kteréhokoliv z nároků 20 až 26.
28. Způsob výroby vitamínu B₁₂ (kobalamínu) v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje krok, kdy se kultivují hostitelské buňky podle kteréhokoliv z nároků 17 až 19 v podmínkách, kdy se tvoří vitamín B₁₂ a případně dle potřeby krok, kdy se izoluje vitamín.
29. Vitamín B₁₂ vyrobený způsobem podle nároku 28.
30. Polypeptid podle nároku 27 pro použití k léčení člověka nebo zvířete.
31. Hostitelská buňka podle kteréhokoliv z nároků 17 až 19 pro použití k léčení člověka nebo zvířete nebo pro

použití v krmivu pro zvíře.

32. Použití hostitelských buněk podle kteréhokoliv z nároků 17 až 19 nebo polypeptidů nebo sloučenin podle nároku 27 buďto k výrobě sýra nebo v sýrašství.
33. Použití hostitelských buněk podle kteréhokoliv z nároků 17 až 19 nebo polypeptidů nebo sloučenin podle nároku 27 k výrobě potravin nebo v krmivech pro zvířata.
34. Potravinový výrobek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje polypeptid nebo sloučeninu podle nároku 27 nebo hostitelskou buňku podle kteréhokoliv z nároků 17 až 19.
35. Potravinový výrobek podle nároku 34 v y z n a č u j í c í s e t í m, že je určen ke konzumaci člověkem (např. sýr, klobása) nebo zvířetem.
36. Způsob přípravy sýra nebo jiných fermentovaných potravin, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje krok, kdy se použijí hostitelské buňky podle kteréhokoliv z nároků 17 až 19.
37. Způsob podle nároku 36, v y z n a č u j í c í s e t í m, že hostitelské buňky se užívají místo a nebo navíc k užití bakterií mléčného kvašení.
38. Způsob podle nároku 36 nebo 37 v y z n a č u j í c í s e t í m, že hostitelská buňka je *Propionibacterium*.

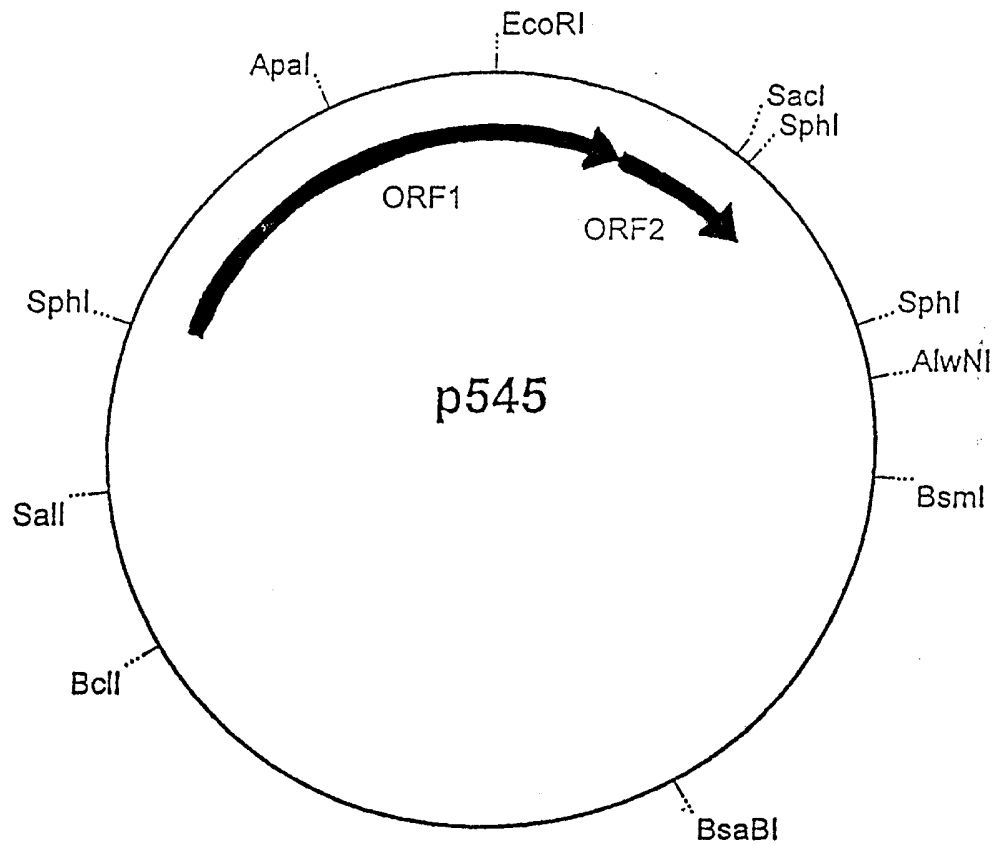
18-01-01

1/3

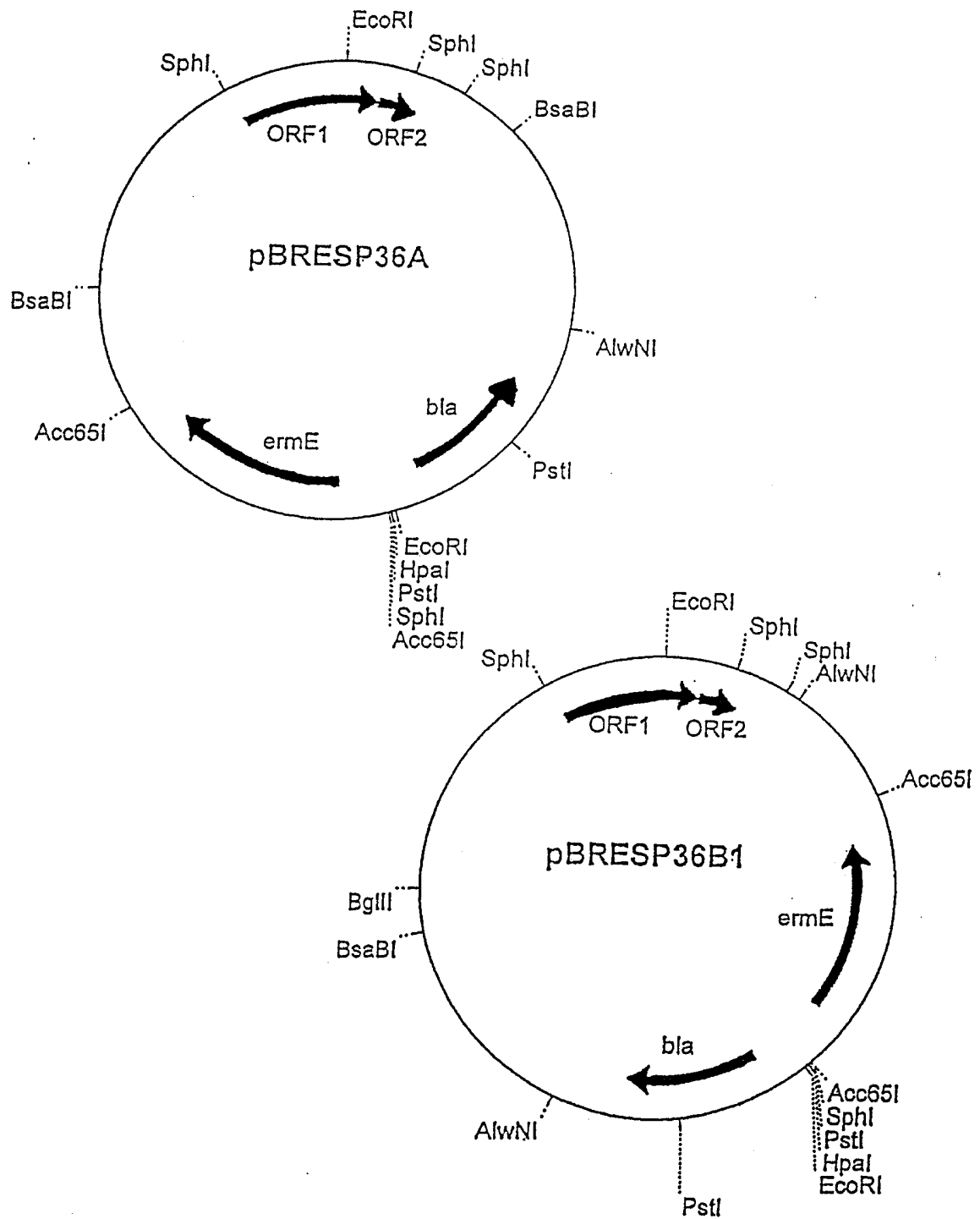
PV2000-4842

~~45-44~~

Obr. 1



Obr. 2a



Obr. 2b

