

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2003 - 1378

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **23.11.2001**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **22.11.2000**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/252516**
(33) Země priority: **US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.09.2003**
(Věstník č. 9/2003)
(86) PCT číslo: **PCT/US01/44185**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO02/083890**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/00

(71) Přihlašovatel:
UNIVERSITY OF MARYLAND, BALTIMORE,
Baltimore, MD, US;

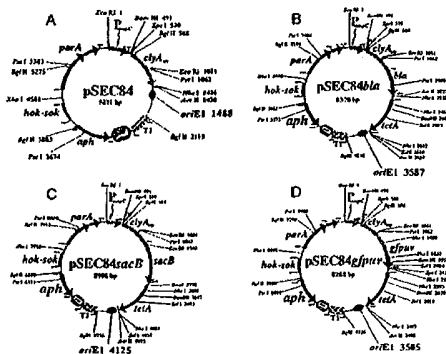
(72) Původce:
Galen James E., Owing Mills, MD, US;

(74) Zástupce:
PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
14000;

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Způsob exprese genu v bakteriální buňce, způsob
vyvolání imunitní odezvy u hostitele a systém pro
exprimování proteinu**

(57) Anotace:

Řešení poskytuje proteinový exportní systém pro účinné
produkování rekombinantního proteinu v hostitelské buňce.
Ve výhodnějším provedení využívá proteinový exportní
systém endogenního systému hostitelské bakterie, do níž je
vektor proteinového exportního systému začleněn



CZ 2003 - 1378 A3

ZPŮSOB EXPRESE GENU V BAKTERIÁLNÍ BUŇCE, ZPŮSOB VYVOLÁNÍ IMUNITNÍ ODEZVY U HOSTITELE A SYSTÉM PRO EXPRIMOVÁNÍ PROTEINU

Proteinový exportní systém, který je zde definován, byl vyvinut za podpory grantů 5 R01 AI29471, R01 AI40297 a výzkumné smlouvy N01 AI45251 (M.M. Levine, hlavní zkoušející) z National Institutes of Health.

Tato přihláška nárokuje prioritu před US patentovou přihláškou č. 60/252 516, podanou 22. listopadu 2000, která je zde začleněna jako odkaz.

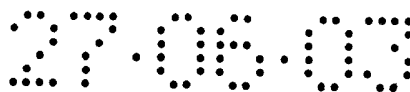
Oblast techniky

Níže uvedené odhalení se vztahuje k použití proteinového exportního systému. Odhalený systém poskytuje účinné způsoby a prostředky, které je možno použít pro produkci rekombinantních proteinů.

Dosavadní stav techniky

Při pokusech zvýšit výtěžky rekombinantních proteinů, které jsou předmětem zájmu, používaly proteinové expresní systémy expresní vektory nebo expresní plasmidy poskytující vysoký počet kopií. Expresní plasmidy poskytující vysoký počet kopií a sledované proteiny, které kódují, mohou mít na hostitele, který expresní plasmid obsahuje, negativní účinek. Značná zátěž pro prokaryotické hostitelské buňky nesoucí plasmidy poskytující vysoký počet kopií je kumulativním výsledkem metabolické kaskády, která je spouštěna dvěma procesy: 1) replikací a zachováním expresních plasmidů a 2) transkripcí a translací různých plasmidem kódovaných funkcí včetně sledovaného genu. Tyto mechanismy by také mohly vysvětlovat zjištění, že bakterie nesoucí plasmid roste pomaleji než bakterie bez plasmidu. Tato zátěž může také vysvětlovat zjištění, že růstová rychlost se zvyšujícím se počtem kopií klesá.

Když je sledovaný gen exprimován, klesá rychlost růstu rekombinantní hostitelské buňky. Snížení růstové rychlosti může vyvolat indukci různých buněčných proteas, které mohou štěpit rekombinantně produkovaný protein přítomný v cytoplasmě hostitelské buňky. Snížená růstová rychlost je tedy nevyhnutelným důsledkem metabolické zátěže, která je kumulativním výsledkem řady fyziologických poruch. Protože toto snížení růstové rychlosti vytváří selektivní tlak na ztrátu přítomných plasmidů v nepřítomnosti selekce, může po transformaci hostitelské



buňky dojít k podstatnému úbytku expresních plasmidů z hostitelské buňky nesoucí expresní vektor.

Hostitelské buňky se sníženými růstovými rychlostmi mohou ztrácet expresní plasmid spontánně, a to proto, aby z hostitelské buňky odstranily nadbytečnou metabolickou zátěž a umožnily tak hostitelským buňkám bez plasmidu rychle přerůst populaci hostitelských buněk nesoucích plasmid. Lze očekávat, že tento posun v expresi proteinů u populace hostitelských buněk sníží produkci proteinů.

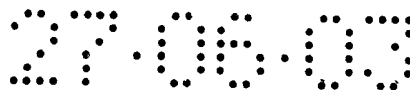
Bylo by proto žádoucí připravit takový proteinový expresní systém, který by optimalizoval expresi proteinů z expresního vektoru a současně by minimalizoval metabolickou zátěž hostitelské buňky vytvořenou expresním vektorem.

Podstata vynálezu

Odhalené téma se vztahuje k použití exportního proteinu k usnadnění exportu fúzního proteinu ven z hostitelské buňky. Jedno odhalené provedení poskytuje takový způsob exprimování genu v bakteriální buňce, který se skládá z poskytnutí expresního vektoru populaci netransformovaných hostitelských bakteriálních buněk, přičemž expresní vektor zahrnuje expresní kazetu obsahující sekvenci kódující exportní protein geneticky fúzovanou se sekvencí kódující sledovaný protein, z exprimování expresní kazety tak, že je produkován fúzní protein exportní protein::sledovaný protein, který je exportován nebo transportován do kultivačního média.

Jiné odhalené provedení se vztahuje ke způsobu vyvolání imunitní odezvy u zvířete, který se skládá z poskytnutí populace bakteriálních hostitelských buněk transformovaných expresním vektorem, který obsahuje expresní kazetu obsahující sekvenci, která kóduje exportní protein geneticky fúzovanou se sekvencí, která kóduje sledovaný protein, zvířeti, z exprimování expresní kazety tak, že je produkován fúzní protein exportní protein::sledovaný protein a je exportován nebo transportován do zvířete a z vyvolání imunitní odezvy proti fúznímu proteinu u zvířete.

Jiné odhalené provedení se vztahuje k systému exprimování sledovaného proteinu, který zahrnuje: expresní vektor obsahující expresní kazetu, přičemž expresní kazeta obsahuje sekvenci kódující exportní protein geneticky fúzovanou se sekvencí kódující sledovaný protein, hostitelskou buňku transformovanou expresním vektorem a kultivační prostředí pro transformovanou hostitelskou buňku. Expresní kazeta exprimuje fúzní protein exportní protein::sledovaný protein, který je exportován ven z transformované hostitelské buňky.



Níže uvedené odhalení poskytuje proteinový exportní systém pro účinně produkovány rekombinantní protein z bakteriálního hostitele. Ve výhodnějším provedení využívá proteinový exportní systém endogenní proteinový exportní systém hostitelské bakterie, do níž je vektor proteinového exportního systému začleněn.

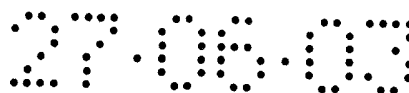
Proteinový exportní systém má řadu užitečných aplikací. Systém může být použit pro účinné produkování rekombinantních proteinů, které jsou předmětem zájmu, uvnitř bakteriální hostitelské buňky a pro export daného rekombinantního proteinu z bakteriální hostitelské buňky. Odhalený systém může být použit také například k účinnému produkování rekombinantních proteinů, které jsou předmětem zájmu, v bioreaktoru.

Proteinový exportní systém může být také použit za účelem poskytnutí antigenního materiálu zvířeti, proti němuž si může zvíře vytvořit imunitní odezvu. V jenom provedení je například oslabená bakterie, jako je *Salmonella*, transformována složkami proteinového exportního systému. Rekombinantní *Salmonella* může být potom použita jako živý vektorový imunogenní prostředek, který je schopen napomáhat tvorbě imunitní odezvy u zvířete. Proteinový exportní systém může být použit pro různé sledované antigeny. Specifická provedení zahrnují imunogenní prostředky zaměřené proti břišnímu tyfu a dalším onemocněním. Rovněž jsou odhaleny imunogenní prostředky exprimující antigeny, které jsou z rekombinantní bakterie exportovány za současné minimální bakteriální lýze.

A. Proteinový exportní systém rodiny HlyE

Níže uvedené odhalení se vztahuje k použití členů rodiny HlyE v proteinovém exportním systému za účelem usnadnit expresi proteinů. Členové rodiny HlyE mohou být použity pro usnadnění exportu rekombinantně produkováných proteinů ze svých bakteriálních hostitelů. U expresních systémů, které exportují rekombinantně produkováné proteiny, se předpokládá, že usnadňují zvýšenou produkci proteinů. Odhalený proteinový exportní systém může být použit také pro přípravu imunogenních prostředků, jimiž jsou očkována zvířata.

U růstových rychlostí rekombinantních organismů, které obsahují expresní vektory, bylo pozorováno, že se se zvyšující se hladinou exprese sledovaného genu snižují. Pokles růstu může vyvolat indukci různých buněčných proteas, které mohou štěpit exprimovaný rekombinantní protein. Snižovaná růstová rychlost je tedy nevyhnutelným důsledkem metabolické zátěže, která je kumulativním výsledkem řady fyziologických poruch. Fyziologické poruchy jsou výsledkem například exprese a akumulace sledovaného proteinu uvnitř hostitelské bakterie. Tato akumulace

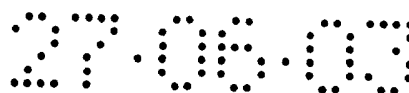


může být pro životaschopnost hostitelské bakterie škodlivá a tudíž může být negativním selekčním tlakem.

Protože metabolické zátěže, jako např. ty, které jsou diskutovány výše, vytvářejí selektivní tlak na ztrátu přítomných expresních vektorů v nepřítomnosti selekce, může dojít k významnému úbytku expresního vektoru z hostitelské bakterie a to poté, když byla hostitelská bakterie transformována expresním vektorem, který obsahuje sledovaný gen. Spontánní ztráta plasmidu odstraňuje metabolickou zátěž z hostitelské bakterie a umožňuje bakterii bez plasmidu rychle přerůst populaci bakterie nesoucí plasmid. Tento rychlejší růst bakteriálních buněk, které neobsahují expresní vektor a tudíž neexprimují sledovaný protein, snižuje celkové hladiny produkce proteinu. Proto tedy hostitelská bakterie, která není geneticky přinucena udržovat expresní vektory řídící syntézu vysokých hladin daného sledovaného proteinu, může produkovat podstatně méně proteinu.

Výhodné provedení vztahující se k exportování rekombinantně exprimovaného proteinu, který je předmětem zájmu, zahrnuje využití endogenního exportního systému v hostitelské bakterii obsahující expresní vektor. Využití endogenního exportního systému je výhodné, protože se předchází potřebě velkých množství heterologní DNA kódující exotické proteiny pro zásobování exogenního exportního systému. Přesto však jsou předmětným vynálezem zahrnuty rovněž takové proteinové exportní systémy, které využívají exogenních exportních systémů.

Atraktivním kandidátem na endogenní exportní systém je kódovaný hemolysin kódovaný cytolysinem A (*clyA*) na chromozomu *Salmonella enterica* serovar Typhi (dále jen *S. Typhi*), člen rodiny proteinů HlyE. Rodina HlyE se skládá z jednoho proteinu, HlyE, a jeho blízkých homologů z *E. coli*, *Shigella flexneri* a *S. Typhi* a jiných bakterií. Protein z *E. coli* je funkčně velmi dobře charakterizovaný, póry tvořící, chromozomálně kódovaný hemolysin také nazývaný ClyA, HlyE a tichý hemolysin A (SheA). Skládá se z 303 aminokyselinových zbytků (34 kDa). Jeho transkripce je pozitivně kontrolovaná SlyA, regulátorem nacházejícím se v různých střevních bakteriích. HlyE tvoří v lipidové dvojvrstvě stabilní, středně kationselektivní transmembránové póry o průměru 2,5 až 3,0 nm. Protein váže cholesterol a tvorba pórů v membráně je stimulována tehdy, když membrána obsahuje cholesterol. Krystalická struktura HlyE z *E. coli* byla zjištěna do rozlišení 2,0 Å a pomocí elektronové mikroskopie při nízkém rozlišení byla provedena vizualizace formy toxinu spojené s lipidy. Struktura vykazuje komplikovaný spirálovitý svazek nějakých 100 Å dlouhý. V přítomnosti lipidu oligomerizuje za vzniku transmembránových pórů.



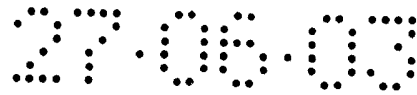
B. Proteinový exportní systém Cytolysin A (ClyA)

Výhodné provedení předmětného vynálezu se vztahuje k použití proteinu ClyA, člena rodiny HlyE, v proteinovém exportním systému. Gen *clyA* o velikosti přibližně 1 kb byl klonován z *S. Typhi* CVD 908-*htrA* s cílem použít ho v proteinovém exportním systému. ClyA protein je exportován jak z *E. coli* tak i *S. Typhi* a je schopen exportovat "spolucestující" proteiny, které byly geneticky fúzovány na 3'-konec otevřeného čtecího rámce *clyA*. Spolupřenášený protein, na něž je zde proveden odkaz, je dále označován jako sledovaný protein nebo protein, který je předmětem zájmu. Je ukázáno, že správné sbalení těchto fúzních proteinů probíhá tak, že zůstává zachována vlastní biologická aktivita domén.

Cytolysin A (ClyA) z *S. Typhi* poprvé popsal Wallace *a kol.*, který rovněž oznámil krystalickou strukturu homologního hemolysinu z *E. coli* (Wallace, A. J., T. J. Stillman, A. Atkins, S. J. Jamieson, P. A. Bullough, J. Green a P. J. Artymiuk. 2000. *E. coli* hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA): X-ray crystal structure of the toxin and observation of membrane pores by electron microscopy. *Cell* 100: 265 až 276). Tento hemolysin byl popsán již dříve a byl označován jako ClyA, HlyE nebo SheA. Aby se předešlo zmatku, je zde hemolysin *E. coli* označován jako HlyE a je kódován *hlyE*. Rovněž z důvodu jasnosti je zde hemolysin z *S. Typhi* označován jako ClyA, který je kódován *clyA*.

Pro ilustraci je proteinová struktura členů rodiny HlyE diskutována s odvoláním na protein HlyE z *E. coli*. HlyE je molekula tvaru zlomené tyče s hydrofóbní transmembránovou oblastí tvořenou 27 zbytky. Tato oblast zahrnuje jeden konec sbalené molekuly a předpokládá se, že tvoří pór v cílové membráně. Tvorba póru vede v zásadě k lýzi cílové buňky. Ve studiích využívajících elektronové mikroskopie Wallace *a kol.* ukázali, že HlyE se inzertuje do lipidových dutin za vzniku pórů složených z 8 monomerů HlyE.

Ačkoliv tvorba pórů zprostředkovaná HlyE byla již objasněna, mechanismus, kterým jsou HlyE a homology HlyE exportovány ven z bakterie zůstává nejasný. Kromě toho, způsob, jakým se hemolysin začleňuje do cílových membrán za účelem včlenit se do pórů rovněž není zcela znám. Del Castillo *a kol.* popsali sekreci hemolytické aktivity závisící na růstové fázi. Sekrece vrcholí během střední logaritmické fáze a vymizí při nástupu fáze stacionární (del Castillo, F. J., S. C. Leal, F. Moreno a I. del Castillo. 1997. The *Escherichia coli* K-12 *sheA* gene encodes a 34-kDa secreted haemolysin. *Mol. Microbiol.* 25: 107 až 115). Ludwig a jeho kolegové oznámili, že vylučování tohoto kódovaného hemolysinu je doprovázeno ztrátou periplasmaticky ohraničených proteinů, ale není doprovázeno ztrátou cytoplasmatických proteinů, což hovoří proti úplné buněčné lýzi za účelem uvolnění HlyE. (Ludwig, A., S. Bauer, R. Benz,



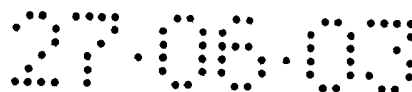
B. Bergmann a W. Goebel. 1999. Analysis of the SlyA-controlled expression, subcellular localization and pore-forming activity of 34 kDa haemolysin (ClyA) from *Escherichia coli* K-12. Mol. Microbiol. 31: 557 až 567.)

Kromě toho sekvenování N-konce vylučovaného HlyE a porovnání se sekvencí kódovanou *hlyE*, odhalilo, že HlyE není v průběhu transportu N-koncově zpracováván. Oscarsson a kol. oznámili, že HlyE se váže na cholesterol a že přítomnost cholesterolu v cílových membránách stimuluje tvorbu pórů a lýzi. (Oscarsson, J., Y. Mizunoe, L. Li, X. Lai, A. Wieslander a B. E. Uhlin. 1999. Molecular analysis of the cytolytic protein ClyA (SheA) from *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 32: 1226 až 1238.) Je odhadováno, že přibližně 10^3 molekul HlyE je potřeba pro lýzi cílového erytrocytu, což naznačuje významné hromadění HlyE před tím, než je zaznamenána buněčná lýze. HlyE je nápadně stabilní v rozmezí hodnot pH 3,0 až 9,0 a je rezistentní vůči štěpení proteasami včetně trypsinu a pepsinu. (Atkins, A., N. R. Wyborn, A. J. Wallace, T. J. Stillman, L. K. Black, A. B. Fielding, M. Hisakado, P. J. Artymiuk a J. Green. 2000. Structure-function relationships of a novel bacterial toxin, haemolysin E. The role of α_G . J. Biol. Chem. 275: 41 150 až 41 155.

Aminokyselinová sekvence proteinu ClyA použitá v odhalené práci je poskytnuta jako SEQ ID č:2. Ostatní členové rodiny HlyE jsou rovněž dostupné a jsou odborníkům v dané oblasti techniky známé. Například další gen *clyA* pro cytolysin A ze *S. Typhi* je dostupný pod přístupovým číslem GENBANK AJ313034; sekvence genu *clyA* pro cytolysin A ze *Salmonella paratyphi* je dostupná pod přístupovým číslem GENBANK AJ313033; kompletní kódující sekvence genu zkráceného HlyE (*hlyE*) *Shigella flexneri* je dostupná pod přístupovým číslem GENBANK AF200955; a sekvence genu *clyA Escherichia coli* je dostupná pod přístupovým číslem GENBANK AJ001829.

Typické pro proteiny rodiny HlyE je to, že způsobují v cílových buňkách hemolýzu. Podle uvedených postupů mohou být použity hemolyticky aktivní nebo inaktivní členové rodiny HlyE. Například je známo, že mutace genu *clyA* může snižovat nebo zcela eliminovat hemolytickou aktivitu. Ztráta hemolytické aktivity byla například oznámena tehdy, když byl *clyA* mutován tak, že se aminokyselinové substituce vyskytovaly v pozicích 180, 185, 187 a 193. Konkrétně v případě G180V, V185S, A187S a I193S je výsledkem ztráta hemolytické aktivity u proteinu ClyA exprimovaného z mutovaného genu *clyA*.

Předmětné odhalení využívá exportních charakteristik proteinů rodiny HlyE k vytvoření proteinového exportního systému. Jsou odhaleny například fúzní proteiny zahrnující libovolný člen rodiny HlyA a sledovaný protein. Ještě konkrétněji jsou odhaleny fúzní proteiny obsahující ClyA a sledovaný protein. Jak je diskutováno níže, jsou fúzní proteiny obsahující ClyA



exportovány ven z bakteriální hostitelské buňky do okolního média. Tento charakteristický znak expresního systému zahrnuje takovou složku fúzního proteinu exportní protein::sledovaný protein, která usnadňuje produkci sledovaného proteinu a exportování fúzního proteinu exportní protein::sledovaný protein.

Expresní vektory pro exportní proteiny

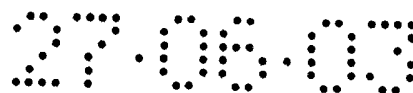
Zde popsaný proteinový exportní systém může být použit pro expresi a export mnoha různých fúzních proteinů obsahujících exportní protein a sledovaný protein. Exportní protein je vybrán z proteinů rodiny HlyE. V jednom provedení je sledovaný protein kódován sledovaným genem. Sledovaný gen může být pro bakterii obsahující proteinový exportní systém cizí nebo to může být gen, který je pro bakterii endogenní. Konstrukt fúzního proteinu exportní protein::sledovaný protein je přítomen v expresní kazetě, která je přítomna v expresním vektoru. Každá z těchto jednotek je diskutována níže.

Expresní vektory

Proteinový exportní systém využívá expresního vektoru pro usnadnění rekombinantní produkce sledovaného proteinu. Typický expresní vektor bude obsahovat počátek replikace a další strukturní znaky, které kontrolují a regulují udržování expresního vektoru v hostitelské buňce. Termín "expresní vektor" se vztahuje k plasmidu, viru nebo jinému prostředku, který je známý v dané oblasti techniky, který byl manipulován tak, že byla inzertována nebo začleněna expresní kazeta obsahující expresní kazetu fúzního proteinu exportní protein::sledovaný protein. Příkladem expresního vektorového systému je systém, který uvádí expresní vektory, které udělují stabilitu plasmidu na dvou nezávislých úrovních, což je popsáno v Galen *a kol.*, Immun. 67:6 424 až 6 433 (1999) a v US patentových přihláškách č. 09/204 117 podané 2. prosince 1998 a 09/453 313, podané 2. prosince 1999, které jsou zde celé zahrnuty jako odkaz.

Expresní kazety exportní protein-fúzní protein

Zde popsaný proteinový exportní systém může být použit k expresi a exportu mnoha různých fúzních proteinů obsahujících exportní protein a sledovaný protein. Sledovaný protein je kódován sekvencí kódující sledovaný protein, která je zároveň sledovaným genem. Sledovaný gen může být pro bakterii obsahující proteinový exportní systém cizí nebo to může být gen, který

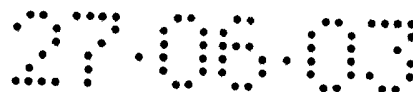


je pro bakterii endogenní. Velikost sledovaného proteinu se může pohybovat v rozmezí od jediné aminokyseliny až po proteiny několikrát větší než je exportní proteinová molekula. Výhodněji se může velikost sledovaného proteinu pohybovat v rozmezí od 10 aminokyselin do dvojnásobné velikosti exportního proteinu. Je výhodnější, aby velikost sledovaného proteinu byla taková, aby neinterferovala se schopností exportního proteinu být zcela exportován mimo bakterii. Mezi příklady sledovaných proteinů patří proteiny o hmotnosti 0 kDa až alespoň 50 kDa. Vyšší hmotnosti a tudíž delší proteiny mohou být jako sledované proteiny také použity. Sledované proteiny mohou mít hmotnost například 55 kDa, 60 kDa, 65 kDa, 70 kDa, 75 kDa, 80 kDa, 85 kDa, 90 kDa, 95 kDa, 100 kDa nebo větší.

Sledovaný protein se může také skládat z 1 až 1000 aminokyselin nebo více aminokyselin. Sledovaný protein může mít například 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 aminokyselin nebo více.

Sledovaný gen, který má být exprimován, je většinou přítomen v expresní kazetě. Typická expresní kazeta bude obsahovat vhodné strukturní znaky jako je promotor, terminátor atd. a to proto, aby mohla proběhnout transkripce sledovaného genu.

Polynukleotidové sekvence kódující fúzní protein exportní protein::sledovaný protein (také známé jako "sekvence kódující fúzní protein exportní protein::sledovaný protein") mohou být za vzniku expresní kazety operativně připojeny na kontrolní sekvence exprese. Termín "operativně připojeny" se vztahuje k pozicím vedle sebe, kdy komponenty takto popsané jsou ve vztahu, který jim umožňuje pracovat svým obvyklým způsobem. Expresní kontrolní sekvence operativně připojená ke kódující sekvenci je ligována tak, že proběhne exprese kódující sekvence za podmínek, které jsou srovnatelné s expresními kontrolními sekvencemi. Termín "expresní kontrolní sekvence", který je zde používán, se vztahuje k sekvencím nukleové kyseliny, které regulují expresi sekvence nukleové kyseliny, na níž je operativně připojena. Expresní kontrolní sekvence jsou operativně připojeny k sekvenci nukleové kyseliny tehdy, když expresní kontrolní sekvence kontrolují a regulují transkripci a v případě potřeby translaci sekvence nukleové kyseliny. Expresní kontrolní sekvence tedy mohou zahrnovat příslušné promotory, terminátory transkripce, optimalizované ribosomové vazebné sekvence, startovní kodón (tzn. ATG) před genem kódujícím protein, správný čtecí rámec tohoto genu, aby mohla proběhnout translace mRNA a stop kodóny. Termín "kontrolní sekvence" zahrnuje minimálně ty komponenty, jejichž přítomnost může ovlivnit expresi, ale může také zahrnovat další komponenty, jejichž přítomnost je výhodná, například vedoucí sekvence. Expresní kontrolní sekvence mohou zahrnovat promotor.

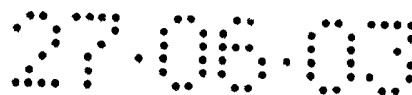


"Promotor" je minimální sekvence dostatečná pro řízení transkripce. Ve vynálezu jsou zahrnuty také ty promotorové prvky, které jsou dostačující pro uskutečnění promotor-dependentní exprese genu kontrolovatelné pokud jde o specifickou pro buňku, tkáňově specifickou nebo indukovatelnou externími signály nebo činidly; tyto prvky mohou být umístěny v 5' nebo 3' oblastech kódující sekvence fúzního proteinu exportní protein::sledovaný protein. V odhalených způsobech jsou použitelné jak konstitutivní tak i indukovatelné promotory. Expese kódujících sekvencí fúzního proteinu exportní protein::sledovaný protein může být řízena řadou promotorů. Ačkoliv endogenní promotor exportního proteinu může být využit pro regulaci transkripce expresní kazety, výhodněji je promotorem cizí regulační sekvence. Příkladem indukovatelného endogenního promotoru je promotor *ompC*, který může být použit pro řízení transkripce expresní kazety.

Promotory užitečné ve vynálezu zahrnují jak konstitutivní tak i indukovatelné přirozené promotory, ale i promotory vytvořené. Výhodnější indukovatelný promotor by měl 1) poskytnout nízkou expresi v nepřítomnosti induktoru; 2) poskytnout vysokou expresi v přítomnosti induktoru; 3) použít takové indukční schéma, které neinterferuje s normální fyziologií hostitelské buňky; a 4) mít malý nebo nemít žádný vliv na expresi jiných genů. Mezi příklady indukovatelných promotorů patří takové promotory, které jsou indukovány chemickým způsobem. Odborníci v dané oblasti budou tyto jak konstitutivní tak indukovatelné promotory znát.

Konkrétní vybraný promotor by měl být schopen způsobit dostatečnou expresi, jejíž výsledkem by měla být produkce účinného množství fúzního proteinu exportní protein::sledovaný protein. Účinné množství fúzního proteinu exportní protein::sledovaný protein se může lišit v závislosti na cíli exprese. Promotory použité ve vektorových konstruktech předmětného vynálezu mohou být v případě potřeby modifikovány s cílem ovlivnit jejich kontrolní charakteristiky.

Fúzní protein exportní protein::sledovaný protein, který obsahuje exportní protein a sledovaný protein, může dále obsahovat purifikační konce, zapracované do expresní kazety tak, aby byly exprimovány jako součást fúzního proteinu exportní protein::sledovaný protein. Konec je vybrán proto, aby usnadnil purifikaci fúzního proteinu exportní protein::sledovaný protein a/nebo sledovaného proteinu produkovaného popsánymi způsoby. Například, aby byla usnadněna purifikace proteinu může být do C-koncové části nebo N-koncové části sledovaného proteinu zapracováno určité množství histidinových zbytků. Je výhodné, že začlenění konce minimalizuje nesprávné sbalení sledovaného proteinu.



Kromě polyhistidinového konce, existuje ještě řada jiných proteinových konců, které mohou být pro usnadnění purifikace proteinu použity. V popsaném systému mohou být použity například antigenní konce jako je protein vážící maltosu, c-myc epitopový konec, zelený fluorescenční protein, luciferasa, beta-galaktosidasa, polyhistidinový konec nebo jakýkoliv jiný vhodný proteinový expresní konec.

Fúzní protein exportní protein::sledovaný protein, který obsahuje exportní protein a sledovaný protein, může dále obsahovat další znaky, jejichž úkolem je usnadnit použití exprimovaného a exportovaného proteinu. Například, aby došlo k separaci komponent fúzního proteinu exportní protein::sledovaný protein, mohou být mezi dvěma různými složkami fúzního proteinu exportní protein::sledovaný protein v případě potřeby včetně výše popsaných značek, vytvořena místa pro rozpoznání proteasami. Místo pro rozpoznání proteasami může být v expresní kazetě začleněno například mezi dvě sekvence exportního proteinu a sledovaného proteinu. Místo pro rozpoznání proteasami může být v expresní kazetě také začleněno mezi sekvence značky a sledovaného proteinu. Tato místa pro rozpoznání proteasami usnadňují separaci exportního proteinu od sledovaného proteinu.

S expresní kazetou může být někdy spojena selekční značka. Termín "značka", který je zde používán, se vztahuje ke genu, který kóduje charakteristický znak nebo fenotyp a umožňuje selekci nebo testování a výběr hostitelské buňky obsahující danou značku. Značkovým genem může být rezistence vůči antibiotiku, čímž může být odpovídající antibiotikum použito pro rozlišení transformovaných hostitelských buněk a buněk, které transformovány nejsou. Značkovým genem může být i některý další gen rezistence vůči léku. Mezi příklady vhodných selekčních značek patří adenosindeaminasa, dihydrofolátreduktasa, hygromycin- β -fosfotransferasa, thymidinkinasa, xanthin-guaninfosforibosyltransferasa, glykofosfátová a glufosinátová rezistence a amino-glykosid-3'-O-fosfotransferasa II (rezistence vůči kanamycinu, neomycinu a G418). Odborníci v dané oblasti budou další vhodné značky, které mohou být použity, znát.

Příklad expresního vektoru je uveden na obr. 1. Na obr. 1A je uveden expresní vektor pSEC84. Nukleotidovou sekvenci vektoru pSEC84 je možno nalézt v SEQ ID č:1. Aminokyselinová sekvence ClyA kódovaná genem *clyA* je uvedena v SEQ ID č:2.

Každý vektor uvedený na obr. 1A až D obsahuje promotor (P_{ompC} - modifikovaný osmoticky regulovaný promotor *ompC* z *E. coli*), exportní protein (*clyA*), počátek replikace, terminátor transkripce (T1), pasivní dělicí funkci (*par*), rezistenci vůči kanamycinu (*aph*), posegregační zabíjecí systém (*hok-sok*) a aktivní dělicí systém (*parA*). Je třeba uvést, že tyto vektorové komponenty jsou pouze ukázkové pro toto jedno provedení odhaleného systému.

Obrázek 1B zobrazuje expresní vektor pSEC84*bla*. Tento expresní vektor obsahuje stejné znaky jako vektor pSEC84 a dále obsahuje konstrukt fúzního proteinu exportní protein::sledovaný protein. Konkrétně gen *bla* kódující β -laktamasu byl klonován do vektoru pSEC84 v místě *Nhe* I v pozici 1426 výchozího vektoru. Jiné fúzní konstrukty jsou uvedeny na obr. 1C (pSEC84*sacB*) a obr. 1D (pSEC84*gfpuv*).

Sledované geny

Zde odhalený proteinový exportní systém může být použit u řady sledovaných genů. V jednom provedení kóduje sledovaný gen požadovaný protein. V odhaleném exportním systému může být použit libovolný protein, který je přístupný rekombinantní bakteriální expresi. Sledovaný gen může kódovat jakýkoliv polypeptid, jako je například savčí polypeptid jako enzym, inhibitor enzymu, hormon, lymfokin, plasminogenní aktivátor nebo jakýkoliv jiný protein, který je předmětem zájmu. Sledovaný gen může kódovat eukaryotický gen, prokaryotický gen, rostlinný gen nebo virový gen.

Výhodou odhaleného systému je to, že poskytuje způsob, kterým proteiny, které byly pro hostitelskou bakterii toxické, mohou být nyní exprimovány. Rekombinantní exprese určitých proteinů je složitá nebo ji nelze vůbec uskutečnit například tehdy, není-li exprimovaný protein exportován ven z hostitelské bakteriální buňky. Pomocí postupů, které jsou zde odhaleny, může odborník v dané oblasti exprimovat dříve neexprimovatelný nebo nedostatečně exprimovaný protein a produkovat tak žádoucí protein v použitelných množstvích.

V jiném provedení je sledovaným genem gen kódující imunogenní antigen a sledovaným proteinem je antigen, což může být protein nebo jeho antigenní fragment z libovolného patogenu jako jsou virové patogeny, bakteriální patogeny a parazitové patogeny. Sledovaným genem může být někdy také syntetický gen konstruovaný pomocí rekombinantních DNA způsobů, který kóduje antigeny nebo jejich části z virových, bakteriálních, parazitových patogenů nebo jiný sledovaný antigen. Tyto patogeny mohou být pro hostitele, a to lidi, domácí zvířata nebo divoká zvířata, infekční.

Mezi příklady konkrétních virových patogenů, z nichž jsou odvozeny virové antigeny, patří, avšak nejsou tím nijak limitovány, ortomyxoviry jako je virus chřipky; retroviry jako je respiračně syncytiální virus (RSV) a virus opičí imunodeficiency (SIV), herpesviry jako je virus Epstein Barrové (EBV); cytomegalovirus (CMV) nebo virus herpes simplex; lentiviry jako je virus lidské imunodeficiency; rhabdoviry jako je vzteklinka; pikornaviry jako je poliovirus; poxviry jako jsou neštovice; rotavirus; a parvoviry.

Mezi příklady imunogenních antigenů z virových patogenů patří antigeny viru lidské imunodeficiency Nef, p24, gp120, gp41, Tat, Rev a Pol. Dalšími příklady antigenů jsou epitopy T buněk a B buněk gp120, povrchový antigen hepatitidy B, rotavirové antigeny jako je VP4, VP6 a VP7, antigeny viru chřipky jako je hemaglutinin nebo nukleoprotein a thymidinkinasa viru herpes simplex. Sekvence nukleové kyseliny a aminokyselinové sekvence každého z těchto virových antigenů jsou odborníkům v dané oblasti dobře známé a jsou snadno dostupné.

Bakteriální patogeny, z nichž mohou být odvozeny bakteriální antigeny, zahrnují, aniž by tím však byly limitovány, *Mycobacterium* spp., *Helicobacter pylori*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *E. coli*, *Rickettsia* spp., *Listeria* spp., *Legionella pneumoniae*, *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp., a *Borellia burgdorferi*.

Mezi příklady imunogenních antigenů z bakteriálních patogenů patří, aniž by tím však byly jakkoliv limitovány, antigen *Shigella sonnei* forma 1, O-antigen *V. cholerae* Inaba kmen 569B, imunogenní antigeny enterotoxigenní *E. coli* jako je CFA/I fimbriální antigen a netoxická B-podjednotka tepelně labilního toxinu, pertaktin z *Bordetella pertussis*; adenylátcyklasa-hemolysin z *B. pertussis* a fragment C tetanového toxinu *Clostridium tetani*.

Mezi příklady imunogenních antigenů parazitových patogenů, z nichž mohou být parazitové antigeny odvozeny, patří, aniž by tím však byly jakkoliv limitovány, *Plasmodium* spp., *Trypanosome* spp., *Giardia* spp., *Boophilus* spp., *Babesia* spp., *Entamoeba* spp., *Eimeria* spp., *Leishmania* spp., *Schistosoma* spp., *Brugia* spp., *Fasciola* spp., *Dirofilaria* spp., *Wuchereria* spp. a *Onchocerca* spp.

Mezi příklady imunogenních antigenů z parazitových patogenů patří, aniž by tím však byly jakkoliv limitovány, cirkumsporozoitální antigeny z *Plasmodium* spp., jako je cirkumsporozoitální antigen *P. bergerii* nebo cirkumsporozoitální antigen *P. falciparum*; merozoitální povrchový antigen z *Plasmodium* spp.; lektin specifický pro galaktosu z *Entamoeba histolytica*; gp63 z *Leishmania* spp., paramyosin z *Brugia malayi*; triosafosfátisomerasa z *Schistosoma mansoni*; vylučovaný protein podobný globulinu z *Trichostrongylus colubriformis*; glutathion-S-transferasa z *Fasciola hepatica*; *Schistosoma bovis* a *S. japonicum*; a KLH z *Schistosoma bovis* a *S. japonicum*.

V jiném provedení může sledovaný gen kódovat terapeutické činidlo jako jsou činidla nádorově specifická, transplantátová nebo autoimunitní nebo jejich části. Někdy může sledovaný gen kódovat syntetické geny, které kódují nádorově specifická, transplantátová nebo autoimunitní činidla nebo jejich části.

Mezi příklady nádorově specifických činidel patří antigen specifický pro prostatu, TAG-72 a CEA, MAGE-1 a tyrosinasa. Nedávno bylo ukázáno u myši, že imunizace

nemaligními buňkami exprimujícími nádorový antigen poskytuje efekt podobný vakcíně a rovněž zvířeti pomáhá rozpoutat imunitní odezvu za účelem zbavit se maligních nádorových buněk zobrazujících stejný antigen.

Mezi příklady transplantních antigenů patří CD3 receptor na T buňkách. U působení protilátky na CD3 receptor bylo ukázáno, že rychle čistí cirkulující T buňky a zabraňuje nejděsivějším případům.

Mezi příklady autoimunitních antigenů patří IAS β řetězec. U očkování myši 18 aminokyselinovým peptidem z IAS β řetězce bylo ukázáno, že chrání a léčí myši s experimentální autoimunní encephalomyelitidou.

Sledovaný gen může také kódovat imunoregulační molekuly. Tyto imunoregulační molekuly zahrnují, avšak nejsou tím jakkoliv limitovány, růstové faktory, jako je M-CSF, GM-CSF; a cytokiny jako je IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 nebo IFN-gamma. Nedávno bylo u lokalizovaného dopravení cytokinů do nádorové tkáně ukázáno, že stimuluje silnou systemickou imunitu a zvyšuje prezentaci nádorového antigenu, aniž by byla produkována systemická cytokinová toxicita.

Stabilizované expresní systémy na bázi plasmidu

Navrhované bakteriální expresní systémy většinou využívají expresní vektory k tomu, aby využily systém syntézy proteinů bakteriální hostitelské buňky s cílem produkovat sledovaný protein. Hladiny exprese proteinů mohou být často zvýšeny použitím plasmidů poskytujících vysoký počet kopií nebo expresních vektorů poskytujících vysoký počet kopií a hostitelských buněk. Jak je diskutováno výše zavedení expresního vektoru poskytujícího vysoký počet kopií do bakteriální hostitelské buňky však klade na hostitelskou buňku určitou metabolickou zátěž, která může způsobit, že hostitelská buňka expresní vektor vypuzuje a tudíž snižuje hladiny exprese proteinu.

Při úpravě expresního vektoru je často přehlížen efekt, že expresní vektory poskytující vysoký počet kopií často ovlivňují stav hostitelské buňky, do níž je expresní vektor začleněn. Zátěž kladená na hostitelské bakteriální buňky nesoucí tyto plasmidy je kumulativním výsledkem metabolické kaskády. Kaskáda je spouštěna replikací expresních vektorů a snahou udržet je (viz Bailey, J.E., Host-vector interactions in *Escherichia coli*, str. 29 až 77. V A. Fiechter (vyd.) *Advances in Biochemical Engineering. Biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin (1993), Glick, B.R., *Biotechnol. Adv.* 13:247 až 261 (1995), a Smith & Bidochka. *Can. J. Microbiol.* 44:351 až 355 (1998)). Kaskáda je také spouštěna transkripcí a translací různých



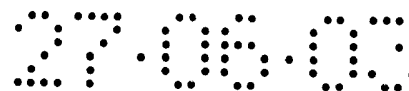
expresním vektorem kódovaných funkcí včetně sledovaného proteinu. Mechanismy, jako jsou ty popsané výše, vysvětlují fakt, že bakterie nesoucí plasmid roste pomaleji než bakterie bez plasmidu. Tyto mechanismy mohou také vysvětlit zjištění, že růstová rychlost klesá se zvyšujícím se počtem kopií.

U růstových rychlostí rekombinantních organismů obsahujících expresní vektory bylo pozorováno, že se se zvyšující se expresí sledovaného genu snižují. Pokles růstu může vyvolat indukci různých buněčných proteas, které mohou štěpit sledovaný exprimovaný rekombinantní protein. Snížená růstová rychlost je tedy nevyhnutelným důsledkem metabolické zátěže, která je kumulativním výsledkem řady fyziologických poruch. Fyziologické poruchy jsou například výsledkem exprese a hromadění sledovaného proteinu uvnitř hostitelské bakterie. Toto hromadění může být škodlivé pro životaschopnost hostitelského organismu a tudíž vytváří negativní selekční tlak.

Protože metabolické zátěže, které jsou diskutovány výše, způsobují selektivní tlak na ztrátu přítomných expresních vektorů v nepřítomnosti selekce, může dojít poté, co byla hostitelská buňka transformována expresním vektorem obsahujícím sledovaný gen, k podstatnému úbytku expresních vektorů z hostitelské buňky. Spontánní ztráta plasmidu odstraňuje z hostitelské buňky jakoukoliv metabolickou zátěž a umožňuje hostitelské buňce bez plasmidu rychle přerůst populaci hostitelské buňky nesoucí plasmid. Tento rychlejší růst hostitelských buněk, které neobsahují a tudíž ani neexprimují sledovaný protein, snižuje celkové hladiny produkce proteinu. Proto hostitelské buňky, které nejsou geneticky přinuceny k tomu, aby udržovaly expresní vektory řídící syntézu vysokých hladin daného proteinu, mohou produkovat podstatně méně proteinu.

Existuje řada způsobů jak tento metabolický stres snížit. Kontrolovaná exprese sledovaného proteinu z expresních vektorů poskytujících vysoký počet kopií představuje jedno řešení jak syntetizovat vysoké hladiny sledovaného proteinu v hostitelských buňkách. Toto řešení je jedním provedením, jímž jsou realizovány odhalené způsoby. Využití indukovatelných promotorů je například jedním způsobem, jímž může být regulována exprese z expresního vektoru. Tyto indukční promotory jsou diskutovány v kapitole týkající se expresní kazety.

Jiné provedení postupů, které jsou zde odhaleny, se vztahuje k expresnímu systému na bázi plasmidu upraveného tak, aby umožnil stabilní expresi vysokých hladin jednoho nebo více proteinů prostřednictvím rostoucí populace buněk. Stabilním expresním vektorem je výhodněji takový vektor, který zvětšuje expresní vektor tím, že se hostitelská buňka replikuje. Expresní vektory, které udílí stabilitu plasmidu na dvou nezávislých úrovních, byly nedávno popsány v Galen *a kol.*, Immun. 67:6 424 až 6 433 (1999) a v US patentových přihláškách číslo 09/204 117,



podané 2. prosince 1998 a 09/453 313 podané 2. prosince 1999. Obě jsou zde zahrnuty jako odkaz.

V tomto provedení mohou být jednotlivé funkce začleněny do expresního vektoru za účelem zvýšit dědičnost plasmidu, protože daná bakterie nebo hostitelská buňka roste a následně se dělí. Ve vzácných případech, kdy dceřinná buňka nedědí alespoň jednu kopii expresního vektoru, je aktivován posegregační zabíjecí systém a tím dochází k odstranění této bakterie nebo hostitelské buňky z rostoucí populace prostřednictvím lýze.

C. Bakteriální hostitelské buňky

Pro použití, které je zde uváděno, je vhodná řada druhů bakterií. Vhodné bakteriální druhy budou výhodněji schopny transportovat protein tak, že sledovaný gen může být vhodně přepisován a že sledovaný protein podléhá translaci a je exportován ven z bakterií. V jednom provedení vynálezu je bakterie podávána zvířeti a sledovaný protein tudíž musí být exportován ven z bakterie do zvířete. Může být použita invazivní a neinvazivní bakterie. Mezi invazivní bakterie patří například *Shigella* spp., *Listeria* spp., *Rickettsia* spp. a enteroinvazivní *Escherichia coli*. Výhodnější provedení využívá druhy *Salmonella*.

Konkrétní kmen *Salmonella* použitý v tomto odhalení není nebezpečný. Mezi příklady kmenů *Salmonella*, které mohou být použity v předmětném vynálezu patří *S. Typhi* (ATCC č. 7251) a *S. Typhimurium* (ATCC č. 13311). V předmětném vynálezu jsou výhodněji použity oslabené kmeny *Salmonella* kam patří *S. Typhi aroAaroD* (Hone *a kol.*, Vacc., 9:810 až 816 (1991)) a *S. Typhimurium mutant aroA* (Mastroeni *a kol.*, Micro. Pathol., 13:477 až 491 (1992))). Někdy mohou být zkonstruovány nové oslabené kmeny *Salmonella* a to tak, že jsou začleněny jedna nebo více oslabujících mutací jako je popsáno výše pro *Salmonella* spp.

D. Bioreaktory

Zde popsaný proteinový exportní systém je vytvořen tak, aby mohl být použit v bioreaktorech a podobných zařízeních, která usnadňují růst bakterií a zisk nebo použití žádoucího produktu nebo sledovaného proteinu. Existuje 5 fází, během nichž jsou z bioreaktorů získány biomolekuly: prvotní ošetření, separace v systému pevná látka/kapalina, zahuštění, přečištění (purifikace) a formulace. V rámci těchto fází je možno použít řadu postupů. Pro každou danou fázi jsou postupy následující: prvotní ošetření: rozrušení buněk, stabilizace, sterilizace, pasterizace a flokulace; separace pevná látka/kapalina: filtrace, sedimentace a



centrifugace; Zahuštění: membrány, srážení, odpaření, extrakce a mrazová koncentrace; Přečištění: srážení, extrakce, diafiltrace, adsorpce a chromatografie; a formulace: sušení, potahování, granulace a výroba tablet.

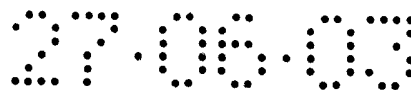
V bioreaktorech, kdy bakterie neexportují požadovaný produkt ven z bakterie, může být bakterie namnožena, indukována tak, aby produkovala žádoucí produkt a poté lyzována za účelem uvolnit obsah. Toto rozrušení je většinou prováděno ve stejném médiu, v němž byla bakterie kultivována. K mechanickému porušení bakterie může být použit homogemizátor nebo kuličkový mlýnek. Při jiném než mechanickém porušování může být použit tepelný šok (který může zničit proteiny), mohou být použity detergenty, rozpouštědla, oddělovadla a enzymy. (Krijgsman, "Releases of Intracellular Components", str. 22 až 42, v *Product Recovery in Bioprocess Technology*, vyd. Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford, Velká Británie, 1992).

Poté, co je bakterie porušena, jsou separovány pevné částice od kapalných (separace pevná látka/kapalina). Požadovaný produkt je většinou obsažen v kapalině, která pak musí být zahuštěna. Poté je požadovaný produkt extrahován ze zahuštěné kapaliny.

Faktory, které negativně ovlivňují separaci žádoucího produktu od nežádoucích pevných látek nebo kapalin, jsou velikost, difuzivita, iontový náboj, rozpustnost a hustota. Při separaci na základě velikosti je možno použít mikrofiltry, textilní nebo vláknité filtry, ultrafiltraci, síta/filtry a gelovou chromatografii. Pro separaci na bázi různé difúze je možno použít reverzní osmózu a dialýzu. Ionexová chromatografie je používána pro separaci podle iontového náboje. Pro separaci požadovaného produktu na základě jeho rozpustnosti je možno použít extrakci rozpouštědlem. Pro separaci podle hustoty je možno použít ultracentrifugy, centrifugy a gravitační sedimentaci (Krijgsman, "Downstream Processing in Biotechnology", str. 2 až 12, v *Product Recovery in Bioprocess Technology*, vyd. Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford, Velká Británie, 1992).

Jednou z výhod použití odhalených systémů je to, že populace rekombinantních bakteriálních hostitelských buněk může být transformována expresním vektorem obsahujícím odhalený proteinový exportní systém a že tato populace bakteriálních hostitelských buněk může být udržována v kultuře a použita pro produkci proteinu, aniž by bylo třeba bakteriální hostitelské buňky sklízet a lyzovat. Kultivace bakteriálních hostitelských buněk a sklizení kultivačního média obsahujícího rekombinantně exprimovaný sledovaný protein mohou být uskutečněny v jakémkoliv typu bioreaktoru.

Existují různé typy bioreaktorů, avšak tato zařízení je možno rozdělit do dvou hlavních kategorií: bioreaktory "s volně plovoucím obsahem" a bioreaktory "s vrstvou". V bioreaktorech "s volně plovoucím obsahem" bakterie volně plavou v médiu. Příklady bioreaktorů "s volně

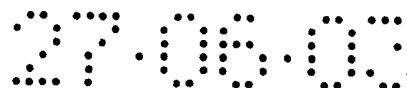


plovoucím obsahem" jsou běžné míchané tankové bioreaktory, probublávané kolony, čerpadlové, víceúčelové věžové bioreaktory, kapalně nepoháněné smyčkové bioreaktory a věžové bioreaktory s pumpou. Příkladem bioreaktoru "s vrstvou" je zhuštěný vrstvomý bioreaktor. V bioreaktoru "s vrstvou" je bakterie zachycena na kuličky, membránu nebo jiný pevný nosič. Hybridní typ bioreaktoru může být vytvořen pomocí fluidizačního vrstvomého bioreaktoru, kde je bakterie sice zachycena na kuličky nebo jiný nosič, ale může plavat v médiu. (Mijnbeek, "The Conventional Stirrer Tank Reactor", str. 39 až 74; Mijnbeek, "Bubble Column, Airlift Reactors, and Other Reactor Designs", str. 75 až 114; Geraats, "An Introduction to Immobilized Systems" str. 115 až 124; vše v "Operational Modes of Bioreactors", vyd. Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford, Velká Británie, 1992).

Použití proteinového exportního systému, který je zde popsán, a bioreaktoru "s vrstvou" umožňuje vynechat prvotní ošetření a separaci pevná látka/kapalina, protože požadovaný sledovaný protein je exportován ven z bakterie do média. Před tím než se začne s izolací požadovaného produktu je pouze potřeba oddělit médium od vrstvy. Pro bioreaktory "s volně plovoucím obsahem" je možno směs kapalina/bakterie odstředit, čímž je získána peleta bakterií. Poté se od pelety bakterií oddělí kapalina obsahující požadovaný protein. Dále je požadovaný sledovaný protein izolován z média. Dalším přínosem odhaleného systému je to, že média budou obsahovat méně nežádoucích proteinů než je přítomno v médiích, v nichž byly bakterie porušeny; všechny intracelulární složky porušených bakterií se podle předmětného vynálezu v médiu nevyskytují. Proto je přečištění požadovaného sledovaného proteinu snazší. Kromě toho izolaci a purifikaci sledovaného proteinu také usnadňují konce a místa pro štěpení proteasami přítomné v sledovaném fúzním proteinu exportní protein::sledovaný protein.

Příkladem bioreaktoru je aparatura uvedená v US patentové přihlášce č. 5 635 368, "Bioreactor with immobilized lactic acid bacteria and the use thereof, " Lommi *a kol.*, 3. červen, 1997, která je zde zahrnuta jako odkaz. Aparatura podle Lommiho se vztahuje k bioreaktoru s imobilizovanými bakteriemi, který je charakterizován tím, že bakterie jsou fixovány na povrch téměř nestlačitelného nosiče. Jiný příklad bioreaktoru je možno najít v US patentu č. 4 910 139, "Method for continuously producing citric acid by dual hollow fibre membrane bioreactor", Chang *a kol.*, 20. březen 1990, který je zde zahrnut jako odkaz. Tento vynález se vztahuje k rostoucím imobilizovaným bakteriím s cílem kontinuálně produkovat kyselinu citronovou.

Další bioreaktor je odhalen v US patentu č. 5 585 266, "Immobilized cell bioreactor", Plitt *a kol.*, 17. prosinec, 1996, který je zde zahrnut jako odkaz. Odhalené zařízení podle Plitta se vztahuje k bioreaktoru s imobilizovanými buňkami, kde se buňky nacházejí v nebo na imobilizační matici zahrnující podpůrné pláty složené z běžné textilní tkaniny. US patenty



č. 4 665 027 a 5 512 480, které jsou zde oba zahrnuty jako odkaz, odhalují další provedení bioreaktoru.

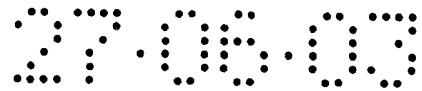
E. Vakcíny

Zde popsany proteinový exportní systém nachází využití při přípravě vakcín. Přípravu např. podjednotkových vakcín je možno provést pomocí proteinového exportního systému, protože systém usnadňuje získání rekombinantního proteinu a snižuje přítomnost kontaminujících proteinů v růstovém médiu, v němž jsou rekombinantní hostitelské buňky množeny. Rekombinantní hostitelské buňky mohou být také použity pro výrobu imunogenních prostředků, v nichž je rekombinantní hostitelská buňka poskytována jedinci a jeho imunitní systém vytváří imunitní odezvu na proteiny exportované z rekombinantní hostitelské buňky.

Proteinový exportní systém, který je zde popsán, může být použit s libovolným antigenem s cílem připravit z něj vakcínu, přičemž antigenem je výše popsany sledovaný protein. Příprava vakcíny je obecně popsána v *New Trends and Developments in Vaccines*, vydáno Voller *a kol.*, University Park Press, Baltimore, Md. USA, 1978. Enkapsulaci do lipozómů popsal například Fullerton, US patent č. 4 235 877. Spojení proteinů a makromolekul odhalili například Likhite, US patent č. 4 372 945 a Armor *a kol.*, US patent č. 4 474 757.

Množství antigenu v každé dávce vakcíny je určeno jako takové množství, které indukuje obrannou imunitní odezvu bez významných nežádoucích vedlejších účinků. Toto množství se bude lišit v závislosti na tom, které specifické antigeny jsou použity a na použitém způsobu dopravení (například, purifikované proteiny nebo živé bakterie). Obecně se očekává, že dávky obsahující purifikované proteiny budou obsahovat 1 až 1000 μg celkového antigenu, výhodněji 2 až 200 μg . Obecně se předpokládá, že dávky obsahující živé bakterie dopravující sledované proteiny budou obsahovat 1 až 1000 ng celkového sledovaného antigenu. Optimální množství pro konkrétní vakcínu může být zjištěno pomocí standardních studií, které zahrnují sledování titerů protilátek a jiných odezev u subjektů. Po úvodním očkování mohou subjekty (zvířata nebo lidé) obdržet jednu nebo více posilovacích dávek, například po 1 a 6 měsících.

Proteinový exportní systém může být použit také u živých bakteriálních vektorových vakcín za účelem zvýšit účinnost preparátu. Například US patent č. 5 387 744 od Curtis *a kol.*, nazvaný "Avirulent microbes and uses thereof: *Salmonella typhi*", který je zde zahrnut jako odkaz, poskytuje živou bakteriální vektorovou vakcínu proti *S. Typhi*. Ještě konkrétněji Curtissův patent poskytuje imunogenní prostředky pro imunizaci obratlovců nebo bezobratlých obsahující avirulentní derivát *S. Typhi*. Deriváty mají mutaci genů *cya a*/nebo *crp a*/nebo *cdt*.



Avirulentní deriváty uvedené Curtisem *a kol.* mohou být transformovány zde popsaným proteinovým exportním systémem, aby umožnily vzniklému rekombinantnímu organismu fungovat jako imunogenní prostředek proti *S. Typhi* a stejně tak i jinému antigenu nebo antigenům, které jsou spojeny s proteinovým exportním proteinem popsaného systému.

F. Další využití

Kromě terapeutických proteinů a antigenů, které jsou užitečné pro farmaceutický průmysl, může sledovaný gen kódovat enzymy, polypeptidy, proteiny nebo aminokyseliny, které mohou být užitečné např. v potravinářském průmyslu, průmyslu pro doplňky výživy, průmyslu aditiv do krmiv, bioprostředkujícím průmyslu, průmyslu na odstraňování odpadu a v průmyslu čištění odpadních vod. Pro účely těchto průmyslů nemusí být sledovaný protein kódovaný sledovaným genem proto, aby splnil svou funkci, izolován z média z bioreaktoru. Sledovaný protein může být katalyzátorem žádoucí reakce nebo může působit jako prekurzorová složka požadované reakce.

Následující příklady jsou poskytovány pouze za účelem ilustrace a nelze je považovat v žádném směru za jakkoliv limitující rozsah předmětného vynálezu.

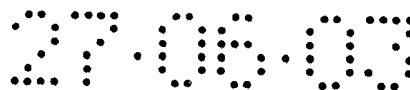
Přehled obrázků ve výkresech

Obrázek 1 poskytuje příklady expresního vektoru tohoto vynálezu. Obrázek 1A zobrazuje expresní vektor pSEC84. Obrázek 1B zobrazuje expresní vektor pSEC84*bla*. Obrázek 1C zobrazuje pSEC84*sacB* (SEQ ID č.:18). Obrázek 1D zobrazuje pSEC84*gfpuv*.

Obrázek 2 zobrazuje exportování proteinové fúze ClyA-SacB, která vede k metabolizování sacharosy v pevném růstovém médiu. Kmeny byly kultivovány v médiu obsahujícím buď 8% sacharosu (2A a 2B), 16% sacharosu (2C a 2D) nebo 8% sacharosu + 8% L-arabinosu (2E a 2F). Obrázky 2A, 2C a 2E ukazují růst CVD 908-*htrA* exprimujícího ClyA. Obrázky 2B, 2D a 2F ukazují růst CVD 908-*htrA* exprimujícího ClyA-SacB.

Obrázek 3 zobrazuje růst CVD 908-*htrA* exprimujícího buď ClyA (pSEC84) nebo ClyA-SacB (pSEC84*sacB*), růst probíhal v médiu 2XLB50 obohaceném DHB a buď 10% sacharosou nebo 10% glukosou.

Obrázek 4 zobrazuje analýzu Western imunoblotem frakcí bakteriálních buněk z CVD 908-*htrA* (dráhy 1 až 3) nebo z CVD 908-*htrA*(pSEC84*gfpuv*) (dráhy 4 až 8). Buněčné frakce jsou nanášeny následovně: supernatanty, dráhy 1 a 4; cytoplasmatické, dráhy 2 a 6;



periplasmatická, dráha 5; nerozpustná, dráha 7; celá buňka, dráhy 3 a 8; a 50 ng GFPuv, dráha 9. Membrány s identickými vzorky byly testovány s protilátkami specifickými pro GFPuv (panel A) nebo *E. coli* GroEL (panel B).

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1 Klonování a mutace *clyA* *S. Typhi*

Identifikace *clyA* byla provedena pomocí analýzy BLASTN dosud kompletované sekvence genomu *S. Typhi*, která je dostupná v Sanger Centre (Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge, CB10 1SA, VB) (<http://www.sanger.ac.uk/Projects/Styphi/blastserver.shtml>), pomocí DNA sekvence *hlyE* z *E. coli* (GenBank přístupové číslo U57430).

Otevřený čtecí rámeček *clyA* byl identifikován jako sekvence o velikosti 912 bp, u níž se předpokládá, že kóduje protein o 304 zbytcích, jehož molekulová hmotnost je 33,8 kDa a který je z 89,4 % identický s HlyE *E. coli*. Ačkoliv *clyA* je z 85,3 % identický s otevřeným čtecím rámečkem *hlyE* z *E. coli* o velikosti 915 bp, je upstream (po směru transkripce) transkripční kontrolní oblast vzdáleně spojená pouze s 33,6 % identických bází v rámci 250 bp oblasti.

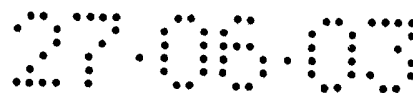
Na základě této analýzy byly navrženy primery pro amplifikaci pomocí PCR genetické kazety bez promotoru kódující ClyA, v níž bylo vytvořeno optimalizované místo pro vazbu na ribozom jako 5'-proximální ke startovnímu kodónu ATG. Sekvence primerů jsou uvedeny v Tab. 1.



Tabulka 1 Primery použité při konstrukci a sekvenční analýze plasmidových kazet

číslo primeru	sekvence ^a	vytvořená kazeta	templát (vzor)
1	5' GGATCC AAAATAAGGAGGAAAAAAAAATGACTAGTATTT TTGCAGAACAACACTGTAGAGGTAGTTAAAAGCGCGATCGA AACCGCAGATGGGGCATTAGATC-3'(SEQ ID č:3)	<i>clyA-tetA</i>	CVD 908- <i>htrA</i>
2	5' CCTAGG TTATCAG GCTAGC GACGTCAGGAACCTCGAAAAG CGTCTTCTTACCATGACGTTGTTGGTATTATTACAGGTGTT AATCATTTTCTTTGCAGCTC-3'(SEQ ID č:4)	"	"
3	5'CACGGTAAGAAGACGCTTTTCGAGGTTCTTGACGTC GCTA GCTGATAACCTAGG TGATGTTAGACAGCTTATCATCGATAA GCTTTAATGCGGTAGT-3'(SEQ ID č:5)	"	pBR322
4	5' AGATCTACTAGT GTTCGAC GCTAGC TATCAGGTCGAGGTG GCCGGCTCCATGCACCGCGACGCAACGCG-3'(SEQ ID č:6)	"	"
5	5' ACTAGT CACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCT GAAGATCAGTTGGGTGCACGA-3'(SEQ ID č:7)	<i>bla-tetA</i>	pGEM-T
6	5'CATTAAAGGTTATCGATGATAAGCTGTCAAACATG AGCTA GCCTAGG TATTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATC TCAGCGATCTGTCTATTTTCG-3'(SEQ ID č:8)	"	"
7	5'CGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTA AGCATTGGTAATG ACTAGGCTAGC TATGTTTGACAGCTT ATCATCGATAACCTTTAATG-3'(SEQ ID č:9)	"	pBR322
8	5'GCGC ACTAGT AAAGAAACGAACCAAAAGCCATATAAGGA AACATACGGCATTTCATATTACACGCCATG-3'(SEQ ID č:10)	<i>sacB-tetA</i>	pIB279
9	5'TAAACTACCGCATTAAAGCTTATCGATGATAAGCTGTCAA ACATG ACCCGGT CACTATTTGTTAACTGTTAATTGTCCTT GTTCAAGGATGCTGTCTTTGAC-3'(SEQ ID č:11)	"	"
10	5'TCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTTAATGCGGT AGTTTA-3'(SEQ ID č:12)	"	pBR322
11	5'GCGC AGATCT TAAATCATCCACAGGAGGCGCTAGCATGAGT AAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTG- 3'(SEQ ID č:13)	<i>gfpuv-tetA</i>	pGEN84
12	5'GTGATAAACTACCGCATTAAAGCTTATCGATGATAAGCTG TCAAACATGAGCGCT CTAGAACTAGT TTCATTATTTGTAGAG CTCATCCATGCCATGTGTAATCCAGCAG-3'(SEQ ID č:14)	"	"

^a Příslušná restriční místa jsou vyznačena silnějším písmem a jsou podtržena; ribosomová vazebná místa a startovní kodóny jsou vyznačeny kurzívou.



Pro lepší návratnost byly použity PCR s překrývajícími se úseky, jejichž cílem bylo vytvořit genetickou kazetu bez promotoru o velikosti 2252 bp *clyA-tetA* syntetizovanou PCR jak bylo již popsáno. Použity byly primer 1, 2 a chromozomální templátová DNA z CVD 908-*htrA* a primery 3, 4 a templát pocházející z pBR322, získané v pGEM-T (Promega, Madison, WI) transformovaným do *E. coli* DH5 α .

Rekombinantní klony byly testovány a vybírány na pevném agarovém médiu obsahujícím ovčí červené krevní buňky. Konkrétněji bylo testování hemolytické aktivity provedeno na čerstvě připraveném 1XLB agarovém médiu obsahujícím odpovídající antibiotickou selekci a 5% ovčí krev. Misky byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 24 h s cílem detekovat zóny odpovídající hemolýze červených krevních buněk (RBC). Některé kolonie, které vytvářely zřetelné kruhy hemolýzy, byly bezprostředně identifikovány. Toto pozorování naznačilo, že jestliže *clyA* vyžaduje pro přemístění ven z bakterie doplňkové proteiny, jsou tyto proteiny podle všeho společné pro *S. Typhi* a *E. coli*. Pro další použití byl vybrán pozitivní izolát, označený jako pGEM-T*clyA*.

Byly testovány funkční úlohy různých oblastí ClyA a to proto, aby byly získány informace pro vlastní úpravu rekombinantních fúzních proteinů kódujících antigen fúzovaný s ClyA. Konkrétněji byla testována úloha aminokonce, karboxylového konce nebo obou v exportu hemolysinu ven z bakterie.

Aby bylo toto zjištěno, byl *clyA* náhodně mutován pomocí transpozonu *TnphoA*. "phoA" z "*TnphoA*" kóduje alkalickou fosfatasu (viz Manoil & Bechwith, PNAS Sv. 82, str. 8 129 až 8 133, 1985). Přemístění *TnphoA* umožňuje náhodnou tvorbu fúzí N-konce PhoA do daného cílového proteinu. Mutace *TnphoA* byla provedena po elektroporaci pGEM-T*clyA*, exprimujícího funkční ClyA hemolysin z *S. Typhi*, do DH5 α za vzniku DH5 α (pGEM-T*clyA*). Poté bylo mezi DH5 α (pGEM-T*clyA*) a *TnphoA* donorovým kmenem SM10(pRT733) provedeno křížení a transkonjuganty byly selektovány na 2XLB50 médiu obohaceném tetracyklinem, karbenicilinem a kanamycinem v koncentracích 10 μ g/ml, 50 μ g/ml a 10 μ g/ml (2XLB50 + T10C50K10). Bakterie byly poté shromážděny dohromady a byly kultivovány v bujónových kulturách, aby mohly být plasmidy purifikovány. Purifikované plasmidy byly znovu transformovány do mutantu *phoA*)20 *E. coli* kmen CC118, aby mohly být selektovány Pho⁺ transformanty na 2XLB50 + T10C50K10 médiu obohaceném substrátem pro alkalickou fosfatasu 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-fosfátem (BCIP; Sigma, St. Louis, MO) v koncentraci 200 μ g/ml. Konečné proteinové fúze, které jsou N-koncově vylučovány do periplasmy, povrchově vystaveny nebo exportovány vně bakterie, mohou být snadno testovány pomocí chromogenního substrátu BCIP



za účelem detekovat temně modré kruhy odpovídající hydrolýze; proteiny, které jsou C-koncově vylučovány nebudou touto metodou detekovány.

Pomocí mutace *TnphoA* bylo u 4 ze 621 *PhoA*⁺ kolonií zjištěno, že nevykazují hemolytickou aktivitu. Sekvenování jednoho izolátu potvrdilo inzerci *PhoA* za zbytek 179 (Ala) *ClyA*. Tato inzerce zkrátila *ClyA* v plánované hydrofobní transmembránové oblasti a odstraňuje zbývajících 125 C-koncových zbytků. Byl tedy učiněn závěr, že C-konec *ClyA* *S. Typhi* není pro transport cytoplasmy *E. coli* (a pravděpodobně také *S. Typhi*) nutný a že genetická fúze heterologních genů, které možná kódují exportované proteinové fúze, musí být provedena na 3'-konci *clyA*.

Příklad 2 Konstrukce C-koncových fúzí testovaných antigenů a *ClyA*

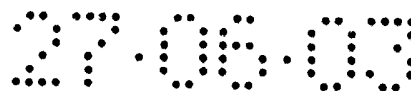
Pro pokusy, během nichž byla testována schopnost exportovat spolupřenášené proteiny fúzované na C-konec *ClyA*, byl zvolen gen *bla*, který kóduje RTEM-1 β -laktamasový protein, který nese rezistenci k ampicilinu a karbenicilinu.

Tato proteinová fúze byla upravena jako genetická fúze kazety *SpeI* inzerované do místa *NheI*, které sousedí s tandemovými stop kodóny v 3'-konci *clyA* pSEC84. Nejdříve byl z derivátu pBR322 pomocí PCR syntetizován fragment *SpeI-NheI* o velikosti 807 bp kódující zralou β -laktamasu o velikosti 268 aminokyselin bez signální 23 zbytkové sekvence. Přečištěný fragment byl poté inzerován do připraveného C-koncového *NheI* místa *clyA* s cílem vytvořit genetickou fúzi *clyA-bla* o velikosti 1742 bp kódující předpovězený fúzní protein o velikosti 62,9 kDa. Požadovaný plasmidový konstrukt byl snadno získán v izolovaných koloniích z kultur, které byly kultivovány v přítomnosti 5 μ g/ml karbenicilinu. Plasmidy získané po selekci s 50 μ g/ml karbenicilinu se však ukázaly jako nestabilní a geneticky pozměněné.

Fúze *bla-tetA*

Z důvodu problému se stabilitou plasmidu a genetickým pozměněním konstruktů *clyA-bla*, což bylo popsáno výše, byla syntetizována fúze *bla-tetA* a to jako *SpeI* kazeta o velikosti 2 111 bp. K tomu byla použita PCR s překrývajícími se úseky s použitím primerů 5 a 6 a templátu pGEM-T a primerů 7 a 4 a templátu pocházejícího z pBR322; výsledkem inzerce této kazety do pSEC84 naštěpeného *NheI* byl pSEC84*bla* (viz obr. 1B).

U kolonií byla po začlenění do CVD 908-*htrA* testována schopnost zachovat si hemolytickou aktivitu a poté u nich byla sledována aktivita β -laktamasy pomocí chromogenního



substrátu nitrocefín v koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ v 2XLA50+DHB+T10; misky byly inkubovány při teplotě 30 °C alespoň 16 h a poté byla sledována přítomnost červených kruhů okolo kolonií, které naznačovaly štěpení nitrocefínu. Červené kruhy byly pozorovány okolo CVD 908-*htrA*(pSEC84*bla*), což naznačuje štěpení nitrocefínu a tudíž potvrzuje přítomnost enzymově aktivní β -laktamasy. Byl učiněn závěr, že přibližně zdvojnásobení molekulové hmotnosti ClyA z 34 na 63 kDa vedlo k 2 doménovému fúznímu proteinu, v němž byly obě domény zřetelně správně sbaleny, aby byla zachována očekávaná biologická aktivita každé domény.

Fúze *sacB-tetA*

Aby mohla být zjištěna přizpůsobivost ClyA jakožto partnera fúze při exportu heterologních antigenů ven ze *S. Typhi*, byla testována schopnost ClyA exportovat potenciálně letální levansacharasu kódovanou *sacB* z *Bacillus subtilis*. Exprese genu *sacB* je letální tehdy, je-li exprimován v cytoplasmě střevních bakterií včetně *S. Typhi*, rostoucích v přítomnosti sacharosy. Byl učiněn pokus o konstrukci proteinové fúze ClyA-SacB s předpovězenou molekulovou hmotností 83,9 kDa a začlenění do CVD 908-*htrA*. Tato fúze byla zpracována jako *sacB-tetA SpeI* kazeta kódující zralou levansacharasu skládající se z 445 zbytků a mající molekulovou hmotnost 50,0 kDa bez 29 aminokyselinové signální sekvence. Poté byla inzertována do vytvořeného C-koncového *NheI* místa ClyA v pSEC84. CVD 908-*htrA* nesoucí požadovaný konstrukt byl vybrán pomocí tetracyklinu a byla testována jeho schopnost přežít v přítomnosti sacharosy. Jestliže by ClyA-SacB nebyl exportován ven z cytoplasmy, nebyly by získány žádné izoláty, ale pro fúze buď povrchově exprimované nebo zcela exportované ven z bakterie do okolního média, by se u enzymově aktivního *SacB* zbytku očekávalo, že bude štěpit sacharosu za vzniku glukosy, která by mohla být ihned transportována do bakterie a metabolizována.

SacB-tetA kazeta byla syntetizována pomocí primerů 8 a 9 a templátu pIB279 a primerů 10 a 4 s cílem vytvořit *SpeI* kazetu o velikosti 2 653 bp inzertovanou do pSEC84 za vzniku *clyA::sacB* fúze pSEC84*sacB* (viz obr. 1C). Po začlenění do CVD 908-*htrA* byla u kolonií znovu testována schopnost zachovat si hemolytickou aktivitu a poté byla sledována aktivita levansacharasy a to tak, že byly umístěny na MacConkey agarové základní médium (Difco) obohacené DHB a buď sacharosou (8% nebo 16% hmotn./obj.) nebo 8% sacharosou + 8% arabinosou, jakožto základním zdrojem uhlíku. Misky byly kultivovány při teplotě 30 °C po dobu 16 až 24 hodin, aby byly získány izolované cfu a aby byla stanovena fermentace sacharidu;



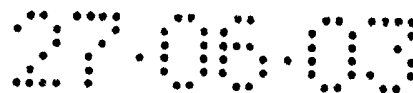
další inkubace při laboratorní teplotě po několik následujících dní byla vyžadována proto, aby byla zjištěna tvorba klenby podobné polysacharidu přes kolonie.

Jak je ukázáno na obr. 2B a 2D, byl růst CVD 908-*htrA*(pSEC84*sacB*), probíhal-li na indikačním médiu obsahujícím buď 8% sacharosu nebo 16% sacharosu jakožto základní sacharidový zdroj (růst na MacConkey agarovém základním médiu), excelentní. Byla pozorována polysacharidu podobná klenba, která se vytvořila přes izolované kolonie CVD 908-*htrA*(pSEC84*sacB*), která však nebyla zjištěna u CVD 908-*htrA* (obr. 2A a 2C) a jejíž intenzita se s rostoucí koncentrací sacharosu zvyšovala. Za předpokladu, že tímto polysacharidu podobným materiálem byl levan, tvořený polymerizací, která je katalyzována levansacharosou, fruktosy uvolněné při hydrolýze sacharosu, jsme se pokusili tuto polymerizaci blokovat tím, že jsme začlenily 8% L-arabinosu, o níž je známo, že levansacharosu inhibuje. Jak je ukázáno na obr. 2F, nebyly již klenby pozorovány a kolonie CVD 908-*htrA* a CVD 908-*htrA*(pSEC84*sacB*) nyní vypadaly velmi podobně.

Jestliže jsou fúze proteinů ClyA-SacB skutečně exportovány ven z CVD 908-*htrA*(pSEC84*sacB*), pak by štěpení sacharosu SacB doménou za vzniku volné glukosy mělo v případě, že tyto kmeny budou kultivovány jako bujónové kultury v přítomnosti sacharosu, poskytnout metabolickou výhodu ve srovnání s CVD 908-*htrA*. Pro ověření této hypotézy byly do 1 l baněk obsahujících 2XLB50+DHB+K10 plus 10% sacharosu umístěno 100 ml kultury buď CVD 908-*htrA*(pSEC84) nebo CVD 908-*htrA*(pSEC84*sacB*). Růst byl porovnáván s kulturami CVD 908-*htrA*(pSEC84), které byly jako pozitivní kontrola kultivovány v přítomnosti 10% glukosy. Jak je ukázáno na obr. 3 byl u CVD 908-*htrA*(pSEC84*sacB*) pozorován rychlejší růst v přítomnosti sacharosu než u CVD 908-*htrA*(pSEC84) rostoucí v přítomnosti glukosy nebo sacharosu. Zjištění byla potvrzena počítáním buněk. Jestliže toto dáme dohromady s výsledky, které byly pozorovány pro ClyA-Bla výše, data jasně naznačují, že ClyA je univerzálním fúzním partnerem pro export správně sbalených fúzních proteinů v nichž je zachována biologická aktivita fúzovaných domén ven z bakterie.

Fúze *clyA::gfpuv*

Aby byly definovány exportní vlastnosti ClyA a aby byla specificky ověřena přítomnost fúzních produktů ClyA v supernatantu exponenciálně rostoucího CVD 908-*htrA*, byla konstruována genetická fúze *clyA*, kde *clyA* byl fúzován s fluorescenčním zeleným proteinem (GFPuv) vytvářejícím kazetu *clyA::gfpuv* pSEC84*gfpuv* (viz obr. 1D) a izogenní pro pSEC84*bla* i pSEC84*sacB*. CVD 908-*htrA*(pSEC84*gfpuv*) opět zůstal hemolytický, ale se sníženou



fluorescencí oproti cytoplasmaticky exprimovanému GFPuv. Pomocí GFP polyklonální protilátky (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) byl pomocí Western imunoblotové analýzy testován export ClyA-GFPuv do supernatantu kultury, což je ukázáno na obr. 4. Obr. 4 zobrazuje sadu Western imunoblotů analyzujících bakteriální buněčné frakce z CVD 908-*htrA* (dráhy 1 až 3) nebo CVD 908-*htrA*(pSEC84gfpuv) (dráhy 4 až 8). Buněčné frakce byly naneseny následovně: supernatanty, dráhy 1 a 4; cytoplasmatické, dráhy 2 a 6; periplasmatická, dráha 5; nerozpustná, dráha 7; celé buňky, dráhy 3 a 8; a 50 ng GFPuv, dráha 9. Membrány s identickými vzorky byly podrobeny reakci s protilátkami specifickými pro GFPuv (panel A) nebo *E. coli* GroEL (panel B). Jak je patrné z tohoto obrázku, bylo významné množství očekávaného fúzního proteinu o velikosti 61 kDa detekováno v 0,5 ml supernatantu z CVD 908-*htrA*(pSEC84gfpuv) sráženého TCA (dráha 4); nevýznamné křížové reakce odpovídající velikosti asi 45 kDa byla rovněž detekována v cytoplasmě CVD 908-*htrA* (dráha 2) a v cytoplasmatických, nerozpustných a celobuněčných frakcích CVD 908-*htrA*(pSEC84gfpuv); zajímavé je, že dráha 5 ukazuje, že z periplasmatického prostoru je získáno velmi málo ClyA-GFPuv.

Závěr

Výsledky této práce jasně podporují závěr, že kódovaný hemolysin ClyA ze *S. Typhi* může být použit k usnadnění exportu heterologních antigenních domén ven z oslabeného očkovacího kmene CVD 908-*htrA* do okolního média. Tato práce dále ukazuje, že ClyA je možno použít k usnadnění exportu fúzního proteinu ven z bakterie do okolního média. Jak je zobrazeno výše, byla schopnost exportovat správně sbalené proteiny, které jsou předmětem zájmu, fúzované na C-konec ClyA, ukázána prostřednictvím genu *bla*, který kóduje RTEM-1 β -laktamasový protein, který nese rezistenci k ampicilinu a karbenicilinu. Gen *bla* v pBR322 je 861 bp dlouhý a kóduje protein o velikosti 31,5 kDa se signální 23 aminokyselinovou sekvencí, která řídí N-koncové vylučování β -laktamasy do periplasmatického prostoru. Tato práce naznačuje úspěšné vytvoření genové fúze kódující funkční fúzi proteinů ClyA- β -laktamasa, která si uchovává hemolytickou aktivitu i schopnost štěpit chromogenní substrát β -laktamasy nitrocefín, čímž dochází k produkci červených kruhů na žlutém pozadí neštěpeného nitrocefínu.

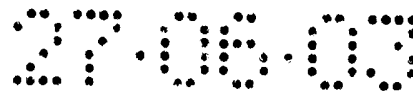
Zajímavé je, že pokusy selektovat tyto expresní vektory, když transformanty rostly v bohatém médiu obohaceném 50 μ g/ml karbenicilinu nebo ampicilinu, byly neúspěšné, a byly získány pouze značně přeskupené plasmidy, což bylo potvrzeno pomocí restričních map. Na závěr bylo ukázáno, že exprimovaná cytoplasmatická β -laktamasa nese rezistenci k přibližně 5 μ g/ml ampicilinu, zatímco příslušně exprimovaná periplasmatická β -laktamasa udílí rezistenci

vůči více než 4 000 $\mu\text{g/ml}$ ampicilinu. U povrchového zobrazení β -laktamasových proteinových fúzí však bylo ukázáno, že udílí rezistenci vůči asi 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicilinu. Chervaux *a kol.* skutečně oznámili, že sekrece β -laktamasových fúzí z *E. coli* zprostředkovaná HlyA znovu udílí malou rezistenci vůči asi 5 $\mu\text{g/ml}$ ampicilinu. Ukázali, že i přesto, že specifická aktivita neporušené β -laktamasové domény povrchové fúze zůstala podobná aktivitě nemodifikované β -laktamasy, rezistence vůči vysokým hladinám ampicilinu zjištěna nebyla. Učinili tedy závěr, že bakteriální rezistence vůči β -laktamovým antibiotikům vyžaduje významné koncentrace β -laktamasy v periplasmatickém prostoru blízko zabíjeným cílům. Na základě těchto pozorování byl učiněn závěr, že v CVD 908-*htrA*(pSEC84*bla*) byly syntetizovány správně sbalené ClyA-beta-laktamasové proteinové fúze a byly exportovány tak, aby udělily hemolytický fenotyp i β -laktamasou zprostředkovanou hydrolýzu chromogenního cefalosporinového nitrocefínu, aniž by však byla udělena rezistence k ampicilinu nebo karbenicilinu.

Pro jasnější definování povahy exportu zprostředkovaného ClyA heterologních antigenových domén ven z CVD 908-*htrA* a možná také vyloučení toho, aby byly zahrnuty periplasmatické intermediáty, byly studovány fúze *sacB* kódující potenciálně letální levansacharasy z *B. subtilis*. Levansacharasa je 50 kDa exoenzym s jedním polypeptidovým řetězcem, který katalyzuje hydrolýzu sacharosy za vzniku volné glukosy a fruktosy a střídavě katalyzuje polymerizaci fruktosy do dlouhých polymerů nazvaných levan. Výsledkem uvolňování levansacharasy z *B. subtilis*, který roste na médiu obsahujícím sacharosu, je růst izolovaných kolonií, které jsou po prodloužené inkubaci při laboratorní teplotě potaženy působivou klenbou viskózního levanu.

Bylo potvrzeno, že cytoplasmatická a periplasmatická exprese levansacharasy kódované *sacB* je pro řadu bakterií rostoucích v přítomnosti sacharosy letální. Nedávno bylo pomocí mutací signálního peptidu ukázáno, že levansacharasa se stává v cytoplasmě *B. subtilis*, který je kultivovaný v přítomnosti sacharosy, letální a že inaktivace aktivity fruktosapolymerázy byla pro odstranění sacharosu indukované letality nezbytná. Na základě tohoto bylo uvedeno, že výsledkem selhání fúzí ClyA-SacB z pohledu jejich exportu ven z cytoplasmatického a periplasmatického prostoru CVD 908-*htrA* by měla být výrazná intracelulární akumulace fúzního proteinu, jejíž výsledkem je letalita pro CVD 908-*htrA*(pSEC84*sacB*), který je kultivován v přítomnosti sacharosy.

Jak je ukázáno na obr. 2B nebylo však u CVD 908-*htrA*(pSEC84*sacB*) pozorováno pouze to, že roste v přítomnosti 8% sacharosy, ale že také fermentuje cukr, tzn. fenotyp, který nebyl pozorován u CVD 908-*htrA*(pSEC84), který byl kultivován za stejných podmínek. Když byla koncentrace sacharosy zvýšena z 8% na 16%, zvýšila se rovněž fermentace sacharosy a

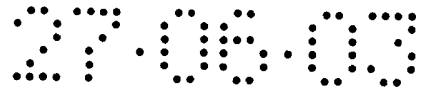


docházelo k akumulaci jedinečných kleneb tvořených látkou podobnou levanu, které v přítomnosti inhibitoru levansacharasy arabinosy vymizely. Podobná pozorování aktivity levansacharasy oznámil Jung *a kol.* pro povrchově exprimovanou levansacharasovou doménu fúzovanou na C-konec ice nucleation proteinu z *Pseudomonas syringae* a exprimovanou v *E. coli*. Ve světle těchto výsledků byl učiněn závěr, že vytvořený CVD 908-*htrA*(pSEC84*sacB*) měl schopnost zpracovávat sacharosu jako zdroj uhlíku v takových experimentech, v nichž bylo u CVD 908-*htrA*(pSEC84*sacB*) pozorováno, že roste rychleji než CVD 908-*htrA*(pSEC84), který byl kultivován v přítomnosti buď sacharosy nebo čisté glukosy. Byl opět učiněn závěr, že stejně jako u proteinových fúzí ClyA-beta-laktamasa popsáných výše, byly v CVD 908-*htrA* syntetizovány správně sbalené proteinové fúze ClyA-SacB a byly exportovány tak, že udílely jak očekávaný hemolytický fenotyp tak i levansacharasovou aktivitu umožňující, aby nebyl extracelulární katabolismus náhradního zdroje sacharidu využíván hostitelským kmenem bez plasmidu.

Příklad 3 Exprese proteinové fúze ClyA-SacB v bioreaktoru

Bioreaktor je připraven podle návodů v US patentu č. 5 635 368, který je zde zahrnut jako odkaz. Stručně, granulární derivatizovaná celulóza je vyrobena podle US patentu č. 4 355 117 následujícím způsobem: 25 dílů vláknité celulózy je smícháno s 25 díly oxidu titaničitého a směs je smíchána s 50 díly polystyrenu. Extrudát je ochlazen ve vodě a vytríděn na velikost částic 0,35 až 0,85 mm. Vytríděné granulární shluklé částice celulózy jsou derivatizovány s cílem vytvořit DEAE celulosu, což je popsáno v US patentu výše. Poté je 10 g granulární DEAE celulózy suspendováno v destilované vodě a suspenze je ponechána po dobu alespoň 5 h za občasného míchání. Hydratovaný nosič je poté přelit destilovanou vodou a je převeden do skleněné kolony s vnitřním průměrem 15 mm, kde vytvoří vrstvu o výšce 145 mm.

Bakterie transformovaná pSEC84*sacB* (viz příklad 2) je kultivována 48 h při teplotě 30 °C. 50 ml buněčné suspenze je pomocí čerpadla čerpáno přes vrstvu nosiče při průtokové rychlosti 25 ml/h. Poté jsou přes vrstvu nosiče čerpána další množství média s kulturou. Roztok vytékající z kolony je shromažďován a je z něj izolován a purifikován rekombinantně exprimovaný fúzní protein ClyA-SacB (kódovaný SEQ ID č.:19). Štěpení SacB by mělo poskytnout taková komerční množství levansacharasy, která jsou dostatečná pro tvorbu levanu.



Příklad 4 Purifikace proteinu pomocí His konce za denaturujících podmínek

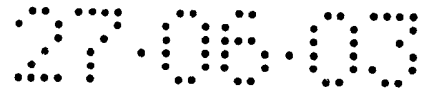
Bakteriální kultura je transformována expresním vektorem, který obsahuje expresní kazetu obsahující kódující sekvenci pro oslabený ClyA protein fúzovanou s genem *sacB*, který je fúzován s kódující sekvencí, která kóduje proteasové rozpoznávací místo, která je fúzována s sekvencí kódující polyhistidinový konec. Bakteriální kultura je dána do bioreaktoru, který je popsán např. v příkladu 3.

Kultura je umístěna do podmínek, které podporují expresi rekombinantního fúzního proteinu, který je exportován do kultivačního média. Médium s kulturou je shromážděno a aplikováno na Ni kolonu (HISTRAP; Pharmacia) ekvilibrovanou pufrům s močovinou v koncentraci, která je dostatečně vysoká, aby denaturovala protein. Kolona je poté promyta a eluována. Eluát je analyzován gelovou elektroforézou s cílem stanovit přítomnost purifikovaného proteinu.

Frakce obsahující purifikovaný protein jsou dialyzovány proti pufru na štěpení enzymu. Dialyzované vzorky jsou poté shromážděny dohromady a podrobeny proteolýze, která je katalyzována příslušným enzymem. Proteolyzovaný vzorek je purifikován s cílem odstranit vyštěpený polyhistidinový konec za vzniku izolovaného přečištěného proteinu.

Příklad 5 Konstrukce oslabeného CVD 908-*htrA*, který exprimuje Frag C a vyvolává na něj imunitní odezvu

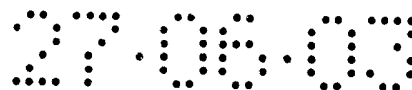
Fúzní protein ClyA-Frag C je vytvořen v CVD 908-*htrA* podle kroků, které jsou uvedeny v příkladu 1. Naším cílem je exprimovat kodónem optimalizovaný otevřený čtecí rámec *toxC*, který kóduje fragment C toxinu tetanu inzertovaný do ClyA, který je exprimován ze zde odhaleného expresního vektoru. Export fragmentu C je realizován prostřednictvím genetické fúze *toxC* na 3'-konec *clyA* a pokračující na *oriE1* replikonu pSEC84 jakožto 1426 bp velká *P_{ompC-clyA} EcoRI-NheI* kazeta. *toxC* kódující fragment C je přepracován z dřívějších konstruktů za pomoci protisměrného (forward) primeru 5'-GCGCACTAGTAAAAACCTTGATTG TTGGGTCGACAACGAAGAAGACATCGATGTTATCCTGAAAAGTCTACCATTCTGAC TTGGACATCAAC-3' (SEQ ID č:15) a protisměrného primeru 5'-AACTACCGCATTAA AGCTTATCGATGATAAGCTGTCAAACATGAGGCTAGCCTAGGTCATTAGTCGTTGGTC CAACCTTCATCGGTCGGAACGAAGTA-3' (SEQ ID č:16) tak, aby vytvářel žádoucí PCR produkt (1424 bp). *toxC* kazeta je poté subklonována do pSEC84 naštěpeného *NheI* za vzniku pSEC84*toxC*. DNA sekvence požadovaného spojení *clyA-toxC* je potvrzena pomocí



sekvenačního primeru 5'-CGATGCGGCAAAATTGAAATTAGCCACTGA-3' (SEQ ID č:17), který hybridizuje 172 bází po směru transkripce vytvořeného *NheI* místa na 3'-konci *clyA*. U konstruktů je testována schopnost zachovat si hemolytickou aktivitu a pomocí Western imunoblotové analýzy je potvrzen export ClyA-Frag C do supernatantu.

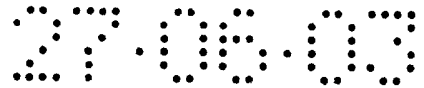
Skupiny 6 týdnů starých myši Balb/c jsou imunizovány intranasálně množstvím $1,0 \times 10^{10}$ cfu kmene CVD 908-*htrA*, který exprimuje fúzní protein ClyA-Frag C. Myším je odebrána krev před a 30 dní po imunizaci a sérum je až do použití skladováno při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Protilátky přítomné v séru proti antigenům ClyA a Frag C jsou stanoveny pomocí ELISA. Výsledky naznačují, že imunizace kmenem CVD 908-*htrA*, který exprimuje fúzní protein ClyA-Frag C, vyvolává tvorbu hladin protilátek proti antigenu Frag C, které jsou podstatně vyšší než jsou hladiny získané u kmene 908-*htrA*, který fúzní protein ClyA-Frag C neexprimuje. Výsledky ukazují, že exprese antigenu Frag C jakožto fúzního proteinu s ClyA zvyšuje imunitní odezvu proti tomuto antigenu. Obranná imunita proti tetanovému toxinu je potvrzena vypořádáním se imunizované myši s jinak letálními dávkami přirozeného tetanového toxinu.

Ačkoliv výše uvedené odhalení popisuje vynález podrobněji a s odkazem na specifická provedení, bude odborníkům v dané oblasti techniky jistě zřejmé, že mohou být provedeny různé změny a modifikace, aniž by tím došlo k odchýlení se od smyslu a rozsahu vynálezu.

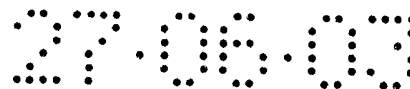


Literatura:

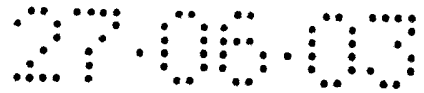
- Atkins, A., N. R. Wyborn, A. J. Wallace, T. J. Stillman, L. K. Black., A. B. Fielding, M. Hisakado, P. J. Artymiuk a J. Green.** 2000. Structure-function relationships of a novel bacterial toxin, hemolysin E. The role of α_6 . *J. Biol. Chem.* **275**: 41 150 až 41 155.
- Bailey, J. E.,** Host-vector interactions in *Escherichia coli*, str. 29 až 77. V A. Fiechter (vyd.), *Advances in Biochemical Engineering. Biotechnology*, Springer-Verlag, Berlin (1993).
- Balbas, P., X. Soberon, E. Merino, M. Zurita, H. Lomeli, F. Valle, N. Flores a F. Bolivar.** 1986. Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivatives - a review. *Gene* **50**: 3 až 40.
- Blomfield, I. C., V. Vaughn, R. F. Rest a B. I. Eisenstein.** 1991. Allelic exchange in *Escherichia coli* using the *Bacillus subtilis sacB* gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon. *Mol. Microbiol.* **5**: 1 447 až 1 457.
- Boe, L., K. Gerdes a S. Molin.** 1987. Effects of genes exerting growth inhibition and plasmid stability on plasmid maintenance. *J. Bacteriol.* **169**: 4 646 až 4 650.
- Borchert, T. V. a V. Nagarajan.** 1991. Effect of signal sequence alterations on the export of levansucrase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **173**: 276 až 282.
- Bramucci, M. G. a V. Nagarajan.** 1996. Direct selection of cloned DNA in *Bacillus subtilis* based on sucrose-induced lethality. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3 948 až 3 953.
- Chervaux, C., N. Sauvonnnet, A. Le Clainche, B. Kenny, A. L. Hunt, J. K. Broome-Smith a I. B. Holland.** 1995. Secretion of active β -lactamase to the medium mediated by the *Escherichia coli* haemolysin transport pathway. *Mol. Gen. Genet.* **249**: 237 až 245.
- Corchero, J. L. a A. Villaverde.** 1998. Plasmid maintenance in *Escherichia coli* recombinant cultures is dramatically, steadily, and specifically influenced by features of the encoded proteins. *Biotechnol. Bioeng.* **58**: 625 až 632.



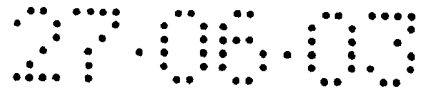
- Cserjan-Puschmann, M., W. Kramer, E. Duerrschmid, G. Streidner a K. Bayer.** 1999. Metabolic approaches for the optimisation of recombinant fermentation processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**: 43 až 50.
- Datta, N. a P. Kontomichalou.** 1965. Penicillinase synthesis controlled by infectious *R* factors in Enterobacteriaceae. *Nature* **208**: 239 až 241.
- Dedonder, R.** 1966. Levansucrase from *Bacillus subtilis*, str. 500 až 505. V E. F. Neufeld and V. Ginsburg (vyd.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York.
- del Castillo, F. J., S. C. Leal, F. Moreno a I del Castillo.** 1997. The *Escherichia coli* K-12 *sheA* gene encodes a 34-kDa secreted haemolysin. *Mol. Microbiol.* **25**: 107 až 115.
- Fouet, A., M. Arnaud, A. Klier a G. Rapoport.** 1984. Characterization of the precursor form of the exocellular levansucrase from *Bacillus subtilis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **119**: 795 až 800.
- Galen, J. E., O. G. Gomez-Duarte, G. Losonsky, J. L. Halpern, C. S. Lauderbaugh, S. Kaintuck, M. K. Reymann a M. M. Levine.** 1997. A murine model of intranasal immunization to assess the immunogenicity of attenuated *Salmonella typhi* live vector vaccines in stimulating serum antibody responses to expressed foreign antigens. *Vaccine* **15**: 700 až 708.
- Galen., J. E. a M. M. Levine.** 2001. Can a "flawless" live vector vaccine strain be engineered? *Trends in Microbiology* **9**: 372 až 376.
- Galen, J. E., J. Nair, J. Y. Wang, S. S. Wasserman, M. K. Tanner, M. Sztein a M. M. Levine.** 1999. Optimization of plasmid maintenance in the attenuated live vector vaccine strain *Salmonella typhi* CVD 908-*htrA*. *Infect. Immun.* **67**: 6 424 až 6 433.
- Gay, P., D. Le Coq., M. Steinmetz, T. Berkelman a C. I. Kado.** 1985. Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **164**: 918 až 921.



- Gay, P., D. Le Coq, M. Steinmetz, E. Ferrari a J. A. Hoch.** 1983. Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase od *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **153**: 1 424 až 1 431.
- Glick, B. R.**, *Biotechnol. Adv.* **13**: 247 až 261 (1995).
- Han, Y. W.**, 1990. *Microbiol. levan. Advances in Applied Microbiology* **35**: 171 až 194.
- Harcum and Bentley.** 1993. *Biotechnol. Bioeng.* **42**: 675 až 685.
- Hone, D.M., A. M. Harris, S. Chatfield, G. Dougan a M. M. Levine.** 1991. Construction of genetically defined double *aro* mutants of *Salmonella typhi*. *Vaccine* **9**: 810 až 816.
- Jung, H., J. Lebeault a J. Pan.** 1998. Surface display of *Zymomonas mobilis* levansucrase by using the ice-nucleation protein of *Pseudomonas syringae*. *Nat. Bitechol.* **16**: 576 až 580.
- Lattemann, C. T., J. Maurer, E. Gerland a T. F. Meyer.** 2000. Autodisplay: functional display of active β -lactamase on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I autotransporter. *J. Bacteriol.* **182**: 3 726 až 3 733.
- Le Coq, D., P. Ratet, M. Steinmetz a P. Gay.** 1984. A genetic approach to levansucrase secretion in *Bacillus subtilis*, str. 141 až 152. V A. T. Ganesan a J. A. Hoch (vyd.), *Genetics and biotechnology of bacilli*. Academic Press, New York.
- LeBrun, E. a R. van Rapenbusch.** 1980. The structure of *Bacillus subtilis* levansucrase at 3.8 Å resolution. *J. Biol. Chem.* **255**: 12 034 až 12 036.
- Ludwig, A., S. Bauer., R. Benz., B. Bergmann a W. Goebel.** 1999. Analysis of the SlyA-controlled expression, subcellular localization and pore-forming activity of a 34 kDa haemolysin (ClyA) from *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **31**: 557 až 567.
- Matthew, M. a R. W. Hedges.** 1976. Analytical isoelectric focusing of R factor-determined β -lactamase: correlation with plasmid compatibility. *J. Bacteriol.* **125**: 713 až 718.



- McDermott, P. J., P. Gowland a P. C. Gowland.** 1993. Adaptation of *Escherichia coli* growth rates to the presence of pBR322. *Lett. Appl. Microbiol.* **17**: 139 až 143.
- Orr, N., J. E. Galen a M. M. Levine.** 1999. Expression and immunogenicity of a mutant diphtheria toxin molecule, CRM₁₉₇, and its fragments in *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 908-*htrA*. *Infect. Immun.* **67**: 4 290 až 4 294.
- Oscarsson, J., Y. Mizunoe, L. Li, X. Lai, A. Wieslander a B. E. Uhlin.** 1999. Molecular analysis of the cytolytic protein ClyA (SheA) from *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **32**: 1 226 až 1 238.
- Oscarsson, J., Y. Mizunoe, B. E. Uhlin a D. J. Haydon.** 1996. Induction of haemolytic activity in *Escherichia coli* by the *slyA* gene product. *Mol. Microbiol.* **20**: 191 až 199.
- Pecota, D. C., C. S. Kim, K. Wu, K. Gerdes a T. K. Wood.** 1997. Combining the *hok/sok*, *parDE*, and *pnd* postsegregational killer loci to enhance plasmid stability. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1 917 až 1 924.
- Pluckthun, A. a J. R. Knowles.** 1987. The consequences of stepwise deletions from the signal-processing site of β -lactamase. *J. Biol. Chem.* **262**: 3 951 až 3 957.
- Ried, J. a A. Collmer.** 1987. An *npI-sacB-sacR* cartridge for constructing directed, unmarked mutations in Gram-negative bacteria by marker exchange-eviction mutagenesis. *Gene* **57**: 239 až 246.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch a T. Maniatis.** 1989. Anonymous Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sambrook, J. a D. W. Russell.** 2001. Expression of cloned genes in *Escherichia coli*, 1535 Anonymous Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.



Shaw, K. J., P. N. Rather, R. S. Hare a G. H. Miller. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol. Rev.* **57**: 138 až 163.

Smith & Bidochka. *Can. J. Microbiol.* **44**: 351 až 355 (1998).

Steinmetz, M., D. Le Coq, H. B. Djemia a P. Gay. 1983. Genetic analysis of *sacB*, the structural gene of a secreted enzyme, levansucrase of *Bacillus subtilis* Marburg. *Mol. Gen. Genet.* **191**: 138 až 144.

Summers, D. K. 1998. Timing, self-control and sense of direction are the secrets of multicopy plasmid stability. *Mol. Microbiol.* **29**: 1 137 až 1 145.

Sutcliffe, J. G. 1978. Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **75**: 3 737 až 3 741.

Tacket, C. O., M. Sztein, G. Losonsky, S. S. Wasserman, J. P. Nataro, R. Edelman, D. Pickard, G. Dougan, S. Chatfield a M. M. Levine. 1997. Safety of live oral *Salmonella typhi* vaccine strains with deletions in *htrA* and *aroC aroD* and immune responses in humans. *Infect. Immun.* **65**: 452 až 456.

Wallace, A. J., T. J. Stillman, A. Atkins, S. J. Jamieson, P. A. Bullough, J. Green a P. J. Artymiuk. 2000. *E. coli* hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA): X-ray crystal structure of the toxin and observation of membrane pores by electron microscopy. *Cell* **100**: 265 až 276.

Wang, J. Y., F. Noriega, J. E. Galen, E. M. Barry a M. M. Levine. 2000. Constitutive expression of the Vi polysaccharide capsular antigen in attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi oral vaccine strain CVD 909. *Infect. Immun.* **68**: 4 647 až 4 652.

Wang, J. Y., M. F. Pasetti, F. Noriega, R. J. Anderson, S. S. Wasserman, J. E. Galen, M. Sztein a M. M. Levine. 2001. Construction, genotypic and phenotypic characterization, and immunogenicity of attenuated *DguaBA Salmonella enterica* serovar Typhi strain CVD 915. *Infect. Immun.* **69**: 4 734 až 4 741.

Wu, K. a T. K. Wood. 1994. Evaluation of the *hok/sok* killer locus for enhanced plasmid stability. *Biotechnol. Bioeng.* 44: 912 až 921.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob exprese genu v bakteriální buňce, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se skládá z:
poskytnutí expresního vektoru populaci netransformovaných bakteriálních buněk, kde expresní vektor zahrnuje expresní kazetu, která obsahuje sekvenci kódující exportní protein geneticky fúzovanou se sekvencí kódující sledovaný protein;
exprimování expresní kazety tak, že je produkován fúzní protein exportní protein::sledovaný protein a je exportován do kultivačního média;
2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněnou bakteriální buňkou je buňka *S. Typhi*.
3. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněnou bakteriální buňkou je buňka *Escherichia coli*.
4. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že sekvence kódující exportní protein je vybrána ze skupiny, kterou tvoří gen *clyA* ze *S. Typhi*, gen *clyA* ze *S. paratyphi* nebo gen *hlyE* z *Escherichia coli*.
5. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že sekvence kódující exportní protein kóduje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID č:2.
6. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že sekvence kódující exportní protein kóduje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID č:2 s jednou nebo více mutacemi, jejichž výsledkem jsou aminokyselinové substituce vybrané ze skupiny, kterou tvoří aminokyselinové substituce v pozici 180, 185, 187 a 193, které oslabují hemolytickou aktivitu exportního proteinu.
7. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že sledovaným proteinem je antigen.
8. Způsob vyvolání imunitní odezvy u hostitele, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se skládá z:
poskytnutí populace bakteriálních buněk transformovaných expresním vektorem, který zahrnuje expresní kazetu obsahující sekvenci kódující exportní protein geneticky fúzovanou na sekvenci kódující sledovaný protein, zmíněnému hostiteli;



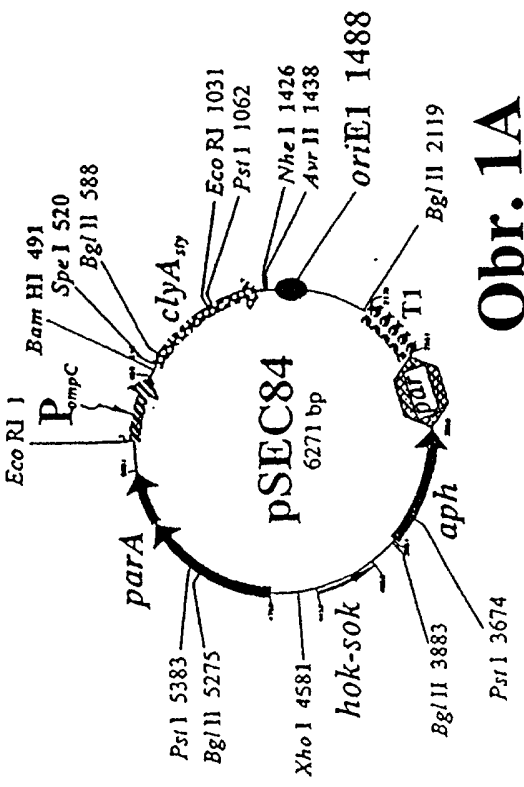
exprimování expresní kazety tak, že je produkován fúzní protein exportní protein::sledovaný protein a je exportován do hostitele; a

vyvolání imunitní odezvy proti fúznímu proteinu u subjektu.

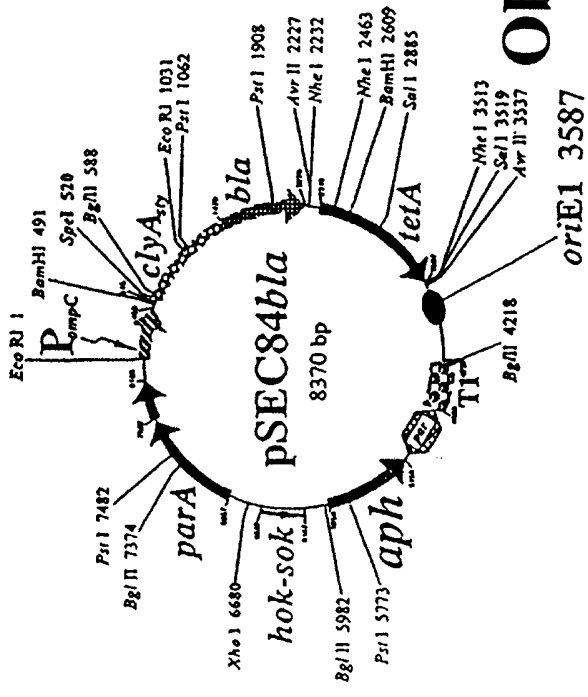
9. Způsob podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněnou bakteriální buňkou je buňka *S. Typhi*.
10. Způsob podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněnou bakteriální buňkou je buňka *Escherichia coli*.
11. Způsob podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že sekvence kódující exportní protein je vybrána ze skupiny, kterou tvoří gen *clyA* ze *S. Typhi*, gen *clyA* ze *S. paratyphi* nebo gen *hlyE* z *Escherichia coli*.
12. Způsob podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že sekvence kódující exportní protein kóduje aminokyselinovou sekvenci podle SEQ ID č: 2.
13. Způsob podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že sekvence kódující exportní protein kóduje aminokyselinovou sekvenci podle SEQ ID č:2 s jednou nebo více mutacemi, jejichž výsledkem jsou aminokyselinové substituce vybrané ze skupiny, kterou tvoří aminokyselinové substituce v pozici 180, 185, 187 a 193, které oslabují hemolytickou aktivitu exportního proteinu.
14. Způsob podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že sledovaným proteinem je antigen.
15. Systém pro exprimování sledovaného proteinu, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje:
 - expresní vektor obsahující expresní kazetu, přičemž expresní kazeta obsahuje sekvenci kódující exportní protein geneticky fúzovanou na sekvenci kódující sledovaný protein;
 - hostitelskou buňku transformovanou expresním vektorem; a
 - kultivační prostředí pro transformovanou hostitelskou buňku, přičemž expresní kazeta exprimuje fúzní protein exportní protein::sledovaný protein, který je exportován ven z transformované hostitelské buňky.

16. Způsob podle nároku 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněnou hostitelskou buňkou je buňka *S. Typhi*.
17. Způsob podle nároku 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněnou hostitelskou buňkou je buňka *Escherichia coli*.
18. Způsob podle nároku 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, že sekvence kódující exportní protein je vybrána ze skupiny, kterou tvoří gen *clyA* ze *S. Typhi*, gen *clyA* ze *S. paratyphi* nebo gen *hlyE* z *Escherichia coli*.
19. Způsob podle nároku 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, že sekvence kódující exportní protein kóduje aminokyselinovou sekvenci podle SEQ ID č:2.
20. Způsob podle nároku 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, že sekvence kódující exportní protein kóduje aminokyselinovou sekvenci podle SEQ ID č:2 s jednou nebo více mutacemi, jejichž výsledkem jsou aminokyselinové substituce vybrané ze skupiny, kterou tvoří aminokyselinové substituce v pozici 180, 185, 187 a 193, které oslabují hemolytickou aktivitu exportního proteinu.

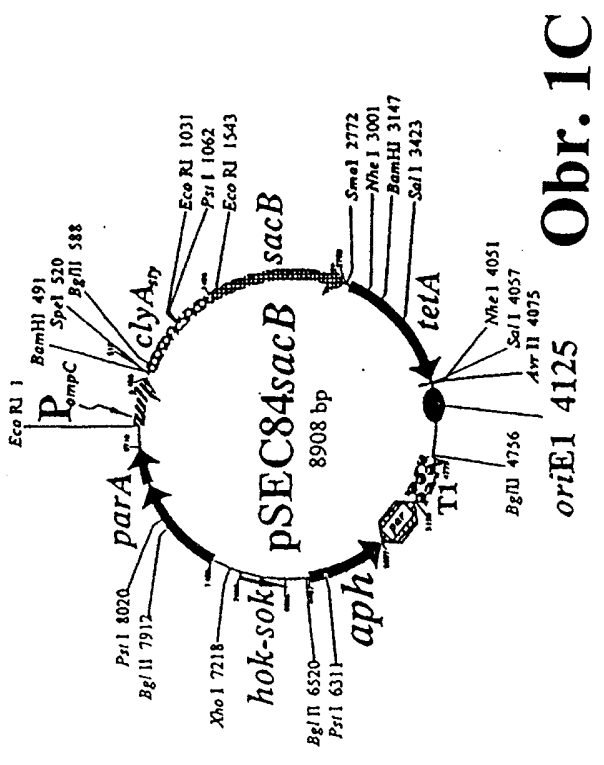
2000
 PV 2003-1348 YPC



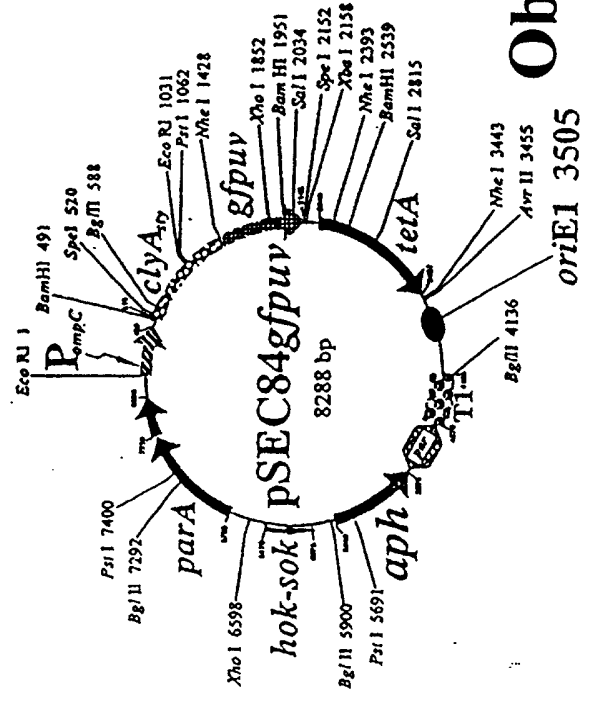
Obrr. 1A



Obrr. 1B



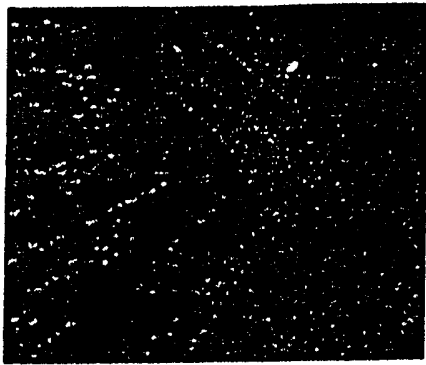
Obrr. 1C



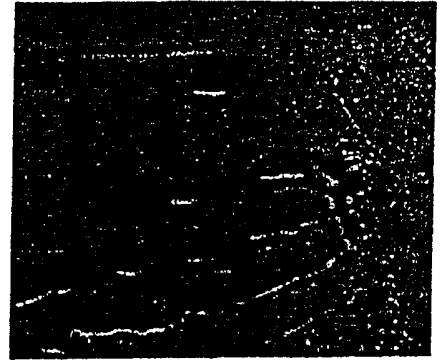
Obrr. 1D

27.08.03

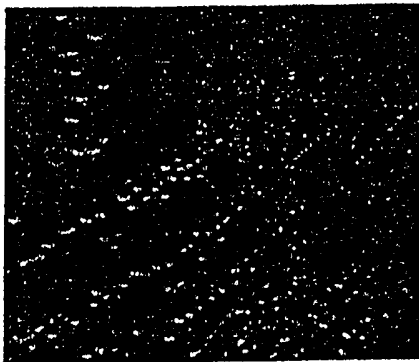
A.



B.



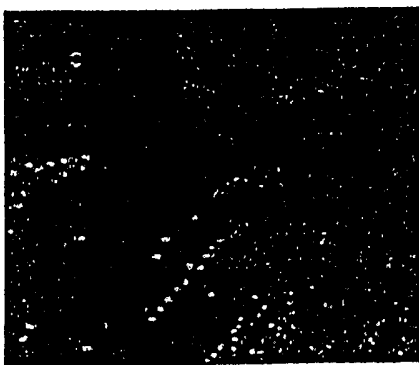
C.



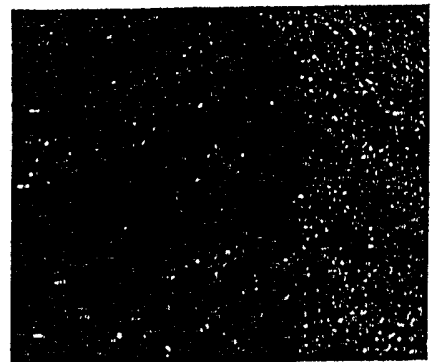
D.



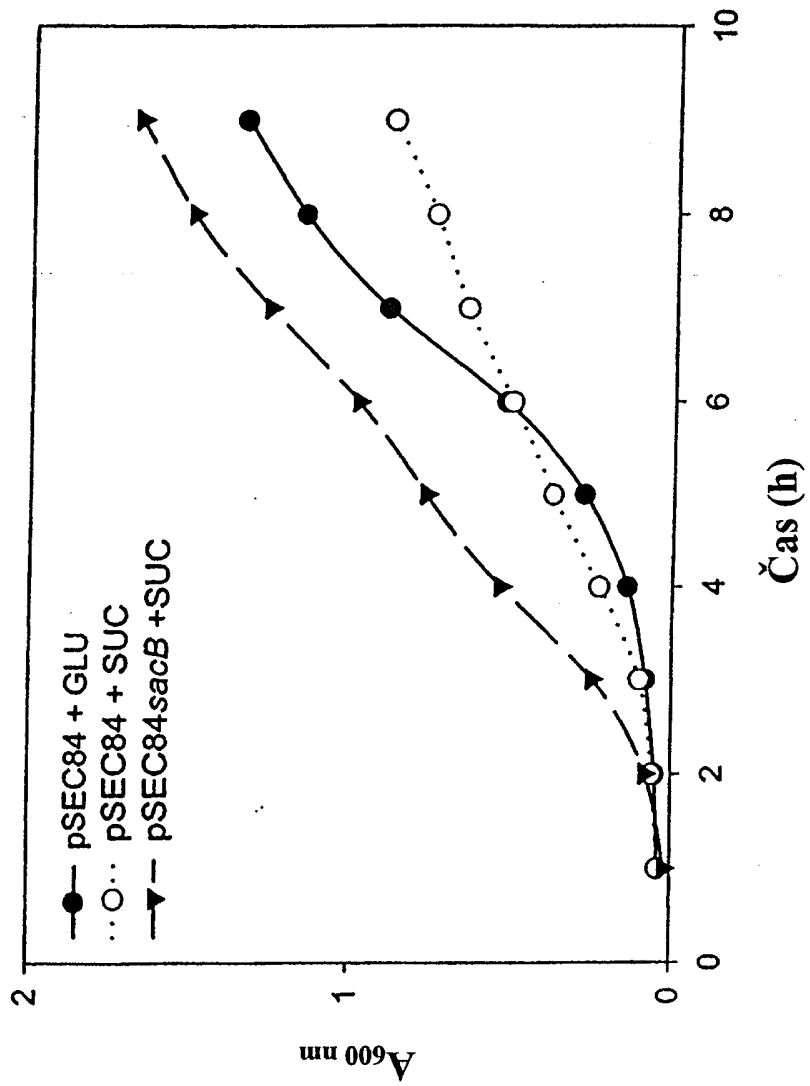
E.



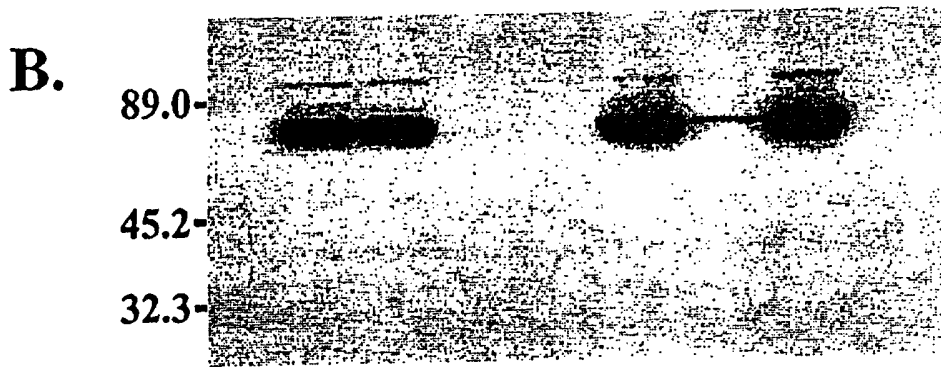
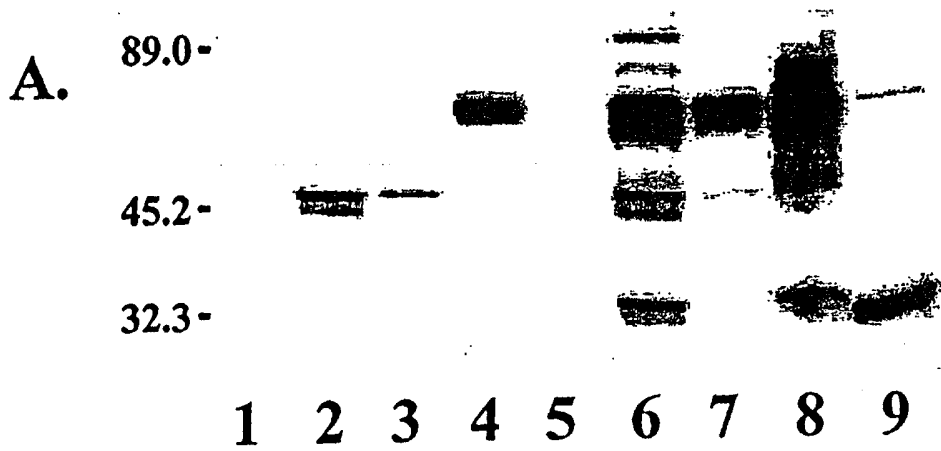
F.



Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4

27.05.03

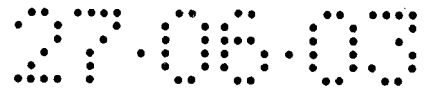
PV 2003-1378 YSP

SEKVENCE

- <110> Galen, James E.
- <120> ZPŮSOB EXPRESE GENU V BAKTERIÁLNÍ BUŇCE, ZPŮSOB VYVOLÁNÍ IMUNITNÍ ODEZVY U HOSTITELE A SYSTÉM PRO EXPRIMOVÁNÍ PROTEINU
- <130> F163431
- <140> PCT/US01/44185
- <141> 2001-11-23
- <150> US 60/252,516
- <151> 2000-11-22
- <150> US 09/993,292
- <151> 2001-11-23
- <160> 20
- <170> PatentIn version 3.2
- <210> 1
- <211> 6271
- <212> DNA
- <213> Umělá sekvence
- <220>
- <223> expresní plasmid pSEC84¹

<400> 1
gaattctgtg gtagcacaga ataatgaaaa gtgtgtaaag aagggtaaaa aaaaccgaat 60
gcgaggcatc cggttgaaat aggggtaaac agacattcag aatgaatga cggtataaaa 120
taaagttaat gatgatagcg ggagttattc tagttgcbag tgaaggtttt gttttgacat 180
tcagtgtgtg caaataactta agaataagtt attgatttta accttgaatt attattgctt 240
gatgttaggt gcttatttcg ccattccgca ataatcttaa aaagttccct tgcatttaca 300
ttttgaaaca tctatagcga taaatgaaac atcttaaaag ttttagtattc atattcgtgt 360
tggattattc tgcatttttg gggagaatgg acttgccgac tgattaatga gggttaatca 420
gtagtcagtg gcataaaaaa gcaaataaag gcatataaca gatcgatctt aaacatccac 480
aggaggatgg gatccaaaat aaggaggaaa aaaaaatgac tagtattttt gcagaacaaa 540
ctgtagaggt agttaaagc gcgatcgaac ccgcagatgg ggcattagat ctttataaca 600
aatacctcga ccaggtcac ccttgaaga cttttgatga aaccataaaa gagttaagcc 660
gttttaaaaca ggagtactcg caggaagctt ctgttttagt tggatgatatt aaagttttgc 720
ttatggacag ccaggacaag tttttgaag cgacacaaac tgtttatgaa tgggtgtggtg 780
tcgtgacgca attactctca gcgtatattt tactatttga tgaatataat gagaaaaaag 840
catcagccca gaaagacatt ctcatagga tattagatga tgggtgtcaag aaactgaatg 900

aagcgcaaaa atctctcctg acaagttcac aaagtttcaa caacgcttcc ggaaaactgc 960
tggcattaga tagccagtta actaatgatt tttcggaaaa aagtagttat ttccagtcac 1020
aggtggatag aattcgtaag gaagcttatg ccggtgctgc agccggcata gtcgccggtc 1080
cgtttgatt aattatttcc tattctattg ctgcgggctg gattgaaggg aaattgattc 1140
cagaattgaa taacaggcta aaaacagtgc aaaatttctt tactagctta tcagctacag 1200
tgaacaagc gaataaagat atcgatgcgg caaaattgaa attagccact gaaatagcag 1260
caattgggga gataaaaacg gaaaccgaaa caaccagatt ctacgttgat tatgatgatt 1320
taatgcttcc tttattaaaa ggagctgcaa agaaaatgat taacacctgt aatgaatacc 1380
aacaacgtca tggtaagaag acgcttttcg aggttctctga cgtcgctagc tgataaccta 1440
gggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgctg ctggcgtttt tccataggct 1500
ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac 1560
aggactataa agataccagg cgtttccccc tggagctcc ctcgtgcgct ctctgttcc 1620
gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc tttctccct tcgggaagcg tggcgctttc 1680
tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg 1740
tgtgcaagaa cccccgctc agcccgaccg ctgcgcctta tccgtaact atcgtcttga 1800
gtccaaccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag 1860
cagagcgagg tatgtaggag gtgctacaga gttcttgaag tggtaggcta actacggcta 1920
cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag 1980
agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac caccgctggt agcgggtggt tttttgttg 2040
caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac 2100
ggggtctgac gctcagtaga tctaaaacac taggccaag agttttaga aacgcaaaaa 2160
ggccatccg caggatggcc ttctgcttaa tttgatgcct ggcagtttat ggcgggcgctc 2220
ctgcccgcca cctcggggc cgttgcttcg caacgttcaa atccgctccc ggcggatttg 2280
tcctactcag gagagcgttc accgacaaac aacagataaa acgaaaggcc cagtctttcg 2340
actgagcctt tcgttttatt tgatgcctgg cagttcccta ctctcgcag gggagacccc 2400
acactacat cggcgctacg gcgtttcact tctgagttcg gcatggggtc aggtgggacc 2460
accgcgctac tgccgccagc caaattctgt tttatcagac cgcttctgcg ttctgattta 2520
atctgtatca ggctgaaaat cttctctcat ccgcaaaaac agccaagctg gatctggcaa 2580
atcgctgaat attccttttg tctccgacca tcaggcacct gagtcgctgt cttttctgtg 2640
acattcagtt cgctgcgctc acggctctgg cagtgaatgg gggtaaatgg cactacaggc 2700



gccttttatg gattcatgca aggaaactac ccataataca agaaaagccc gtcacgggct 2760
tctcagggcg ttttatggcg ggtctgctat gtgggtctat ctgacttttt gctgttcagc 2820
agttcctgcc ctctgatttt ccagtctgac cacttcggat tatcccgtga caggtcattc 2880
agactggcta atgcaccag taaggcagcg gtatcatcaa caggcttacc cgtcttactg 2940
tcaaccggat ctaaaacact agcccaacct ttcatagaag gcggcgggtg aatcgaaatc 3000
tcgtgatggc aggttggggc tcgcttggtc ggtcatttcg aaccccagag tcccgctcag 3060
aagaactcgt caagaaggcg atagaaggcg atgcgctgcg aatcgggagc ggcgataccg 3120
taaagcacga ggaagcggtc agcccattcg ccgccaagct cttcagcaat atcacgggta 3180
gccaacgcta tgtcctgata gcgggtccgcc acaccagcc gccacagtc gatgaatcca 3240
gaaaagcggc cattttccac catgatattc ggcaagcagg catcgccatg ggtcacgagc 3300
agatcctcgc cgtcggggcat gcgcgcttg agcctggcga acagttcggc tggcgcgagc 3360
ccctgatgct cttcgtccag atcatcctga tcgacaagac cggcttccat ccgagtacgt 3420
gctcgcctega tgcgatgttt cgcttggtgg tcgaatgggc aggtagccgg atcaagcgta 3480
tgcagccgcc gcattgcac agccatgatg gatactttct cggcaggagc aaggtgagat 3540
gacaggagat cctgccccgg cacttcgcc aatagcagcc agtcccctcc cgcttcagtg 3600
acaacgtcga gcacagctgc gcaaggaacg cccgtcgtgg ccagccacga tagccgcgct 3660
gcctcgtcct gcagttcatt cagggcaccg gacaggtcgg tcttgacaaa aagaaccggg 3720
cgcccctgcg ctgacagccg gaacacggcg gcatcagagc agccgattgt ctgttggtgcc 3780
cagtcatagc cgaatagcct ctccaccaa gcggccggag aacctgcgtg caatccatct 3840
tgttcaatca tgcgaaacga tctcctcct gtctcttgat cagatcttga tcccctgcgc 3900
catcagatcc ttggcggcaa gaaagccatc cagtttactt tgcagggctt cccaacctta 3960
ccagagggcg ccccagctgg caattccggt tcgctgctag acaacatcag caaggagaaa 4020
ggggctaccg gcgaaccagc agccccttta taaaggcgtc tcagtagtca gaccagcatc 4080
agtctgaaa aggcgggct gcgcccgcct ccaggttget acttaccgga ttcgtaagcc 4140
atgaaagccg ccacctcct gtgtccgtct ctgtaacgaa tctcgcacag cgattttcgt 4200
gtcagataag tgaatatcaa cagtgtgaga cacacgatca acacacacca gacaagggaa 4260
cttcgtggta gtttcatggc cttctctcc ttgcgcaaag cgcggtaaga ggctatcctg 4320
atgtggacta gacatagga tgcctcgtgg tggttaatga aaattaactt actacggggc 4380
tatcttcttt ctgccacaca acacggcaac aaaccacctt cacgtcatga ggcagaaagc 4440
ctcaagcgc gccgacatca tagcccatat acctgcaagc tgaccacact cactttcct 4500

gaaaataatc cgctcattca gaccgttcac gggaaatccg tgtgattggt gccgcatcac 4560
 gctgcctccc ggagtttgtc tcgagcactt ttgttaccgg ccaaacaaaa cccaaaaaca 4620
 acccataccc aaccaataa aacaccaaaa caagacaaat aatcattgat tgatggttga 4680
 aatggggtaa acttgacaaa caaacccact taaaacccaa aacataccca aacacacacc 4740
 aaaaaaacac cataaggagt ttataaatg ttggtattca ttgatgacgg ttcaacaaac 4800
 atcaaactac agtggcagga aagcgacgga acaattaaac agcacattag cccgaacagc 4860
 ttcaaacgcg agtgggcagt ctcttttggg gataaaaagg tctttaacta cacactgaac 4920
 ggcgaacagt attcatttga tccaatcagc ccggatgctg tagtcacaac caatatcgca 4980
 tggcaataca gcgacgttaa tgtcgttgca gtgcatcacg ccttactgac cagtggctctg 5040
 ccggtaagcg aagtggatat tgtttgcaca ctctctctga cagagtatta cgacagaaat 5100
 aaccaacca atacggaaaa tattgagcgt aagaaagcaa acttccggaa aaaaattaca 5160
 ttaaatggcg gggatacatt cacaataaaa gatgtaaaag tcatgcctga atctataccg 5220
 gcaggttatg aagttctaca agaactggat gagttagatt ctttattaat tatagatctc 5280
 gggggcacca cattagatat ttctcaggta atggggaaat tatcggggat cagtaaaata 5340
 tacggagact catctcttgg tgtctctctg gttacatctg cagtaaaaga tgccctttct 5400
 cttgcgagaa caaaaggaag tagctatctt gctgacgata taatcattca cagaaaagat 5460
 aataactatc tgaagcaacg aattaatgat gagaacaaaa tatcaatagt caccgaagca 5520
 atgaatgaag cacttcgtaa acttgagcaa cgtgtattaa atacgctcaa tgaattttct 5580
 ggttatactc atgttatggt tataggcggg ggcgcagaat taatatgcca tgcagtaaaa 5640
 aaacacacac agattcgtga tgaacgtttt ttcaaaacca ataactctca atatgattta 5700
 gttaacggta tgtatctcat aggtaattaa tgatggacaa ggcgagaacc attgccttca 5760
 aactaaatcc agatgtaa at caaacagata aaattgtttg tgatacactg gacagtatcc 5820
 cgcaagggga acgaagccgc cttaaccggg ccgcaactgac ggcaggtctg gccttataca 5880
 gacaagatcc ccggaccctt tcctttttat gtgagctgct gacgaaagaa accacatttt 5940
 cagatatcgt gaatatattg agatcgctat ttccaaaaga gatggccgat ttaattctt 6000
 caatagtcac tcaatcctct tcacaacaag agcaaaaaag tgatgaagag accaaaaaaa 6060
 atgcgatgaa gctaataaat taattcaatt attattgagt tccctttatc cactatcagg 6120
 ctggataaag ggaactcaat caagttattt tcttaccagt cattaataa tcgttattat 6180
 gaaataatcg tttgcaactgt ctctgttatt caggcaattt caataaaggc acttgctcac 6240
 gctctgtcat tttctgaaac tcttcatgct g 6271

27.05.03

<210> 2
<211> 305
<212> PRT
<213> Salmonella typhi

<400> 2

Met Thr Ser Ile Phe Ala Glu Gln Thr Val Glu Val Val Lys Ser Ala
1 5 10 15

Ile Glu Thr Ala Asp Gly Ala Leu Asp Leu Tyr Asn Lys Tyr Leu Asp
20 25 30

Gln Val Ile Pro Trp Lys Thr Phe Asp Glu Thr Ile Lys Glu Leu Ser
35 40 45

Arg Phe Lys Gln Glu Tyr Ser Gln Glu Ala Ser Val Leu Val Gly Asp
50 55 60

Ile Lys Val Leu Leu Met Asp Ser Gln Asp Lys Tyr Phe Glu Ala Thr
65 70 75 80

Gln Thr Val Tyr Glu Trp Cys Gly Val Val Thr Gln Leu Leu Ser Ala
85 90 95

Tyr Ile Leu Leu Phe Asp Glu Tyr Asn Glu Lys Lys Ala Ser Ala Gln
100 105 110

Lys Asp Ile Leu Ile Arg Ile Leu Asp Asp Gly Val Lys Lys Leu Asn
115 120 125

Glu Ala Gln Lys Ser Leu Leu Thr Ser Ser Gln Ser Phe Asn Asn Ala
130 135 140

Ser Gly Lys Leu Leu Ala Leu Asp Ser Gln Leu Thr Asn Asp Phe Ser
145 150 155 160

Glu Lys Ser Ser Tyr Phe Gln Ser Gln Val Asp Arg Ile Arg Lys Glu
165 170 175

Ala Tyr Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ile Val Ala Gly Pro Phe Gly Leu
180 185 190

Ile Ile Ser Tyr Ser Ile Ala Ala Gly Val Ile Glu Gly Lys Leu Ile
195 200 205

Pro Glu Leu Asn Asn Arg Leu Lys Thr Val Gln Asn Phe Phe Thr Ser
 210 215 220

Leu Ser Ala Thr Val Lys Gln Ala Asn Lys Asp Ile Asp Ala Ala Lys
 225 230 235 240

Leu Lys Leu Ala Thr Glu Ile Ala Ala Ile Gly Glu Ile Lys Thr Glu
 245 250 255

Thr Glu Thr Thr Arg Phe Tyr Val Asp Tyr Asp Asp Leu Met Leu Ser
 260 265 270

Leu Leu Lys Gly Ala Ala Lys Lys Met Ile Asn Thr Cys Asn Glu Tyr
 275 280 285

Gln Gln Arg His Gly Lys Lys Thr Leu Phe Glu Val Pro Asp Val Ala
 290 295 300

Ser
 305

<210> 3
 <211> 102
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Klonovací primer

<400> 3
 ggatccaaaa taaggaggaa aaaaaaatga ctagtatttt tgcagaacaa actgtagagg 60
 tagttaaag cgcgatcgaa accgcagatg gggcattaga tc 102

<210> 4
 <211> 101
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Klonovací primer

<400> 4
 ctaggttat cagctagcga cgtcaggaac ctcgaaaagc gtcttcttac catgacgttg 60
 ttggtattca ttacaggtgt taatcatttt ctttgcagct c 101

<210> 5
 <211> 97
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>

<223> Klonovací primer

<400> 5

cacggtaaga agacgctttt cgaggttcct gacgtcgcta gctgataacc taggtcatgt 60

tagacagctt atcatcgata agctttaatg cggtagt 97

<210> 6

<211> 69

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Klonovací primer

<400> 6

agatctacta gtgtcgacgc tagctatcag gtcgaggtgg cccggctcca tgcaccgca 60

cgcaacgcg 69

<210> 7

<211> 60

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Klonovací primer

<400> 7

actagtcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggtgacga 60

<210> 8

<211> 101

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Klonovací primer

<400> 8

cattaaaggt tatcgatgat aagctgtcaa acatgagcta gcttaggtca ttaccaatgc 60

ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc g 101

<210> 9

<211> 101

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Klonovací primer

<400> 9

cgaaatagac agatcgctga gataggtgcc tcaactgatta agcattggta atgacctagg 60

ctagctcatg tttgacagct tatcatcgat aacctttaat g

101

<210> 10
 <211> 71
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>

<223> Klonovací primer

<400> 10

gcgactagt aaagaaacga accaaaagcc atataaggaa acatacggca tttcccatat 60

tacagccat g 71

<210> 11
 <211> 103
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>

<223> Klonovací primer

<400> 11

taaactaccg cattaagct tatcgatgat aagctgtcaa acatgacccg ggtcactatt 60

tgттаactgt taattgtcct tgttcaagga tgctgtcttt gac 103

<210> 12
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>

<223> Klonovací primer

<400> 12

tcatgtttga cagcttatca tcgataagct ttaatgagggt agttta 46

<210> 13
 <211> 80
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>

<223> Klonovací primer

<400> 13

gcgcatct taatcatcca caggaggcgc tagcatgagt aaaggagaag aacttttcac 60

tggagttgtc ccaattcttg 80

<210> 14
 <211> 110

<212> DNA
 <213> Umělá sekvence

 <220>
 <223> Klonovací primer

 <400> 14
 gtgataaact accgcattaa agcttatcga tgataagctg tcaaacaatga gcgctctaga 60

 actagttcat tatttgtaga gctcatccat gccatgtgta atcccagcag 110

 <210> 15
 <211> 94
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

 <220>
 <223> Klonovací primer

 <400> 15
 gcgcactagt aaaaaccttg attggtgggt cgacaacgaa gaagacatcg atggtatcct 60

 gaaaaagtct accattctga acttgacat caac 94

 <210> 16
 <211> 97
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

 <220>
 <223> Klonovací primer

 <400> 16
 aactaccgca ttaaagctta tcgatgataa gctgtcaaac atgagctagc ctaggtcatt 60

 agtcgttgggt ccaaccttca tcggtcggaa cgaagta 97

 <210> 17
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

 <220>
 <223> Klonovací primer

 <400> 17
 cgatgcggca aaattgaaat tagccactga 30

 <210> 18
 <211> 8908
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

 <220>
 <223> vektor pSEC84sacB

<400> 18
gaattctgtg gtagcacaga ataatgaaaa gtgtgtaaag aagggtaaaa aaaaccgaat 60
gcgaggcatc cggttgaaat aggggtaaac agacattcag aatgaatga cggtaataaa 120
taaagttaat gatgatagcg ggagttattc tagttgcgag tgaaggtttt gttttgacat 180
tcagtgtgtt caaataactta agaataagtt attgatttta accttgaatt attattgctt 240
gatgttaggt gcttatttcg ccattccgca ataatcttaa aaagttccct tgcatttaca 300
ttttgaaaca tctatagcga taaatgaaac atcttaaaag ttttagtatt atattcgtgt 360
tggattattc tgcatttttg gggagaatgg acttgccgac tgattaatga gggttaatca 420
gtagtcagtg gcataaaaaa gcaaataaag gcatataaca gatcgatctt aaacatccac 480
aggaggatgg gatccaaaat aaggaggaaa aaaaaatgac tagtattttt gcagaacaaa 540
ctgtagaggt agttaaagc gcgatcgaac ccgcagatgg ggcattagat ctttataaca 600
aatacctcga ccaggtcac ccctggaaga ctttgatga aaccataaaa gagttaagcc 660
gttttaaaaca ggagtactcg caggaagctt ctgttttagt tggatgatatt aaagttttgc 720
ttatggacag ccaggacaag tttttgaag cgacacaaac tgtttatgaa tgggtgtggtg 780
tcgtgacgca attactctca gcgtatattt tactatttga tgaatataat gagaaaaaag 840
catcagccca gaaagacatt ctcatagga tattagatga tgggtcaag aaactgaatg 900
aagcgcaaaa atctctctg acaagttcac aaagtttcaa caacgcttcc ggaaaactgc 960
tggcattaga tagccagtta actaatgatt tttcggaaaa aagtagttat ttccagtcac 1020
aggtggatag aattcgtgaa gaagcttatg ccggtgctgc agccggcata gtcgccggtc 1080
cgtttgatt aattatttcc tattctattg ctgcccggct gattgaaggg aaattgattc 1140
cagaattgaa taacaggcta aaaacagtgc aaaatttctt tactagctta tcagctacag 1200
tgaaacaagc gaataaagat atcgatgagg caaaattgaa attagccact gaaatagcag 1260
caattgggga gataaaaacg gaaaccgaaa caaccagatt ctacgttgat tatgatgatt 1320
taatgctttc tttattaaaa ggagctgcaa agaaaatgat taacacctgt aatgaatacc 1380
aacaacgtca tggtaagaag acgcttttcg aggttcctga cgtcgctagt aaagaaacga 1440
accaaaagcc atataaggaa acatacggca tttcccatat tacacgcat gatatgctgc 1500
aatccctga acagcaaaaa aatgaaaaat atcaagttcc tgaattcgat tcgtccacaa 1560
ttaaaaatat ctcttctgca aaaggcctgg acgtttgga cagctggcca ttacaaaacg 1620
ctgacggcac tgtcgcaaac tatcacggt accacatcgt ctttgatta gccggagatc 1680
ctaaaaatgc ggatgacaca tcgatttaca tgttctatca aaaagtcggc gaaacttcta 1740
ttgacagctg gaaaaacgct ggccgctct ttaaagacag cgacaaattc gatgcaaatg 1800

attctatcct aaaagaccaa acacaagaat ggtcaggttc agccacattt acatctgacg 1860
 gaaaaatccg tttattctac actgatttct ccggtaaaca ttacggcaaa caaacactga 1920
 caactgcaca agttaacgta tcagcatcag acagctcttt gaacatcaac ggtgtagagg 1980
 attataaatc aatctttgac ggtgacggaa aaacgtatca aatgtacag cagttcatcg 2040
 atgaaggcaa ctacagctca ggcgacaacc atacgctgag agatcctcac tacgtagaag 2100
 ataaaggcca caaataactta gtatttgaag caaacactgg aactgaagat ggctaccaag 2160
 gcgaagaatc tttatttaac aaagcatact atggcaaaag cacatcattc ttccgtcaag 2220
 aaagtcaaaa acttctgcaa agcgataaaa aacgcacggc tgagttagca aacggcgctc 2280
 tcggtatgat tgagctaaac gatgattaca cactgaaaaa agtgatgaaa ccgctgattg 2340
 catctaacac agtaacagat gaaattgaac gcgcgaacgt ctttaaaatg aacggcaaat 2400
 ggtacctggt cactgactcc cgcggatcaa aatgacgat tgacggcatt acgtctaacg 2460
 atatttacat gcttggttat gtttctaatt ctttaactgg cccatacaag ccgctgaaca 2520
 aaactggcct tgtgttaaaa atggatcttg atcctaacga tgtaaccttt acttactcac 2580
 acttcgctgt acctcaagcg aaaggaaaca atgtcgtgat tacaagctat atgacaaaca 2640
 gaggattcta cgcagacaaa caatcaacgt ttgcgccaag cttcctgctg aacatcaaag 2700
 gcaagaaaac atctgttgtc aaagacagca tccttgaaca aggacaatta acagttaaca 2760
 aatagtgacc cgggtcatgt ttgacagctt atcatcgata agctttaatg cggtagttta 2820
 tcacagttaa attgctaacg cagtcaggca ccgtgatga aatctaacaa tgcgctcacc 2880
 gtcatcctcg gcaccgtcac cctggatgct gtaggcatag gcttggttat gccggctactg 2940
 ccgggcctct tgcgggatat cgtccattcc gacagcatcg ccagtcacta tggcgtgctg 3000
 ctagecctat atgcgttgat gcaatttcta tgcgcaccgg ttctcggagc actgtccgac 3060
 cgctttggcc gccgcccagt cctgctcgct tcgctacttg gagccactat cgactacgcg 3120
 atcatggcga ccacaccctg cctgtggatc ctctacgccg gacgcatcgt ggccggcacc 3180
 accggcgcca caggtgcggt tgctggcgcc tatatcgccg acatcaccga tggggaagat 3240
 cgggctcgcc acttcgggct catgagcgt tgtttcggcg tgggtatggt ggcaggcccc 3300
 gtggccgggg gactgttggg cgccatctcc ttgcatgcac cattccttgc ggcggcggtg 3360
 ctcaacggcc tcaacctact actgggctgc ttctaatgc aggagtcgca taagggagag 3420
 cgtcgaccga tgcccttgag agccttcaac ccagtcagct ccttccggtg ggcgccccgc 3480
 atgactatcg tcgcccact tatgactgtc ttctttatca tgcaactcgt aggacaggtg 3540
 ccggcagcgc tctgggtcat tttcggcgag gaccgcttcc gctggagcgc gacgatgatc 3600

ggctgtcgc ttgcggtatt cggaatcttg cacgccctcg ctcaagcctt cgtcactggt 3660
 cccgccacca aacgtttcgg cgagaagcag gccattatcg ccggcatggc ggccgacgcy 3720
 ctgggctacg tcttgetggc gttcgcgacg cgaggctgga tggccttccc cattatgatt 3780
 cttctcgett ccggcggcat cgggatgccc gcgttgcagg ccatgctgtc caggcaggta 3840
 gatgacgacc atcagggaca gcttcaagga tcgctcgcgg ctcttaccag cctaacttcg 3900
 atcactggac cgctgatcgt cacggcgatt tatgccgcct cggcgagcac atggaacggg 3960
 ttggcatgga ttgtaggcgc cgccctatac cttgtctgcc tccccgcgtt gcgtcgcggt 4020
 gcatggagcc gggccacctc gacctgatag ctagcgtcga cactagctga taacctaggg 4080
 ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg 4140
 cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg 4200
 actataaaga taccaggcgt tccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac 4260
 cctgccgctt accggatacc tgtcgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgcttttctca 4320
 tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg ttaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt 4380
 gcacgaacct cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc 4440
 caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag 4500
 agcgaggtat gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac 4560
 tagaaggaca gtatttgga tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt 4620
 tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa 4680
 gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg 4740
 gtctgacgct cagtagatct aaaacactag gcccaagagt ttgtagaac gcaaaaaggc 4800
 catccgtcag gatggccttc tgettaattt gatgcctggc agtttatggc gggcgtcctg 4860
 cccgccacct tccgggcegt tgcttcgcaa cgttcaaadc cgctcccggc ggatttgtec 4920
 tactcaggag agcgttcacc gacaaacaac agataaaaag aaaggcccag tctttcgact 4980
 gagcctttcg ttttatttga tgctggcag ttcctactc tcgcatgggg agaccccaca 5040
 ctaccatcgg cgctacggcg tttcacttct gagttcggca tggggtcagg tgggaccacc 5100
 gcgctactgc cgccaggcaa attctgtttt atcagaccgc ttctgcgttc tgatttaate 5160
 tgtatcagge tgaaaatctt ctctcatccg ccaaaacagc caagctggat ctggcaaatc 5220
 gctgaatatt cttttgtct ccgaccatca ggcacctgag tcgctgtctt tttcgtgaca 5280
 ttcagttcgc tgcgctcag gctctggcag tgaatggggg taaatggcac tacaggcgcc 5340
 ttttatggat tcatgcaagg aaactacca taatacaaga aaagcccgtc acgggcttct 5400

cagggcgttt tatggcgggt ctgctatgtg gtgctatctg actttttgct gttcagcagt 5460
 tcttgcctc tgattttcca gtctgaccac ttcggattat cccgtgacag gtcattcaga 5520
 ctggctaattg caccagtaa ggcagcggta tcatcaacag gttaccctg cttactgtca 5580
 accggatcta aaacactagc ccaacctttc atagaaggcg gcggtggaat cgaaatctcg 5640
 tgatggcagg ttgggcgtcg cttggtcggt catttcgaac cccagagtcc cgctcagaag 5700
 aactcgtcaa gaaggcgata gaaggcgatg cgctgcgaat cgggagcggc gataccgtaa 5760
 agcacgagga agcggtcagc ccattcgccg ccaagctctt cagcaatatac acgggtagcc 5820
 aacgctatgt cctgatagcg gtccgccaca cccagccggc cacagtcgat gaatccagaa 5880
 aagcggccat tttccaccat gatattcggc aagcaggcat cgccatgggt cacgacgaga 5940
 tctcgcctg cgggcatgcg cgccttgagc ctggcgaaca gttcggctgg cgcgagcccc 6000
 tgatgctcct cgtccagatc atcctgatcg acaagaccgg cttccatccg agtacgtgct 6060
 cgctcgatgc gatgtttcgc ttggtggtcg aatgggcagg tagccggatc aagcgtatgc 6120
 agccgccgca ttgcatcagc catgatggat actttctcgg caggagcaag gtgagatgac 6180
 aggagatcct gccccggcac ttgcaccaat agcagccagt cccttcccgt ttcagtgaca 6240
 acgtcgagca cagctgcgca aggaacgccc gtcgtggcca gccacgatag ccgcgctgcc 6300
 tcgtcctgca gttcattcag ggcaccggac aggtcggctt tgacaaaaag aaccggggcg 6360
 ccctgcgctg acagccggaa cacggcggca tcagagcagc cgattgtctg ttgtgccag 6420
 tcatagccga atagcctctc cacccaagcg gccggagaac ctgctgcaa tccatcttgt 6480
 tcaatcatgc gaaacgatec tcatcctgtc tcttgatcag atcttgatcc cctgcgccat 6540
 cagatccttg gcggcaagaa agccatccag tttactttgc agggcttccc aacctacca 6600
 gagggcgccc cagctggcaa ttccggttcg ctgctagaca acatcagcaa ggagaaaggg 6660
 gctaccggcg aaccagcagc ccctttataa aggcgcttca gtagtcagac cagcatcagt 6720
 cctgaaaagg cgggcctgcg cccgcctcca ggttgctact taccggattc gtaagccatg 6780
 aaagccgcca cctccctgtg tccgtctctg taacgaatct cgcacagcga ttttcgtgtc 6840
 agataagtga atatcaacag tgtgagacac acgatcaaca cacaccagac aagggaaactt 6900
 cgtggtagtt tcatggcctt cttctccttg cgcaaagcgc ggtaagaggc tatectgatg 6960
 tggactagac atagggatgc ctcgtgggtg ttaatgaaaa ttaacttact acggggctat 7020
 cttctttctg ccacacaaca cggcaacaaa ccaccttac gtcagtaggc agaaagcctc 7080
 aagcggcggg cacatcatag cccatatacc tgcacgctga ccacactcac tttccctgaa 7140
 aataatccgc tcatcagac cgttcacggg aaatccgtgt gattgttgcc gcatcagct 7200

gcctcccga gtttgtctcg agcacttttg ttaccgcgca aacaaaaccc aaaaacaacc 7260
 cataccaac ccaataaac accaaaaca gacaaataat cattgattga tggttgaaat 7320
 ggggtaaact tgacaaaca acccacttaa aaccctaac ataccctaac acacacaaa 7380
 aaaacacat aaggagtttt ataatgttg gtattcattg atgacggttc acaaacatc 7440
 aaactacagt ggcaggaaag cgacggaaca attaacagc acattagccc gaacagcttc 7500
 aaacgcgagt gggcagtctc ttttggtgat aaaaggctt ttaactacac actgaacggc 7560
 gaacagtatt catttgatcc aatcagccc gatgctgtag tcacaacca tatcgcattg 7620
 caatacagc agttaatgt cgttgacgtg catcacgct tactgaccag tggctctccg 7680
 gtaagcgaag tggatattgt ttgcacactt cctctgacag agtattacga cagaaataac 7740
 caaccaata cggaaaatat tgagcgtagg aaagcaaac tccggaaaa aattacatta 7800
 aatggcgggg atacattcac aataaaagat gtaaaagtca tgcctgaatc tataccggca 7860
 ggttatgaag ttctacaaga actggatgag ttagattctt tattaattat agatctcggg 7920
 ggcaccacat tagatatttc tcaggtaatg gggaaattat cggggatcag taaaatatac 7980
 ggagactcat ctcttgggtg ctctctggtt acatctgcag taaaagatgc cctttctctt 8040
 gcgagaaca aaggaagtag ctatcttctg gacgatataa tcattcacag aaaagataat 8100
 aactatctga agcaacgaat taatgatgag acaaaaatat caatagtcac cgaagcaatg 8160
 aatgaagcac ttcgtaaact tgagcaacgt gtattaaata cgctcaatgg attttctggt 8220
 tatactcatg ttatggttat aggcggtggc gcagaattaa tatgcatgac agtaaaaaaa 8280
 cacacacaga ttcgtgatga acgttttttc aaaaccaata actctcaata tgatttagtt 8340
 aacggtatgt atctcatagg taattaatga tggacaagcg cagaaccatt gccttcaaac 8400
 taaatccaga tgtaaataca acagataaaa ttgtttgtga tacactggac agtatcccgc 8460
 aaggggaacg aagccgcctt aaccggggcc cactgacggc aggtctggcc ttatacagac 8520
 aagatccccg gaccctttc cttttatgtg agctgctgac gaaagaaacc acattttcag 8580
 atatcgtgaa tatattgaga tcgctatttc caaaagagat ggccgatttt aattcttcaa 8640
 tagtcaactc atctcttca caacaagagc aaaaaagtga tgaagagacc aaaaaaatg 8700
 cgatgaagct aataaattaa ttcaattatt attgagttcc ctttatccac tatcaggctg 8760
 gataaagga actcaatcaa gttattttct taccagtcac tacataatcg ttattatgaa 8820
 ataatcgttt gcactgtctc tgttattcag gcaatttcaa taaaggcact tgctcagct 8880
 ctgtcatttt ctgaaactct tcatgctg 8908

<210> 19
 <211> 2253
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> fúzní gen ClyA::SacB

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(2253)

<400> 19
 atg act agt att ttt gca gaa caa act gta gag gta gtt aaa agc gcg 48
 Met Thr Ser Ile Phe Ala Glu Gln Thr Val Glu Val Val Lys Ser Ala
 1 5 10 15

atc gaa acc gca gat ggg gca tta gat ctt tat aac aaa tac ctc gac 96
 Ile Glu Thr Ala Asp Gly Ala Leu Asp Leu Tyr Asn Lys Tyr Leu Asp
 20 25 30

cag gtc atc ccc tgg aag acc ttt gat gaa acc ata aaa gag tta agc 144
 Gln Val Ile Pro Trp Lys Thr Phe Asp Glu Thr Ile Lys Glu Leu Ser
 35 40 45

cgt ttt aaa cag gag tac tcg cag gaa gct tct gtt tta gtt ggt gat 192
 Arg Phe Lys Gln Glu Tyr Ser Gln Glu Ala Ser Val Leu Val Gly Asp
 50 55 60

att aaa gtt ttg ctt atg gac agc cag gac aag tat ttt gaa gcg aca 240
 Ile Lys Val Leu Leu Met Asp Ser Gln Asp Lys Tyr Phe Glu Ala Thr
 65 70 75 80

caa act gtt tat gaa tgg tgt ggt gtc gtg acg caa tta ctc tca gcg 288
 Gln Thr Val Tyr Glu Trp Cys Gly Val Val Thr Gln Leu Leu Ser Ala
 85 90 95

tat att tta cta ttt gat gaa tat aat gag aaa aaa gca tca gcc cag 336
 Tyr Ile Leu Leu Phe Asp Glu Tyr Asn Glu Lys Lys Ala Ser Ala Gln
 100 105 110

aaa gac att ctc att agg ata tta gat gat ggt gtc aag aaa ctg aat 384
 Lys Asp Ile Leu Ile Arg Ile Leu Asp Asp Gly Val Lys Lys Leu Asn
 115 120 125

gaa gcg caa aaa tct ctc ctg aca agt tca caa agt ttc aac aac gct 432
 Glu Ala Gln Lys Ser Leu Leu Thr Ser Ser Gln Ser Phe Asn Asn Ala
 130 135 140

tcc gga aaa ctg ctg gca tta gat agc cag tta act aat gat ttt tcg 480
 Ser Gly Lys Leu Leu Ala Leu Asp Ser Gln Leu Thr Asn Asp Phe Ser
 145 150 155 160

gaa aaa agt agt tat ttc cag tca cag gtg gat aga att cgt aag gaa 528
 Glu Lys Ser Ser Tyr Phe Gln Ser Gln Val Asp Arg Ile Arg Lys Glu
 165 170 175

gct tat gcc ggt gct gca gcc ggc ata gtc gcc ggt ccg ttt gga tta 576
 Ala Tyr Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ile Val Ala Gly Pro Phe Gly Leu

	180		185		190		
att att tcc tat tct att gct gcg ggc gtg att gaa ggg aaa ttg att						624	
Ile Ile Ser Tyr Ser Ile Ala Ala Gly Val Ile Glu Gly Lys Leu Ile							
	195		200		205		
cca gaa ttg aat aac agg cta aaa aca gtg caa aat ttc ttt act agc						672	
Pro Glu Leu Asn Asn Arg Leu Lys Thr Val Gln Asn Phe Phe Thr Ser							
	210		215		220		
tta tca gct aca gtg aaa caa gcg aat aaa gat atc gat gcg gca aaa						720	
Leu Ser Ala Thr Val Lys Gln Ala Asn Lys Asp Ile Asp Ala Ala Lys							
	225		230		235		240
ttg aaa tta gcc act gaa ata gca gca att ggg gag ata aaa acg gaa						768	
Leu Lys Leu Ala Thr Glu Ile Ala Ala Ile Gly Glu Ile Lys Thr Glu							
		245		250		255	
acc gaa aca acc aga ttc tac gtt gat tat gat gat tta atg ctt tct						816	
Thr Glu Thr Thr Arg Phe Tyr Val Asp Tyr Asp Asp Leu Met Leu Ser							
		260		265		270	
tta tta aaa gga gct gca aag aaa atg att aac acc tgt aat gaa tac						864	
Leu Leu Lys Gly Ala Ala Lys Lys Met Ile Asn Thr Cys Asn Glu Tyr							
	275		280		285		
caa caa cgt cat ggt aag aag acg ctt ttc gag gtt cct gac gtc gct						912	
Gln Gln Arg His Gly Lys Lys Thr Leu Phe Glu Val Pro Asp Val Ala							
	290		295		300		
agt aaa gaa acg aac caa aag cca tat aag gaa aca tac ggc att tcc						960	
Ser Lys Glu Thr Asn Gln Lys Pro Tyr Lys Glu Thr Tyr Gly Ile Ser							
	305		310		315	320	
cat att aca cgc cat gat atg ctg caa atc cct gaa cag caa aaa aat						1008	
His Ile Thr Arg His Asp Met Leu Gln Ile Pro Glu Gln Gln Lys Asn							
		325		330		335	
gaa aaa tat caa gtt cct gaa ttc gat tcg tcc aca att aaa aat atc						1056	
Glu Lys Tyr Gln Val Pro Glu Phe Asp Ser Ser Thr Ile Lys Asn Ile							
		340		345		350	
tct tct gca aaa ggc ctg gac gtt tgg gac agc tgg cca tta caa aac						1104	
Ser Ser Ala Lys Gly Leu Asp Val Trp Asp Ser Trp Pro Leu Gln Asn							
	355		360		365		
gct gac ggc act gtc gca aac tat cac ggc tac cac atc gtc ttt gca						1152	
Ala Asp Gly Thr Val Ala Asn Tyr His Gly Tyr His Ile Val Phe Ala							
	370		375		380		
tta gcc gga gat cct aaa aat gcg gat gac aca tcg att tac atg ttc						1200	
Leu Ala Gly Asp Pro Lys Asn Ala Asp Asp Thr Ser Ile Tyr Met Phe							
	385		390		395	400	
tat caa aaa gtc ggc gaa act tct att gac agc tgg aaa aac gct ggc						1248	
Tyr Gln Lys Val Gly Glu Thr Ser Ile Asp Ser Trp Lys Asn Ala Gly							
		405		410		415	
cgc gtc ttt aaa gac agc gac aaa ttc gat gca aat gat tct atc cta						1296	
Arg Val Phe Lys Asp Ser Asp Lys Phe Asp Ala Asn Asp Ser Ile Leu							

420	425	430	
aaa gac caa aca caa gaa tgg tca ggt tca gcc aca ttt aca tct gac Lys Asp Gln Thr Gln Glu Trp Ser Gly Ser Ala Thr Phe Thr Ser Asp 435 440 445			1344
gga aaa atc cgt tta ttc tac act gat ttc tcc ggt aaa cat tac ggc Gly Lys Ile Arg Leu Phe Tyr Thr Asp Phe Ser Gly Lys His Tyr Gly 450 455 460			1392
aaa caa aca ctg aca act gca caa gtt aac gta tca gca tca gac agc Lys Gln Thr Leu Thr Thr Ala Gln Val Asn Val Ser Ala Ser Asp Ser 465 470 475 480			1440
tct ttg aac atc aac ggt gta gag gat tat aaa tca atc ttt gac ggt Ser Leu Asn Ile Asn Gly Val Glu Asp Tyr Lys Ser Ile Phe Asp Gly 485 490 495			1488
gac gga aaa acg tat caa aat gta cag cag ttc atc gat gaa ggc aac Asp Gly Lys Thr Tyr Gln Asn Val Gln Gln Phe Ile Asp Glu Gly Asn 500 505 510			1536
tac agc tca ggc gac aac cat acg ctg aga gat cct cac tac gta gaa Tyr Ser Ser Gly Asp Asn His Thr Leu Arg Asp Pro His Tyr Val Glu 515 520 525			1584
gat aaa ggc cac aaa tac tta gta ttt gaa gca aac act gga act gaa Asp Lys Gly His Lys Tyr Leu Val Phe Glu Ala Asn Thr Gly Thr Glu 530 535 540			1632
gat ggc tac caa ggc gaa gaa tct tta ttt aac aaa gca tac tat ggc Asp Gly Tyr Gln Gly Glu Glu Ser Leu Phe Asn Lys Ala Tyr Tyr Gly 545 550 555 560			1680
aaa agc aca tca ttc ttc cgt caa gaa agt caa aaa ctt ctg caa agc Lys Ser Thr Ser Phe Phe Arg Gln Glu Ser Gln Lys Leu Leu Gln Ser 565 570 575			1728
gat aaa aaa cgc acg gct gag tta gca aac ggc gct ctc ggt atg att Asp Lys Lys Arg Thr Ala Glu Leu Ala Asn Gly Ala Leu Gly Met Ile 580 585 590			1776
gag cta aac gat gat tac aca ctg aaa aaa gtg atg aaa ccg ctg att Glu Leu Asn Asp Asp Tyr Thr Leu Lys Lys Val Met Lys Pro Leu Ile 595 600 605			1824
gca tct aac aca gta aca gat gaa att gaa cgc gcg aac gtc ttt aaa Ala Ser Asn Thr Val Thr Asp Glu Ile Glu Arg Ala Asn Val Phe Lys 610 615 620			1872
atg aac ggc aaa tgg tac ctg ttc act gac tcc cgc gga tca aaa atg Met Asn Gly Lys Trp Tyr Leu Phe Thr Asp Ser Arg Gly Ser Lys Met 625 630 635 640			1920
acg att gac ggc att acg tct aac gat att tac atg ctt ggt tat gtt Thr Ile Asp Gly Ile Thr Ser Asn Asp Ile Tyr Met Leu Gly Tyr Val 645 650 655			1968
tct aat tct tta act ggc cca tac aag ccg ctg aac aaa act ggc ctt Ser Asn Ser Leu Thr Gly Pro Tyr Lys Pro Leu Asn Lys Thr Gly Leu 660 665 670			2016

Lys Asp Ile Leu Ile Arg Ile Leu Asp Asp Gly Val Lys Lys Leu Asn
 115 120 125

Glu Ala Gln Lys Ser Leu Leu Thr Ser Ser Gln Ser Phe Asn Asn Ala
 130 135 140

Ser Gly Lys Leu Leu Ala Leu Asp Ser Gln Leu Thr Asn Asp Phe Ser
 145 150 155 160

Glu Lys Ser Ser Tyr Phe Gln Ser Gln Val Asp Arg Ile Arg Lys Glu
 165 170 175

Ala Tyr Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ile Val Ala Gly Pro Phe Gly Leu
 180 185 190

Ile Ile Ser Tyr Ser Ile Ala Ala Gly Val Ile Glu Gly Lys Leu Ile
 195 200 205

Pro Glu Leu Asn Asn Arg Leu Lys Thr Val Gln Asn Phe Phe Thr Ser
 210 215 220

Leu Ser Ala Thr Val Lys Gln Ala Asn Lys Asp Ile Asp Ala Ala Lys
 225 230 235 240

Leu Lys Leu Ala Thr Glu Ile Ala Ala Ile Gly Glu Ile Lys Thr Glu
 245 250 255

Thr Glu Thr Thr Arg Phe Tyr Val Asp Tyr Asp Asp Leu Met Leu Ser
 260 265 270

Leu Leu Lys Gly Ala Ala Lys Lys Met Ile Asn Thr Cys Asn Glu Tyr
 275 280 285

Gln Gln Arg His Gly Lys Lys Thr Leu Phe Glu Val Pro Asp Val Ala
 290 295 300

Ser Lys Glu Thr Asn Gln Lys Pro Tyr Lys Glu Thr Tyr Gly Ile Ser
 305 310 315 320

His Ile Thr Arg His Asp Met Leu Gln Ile Pro Glu Gln Gln Lys Asn
 325 330 335

Glu Lys Tyr Gln Val Pro Glu Phe Asp Ser Ser Thr Ile Lys Asn Ile
 340 345 350

Ser Ser Ala Lys Gly Leu Asp Val Trp Asp Ser Trp Pro Leu Gln Asn
 355 360 365

Ala Asp Gly Thr Val Ala Asn Tyr His Gly Tyr His Ile Val Phe Ala
 370 375 380

Leu Ala Gly Asp Pro Lys Asn Ala Asp Asp Thr Ser Ile Tyr Met Phe
 385 390 395 400

Tyr Gln Lys Val Gly Glu Thr Ser Ile Asp Ser Trp Lys Asn Ala Gly
 405 410 415

Arg Val Phe Lys Asp Ser Asp Lys Phe Asp Ala Asn Asp Ser Ile Leu
 420 425 430

Lys Asp Gln Thr Gln Glu Trp Ser Gly Ser Ala Thr Phe Thr Ser Asp
 435 440 445

Gly Lys Ile Arg Leu Phe Tyr Thr Asp Phe Ser Gly Lys His Tyr Gly
 450 455 460

Lys Gln Thr Leu Thr Thr Ala Gln Val Asn Val Ser Ala Ser Asp Ser
 465 470 475 480

Ser Leu Asn Ile Asn Gly Val Glu Asp Tyr Lys Ser Ile Phe Asp Gly
 485 490 495

Asp Gly Lys Thr Tyr Gln Asn Val Gln Gln Phe Ile Asp Glu Gly Asn
 500 505 510

Tyr Ser Ser Gly Asp Asn His Thr Leu Arg Asp Pro His Tyr Val Glu
 515 520 525

Asp Lys Gly His Lys Tyr Leu Val Phe Glu Ala Asn Thr Gly Thr Glu
 530 535 540

Asp Gly Tyr Gln Gly Glu Glu Ser Leu Phe Asn Lys Ala Tyr Tyr Gly
 545 550 555 560

Lys Ser Thr Ser Phe Phe Arg Gln Glu Ser Gln Lys Leu Leu Gln Ser
 565 570 575

Asp Lys Lys Arg Thr Ala Glu Leu Ala Asn Gly Ala Leu Gly Met Ile
 580 585 590

Glu Leu Asn Asp Asp Tyr Thr Leu Lys Lys Val Met Lys Pro Leu Ile
 595 600 605

Ala Ser Asn Thr Val Thr Asp Glu Ile Glu Arg Ala Asn Val Phe Lys
 610 615 620

Met Asn Gly Lys Trp Tyr Leu Phe Thr Asp Ser Arg Gly Ser Lys Met
 625 630 635 640

Thr Ile Asp Gly Ile Thr Ser Asn Asp Ile Tyr Met Leu Gly Tyr Val
 645 650 655

Ser Asn Ser Leu Thr Gly Pro Tyr Lys Pro Leu Asn Lys Thr Gly Leu
 660 665 670

Val Leu Lys Met Asp Leu Asp Pro Asn Asp Val Thr Phe Thr Tyr Ser
 675 680 685

His Phe Ala Val Pro Gln Ala Lys Gly Asn Asn Val Val Ile Thr Ser
 690 695 700

Tyr Met Thr Asn Arg Gly Phe Tyr Ala Asp Lys Gln Ser Thr Phe Ala
 705 710 715 720

Pro Ser Phe Leu Leu Asn Ile Lys Gly Lys Lys Thr Ser Val Val Lys
 725 730 735

Asp Ser Ile Leu Glu Gln Gly Gln Leu Thr Val Asn Lys
 740 745