



F 1000104428B



SUOMI - FINLAND (FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(12) PATENTTIJULKAISU PATENTSKRIFT

(10) FI 104428 B

(45) Patenti myönnetty - Patent beviljats

31.01.2000

(51) Kv.lk.7 - Int.kl.7

C12N 15/15, 15/81, 1/19 ; C12P 21/02
// (C12P 21/02 ; C12R 1:645)

(21) Patentihakemus - Patentansökning

900991

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

27.02.1990

(24) Alkupäivä - Löpdag

26.08.1988

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

27.02.1990

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan

PCT/DK88/00138

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

28.08.1987 DK 4501/87

(73) Haltija - Innehavare

1 •Novo Nordisk A/S, , Novo Allé, 2880 Bagsvaerd, TANSKA, (DK)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Norris,Kjeld, , Ahlmanns Alle 34, 2900 Hellerup, TANSKA, (DK)

2 •Norris,Fanny, , Ahlmanns Alle 34, 2900 Hellerup, TANSKA, (DK)

3 •Bjoern,Soeren Erik, , Marie Grubbes Alle 47, 2800 Lyngby, TANSKA, (DK)

(74) Asiamies - Ombud: Berggren Oy Ab
Jaakonkatu 3 A, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä aprotiniinin ja aprotiniinihomologien tuottamiseksi hiivassa
Förfarande för producering av aprotinin och aprotininhomologer i jäst

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

FI C 89183 (C 12N 15/17),
J. Biol. Chem., vol. 261, p. 7115-18 (1986)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

On kehitetty menetelmä aprotiniinin tai tiettyjen aprotiniinihomologien tuottamiseksi hiivassa. Aprotiniinihomologit ovat edullisesti sellaisia, joilta puuttuu 1 tai 2 aminohappojäännöstä N-terminaalista päästä ja niillä on emäksinen aminohappojäännös asemassa 41 ja/tai 42 korvattu ei-emäksisellä aminohappojäännöksellä, esim. seriinijäännöksellä.

En metod för framställning av aprotinin eller vissa aprotininhomologer i jäst har utvecklats. Aprotininhomologerna är företrädesvis sådana som saknar en eller två aminosyrerester i N-terminaländan och har den basiska aminosyreresten i position 41 och/eller 42 ersatt av en icke-basisk aminosyrerest t.ex en serinrest.

Menetelmä aprotiniinin ja aprotiniinihomologien tuottamiseksi hiivassa

- 5 Tämä keksintö koskee menetelmää aprotiniinin ja sen homologien tuottamiseksi hiivassa, sellaisia tuotteita koodaavia synteettisiä geenejä, ekspressiovektoreita ja transformoituja hiivasoluja. Keksintö koskee myös uusia aprotiniinihomologeja.

- 10 Aprotiniini (naudan haiman trypsiini-inhibiittori, BPTI) on polypeptidi, jota useat naudan elimet ja kudokset erittävät, kuten imusolmukkeet, haima, keuhkot, korvasylkirauhanen, perna ja maksa. Se on yhdestä ketjusta koostuva polypeptidiketju, jossa on 58 aminohappojäännöstä sitoutunut ristiin kolmella disulfidisillalla, joilla on seuraava sekvenssi:

15 Arg-Pro-Asp-Phe-Cys-Leu-Glu-Pro-Pro-Tyr-Thr-Gly-Pro-Cys-Lys-Ala-Arg-Ile-Ile-
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19
 Arg-Tyr-Phe-Tyr-Asn-Ala-Lys-Ala-Gly-Leu-Cys-Gln-Thr-Phe-Val-Tyr-Gly-Gly-
 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37
 Cys-Arg-Ala-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Ser-Ala-Glu-Asp-Cys-Met-Arg-Thr-Cys-
 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55
 20 Gly-Gly-Ala
 56 57 58

- 25 Kolme disulfidisiltaa sijaitsevat Cys(5)-Cys(55), Cys(14)-Cys(38) ja Cys(30)-Cys(51) välissä, vastaavasti.

- 30 Aprotiniinia käytetään akuutin haimatulehduksen, erilaisten shokki-oiretilojen, hyperfibrinolyyttisen verenvuodon ja sydäninfarktin käsittelyyn. Kun aprotiniinia annetaan suurina annoksina, se vähentää merkittävästi veren hukkaa sydänkirurgiassa.

- 35 Aprotiniinia voidaan uuttaa erilaisista naudan elimistä tai kudoksista, kuten keuhkoista, haimasta ja korvasylkirauhasista. Tässä esityksessä täten saatuun aprotiniiniin viitataan luonnollisena aprotiniinina. Eläinkudoksesta eristäminen on vaivalloinen menetelmä ja se vaatii suuret määrät naudan elintä tai kudosta. Paljon mukavampi menetelmä kaupalliseen tuottoon olisi fermentaatiomenetelmä, jossa aprotiniinia koodaava geeni liitetään sopivaan mikro-organismiin rekombinantti-DNA-tekniikoilla ja mikro-organismeja kasvatetaan sopivalla ravintoalustalla, jotta se tuottaisi toivottua tuotetta, jota eritetään alustaan valmiissa muodossa.

Aprotiniinigeeni on fuusioitu E. colin alkaliseen fosfataasisignaali-peptidin koodaus-sekvenssiin ja ilmennetään E. colissa alkalisen fosfataasipromootorin kontrollin alaisena (Marks, C.B. et al., The Journal of Biological Chemistry 261 (1986) 7115-7118). Met-aprotiniinin proteiinisekvenssiä koodaava synteettinen geeni on myös
5 kloonattu E. coli -ekspressiovektorille (von Wilcken-Bermann, B. et al., The EMBO Journal 5 (1986) 3219-3225). Aprotiniinin ja aprotiniinihomologien tuotto on myös kuvattu EP-kuulutusjulkaisussa 238993 ja GB-patenttihakemuksessa 2 188 933.

Kuitenkin ongelmana tuotettaessa pieniä vieraita proteiineja E. colissa on tosiasia,
10 että sellaiset proteiinit ovat taipuvaisia joutua isännän proteaasien hajotettaviksi. Myös oikeiden disulfidisiltojen ja oikean laskostamisen aikaan saaminen saattaisi olla ongelma E. colissa.

On osoitettu, että hiivat kykenevät ilmentämään ja valmistamaan pieniä proteiineja,
15 jotka ovat noin samankokoisia kuin aprotiniini. EP-patenttihakemuksessa 0163529A kuvataan insuliinien prekursorien tuotto oikein sijoittunein disulfidisilloin ja EP-patenttihakemuksessa 0189998A kuvataan glukagonin, yksi-ketjuisen polypeptidin, jossa on 29 aminohappoa, tuotto.

Näillä menetelmillä ilmennetään hiivassa primäärisiä tuotteita, jotka koostuvat toivotusta proteiinista, joka on liittynyt hiivan johtavaan peptidiin. Erityksen aikana primääristä tuotetta prosessoidaan Kex2-entsyymillä avulla (Julius, D. et al. Cell 32 (1983) 839-852) ja prosessoitu tuote, johon viitataan myös valmiina tai täysin kehitettyneenä tuotteena, eritetään sitten alustaan. Ilmentyneen primäärisen tuotteen
20 prosessointi tapahtuu emäksisessä aminohappoparissa (Lys-Arg) valmiin tuotteen N-terminaalissa.

Aprotiniinin, jolla on emäksinen aminohappo (Arg) N-terminaalisisena aminohappona, tapauksessa saattaa ilmetä ongelmia, jos Kex2-prosessointikohta Lys-Arg liitetään ennen aprotiniinisekvenssin ensimmäistä Arg-jäännöstä, koska silloin olisi
30 "kolmoisemäs"-pilkkomiskohta ilmennetyssä fuusiotuotteessa. Emäksisten aminohappojen pari aprotiniinimolekyylissä (Lys(41)-Arg(42)) olisi myös mahdollinen Kex2-entsyymillä pilkkomiskohta hiivasoluissa.

Tämän keksinnön tarkoitus on saada aikaan menetelmä aprotiniinin tai sen homologien tuottamiseksi hiivassa, joka erittää alustaan suuria määriä oikein laskostettua ja

valmistä proteiinia. Tämä on saatu aikaan siten kuin on esitetty oheisissa patentti-vaatimuksissa.

5 Keksintö perustuu sellaiseen yllättävään havaintoon, että aprotiniinia ja sen tiettyjä homologeja voidaan tuottaa suurina määrinä niin, että siinä on oikein sijaitsevat di-sulfidisillat, kasvattamalla hiivakantaa, joka on transformoitu sellaisia tuotteita koo-daavalla DNA-sekvenssillä.

10 Tämän keksinnön ensimmäisen suoritusmuodon mukaisesti saadaan menetelmä, jos-sa tuotetaan suuria saantoja aprotiniinia tai sen homologeja hiivassa kasvattamalla hiivakantaa, jossa on replikoituva ekspressiovektori, joka sisältää synteettisen gee-nin, joka koodaa aprotiniinia tai sen homologia, sopivalla ravintoalustalla, minkä jälkeen aprotiniini tai sen homologi saadaan kasvatusalustasta.

15 Tämän keksinnön toisen suoritusmuodon mukaisesti saadaan DNA-sekvenssi, joka koostuu synteettisestä geenistä, joka koodaa aprotiniinia tai sen homologeja.

20 Tämän keksinnön kolmannen suoritusmuodon mukaisesti saadaan replikoituva eks-pressiovektori, jossa on DNA-sekvenssi, joka koodaa aprotiniinia tai aprotiniiniho-mologia ja DNA-sekvenssi, joka sallii aprotiniinin tai sen homologin ilmenemisen hiivassa.

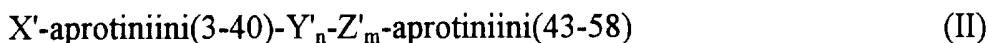
Tämän keksinnön neljännen suoritusmuodon mukaisesti saadaan hiivakanta, joka on transformoitu tällä replikoituvalla ekspressiovektorilla.

25 Tällä keksinnöllä tuotettuja aprotiniineja voidaan luonnehtia seuraavalla kaavalla (I)



30 jossa X tarkoittaa Arg-Pro, Pro on vety, aprotiniini(3-40) tarkoittaa aminohapposek-venssiä aminohappojäännöksestä 3-40 luonnon aprotiniinista, Y voi olla Lys tai ei-emäksinen aminohappojäännös, esim. Ser, Thr tai Ala, Z voi olla Arg tai ei-emäksinen aminohappojäännös, esim. Ser, Thr tai Ala, sekä n että m ovat 0 tai 1 ja aprotiniini(43-58) tarkoittaa aminohapposekvenssiä aminohappojäännöksestä 43-58
35 luonnon aprotiniinissa.

Tämä keksintö on kohdistettu myös uusiin aprotiniinihomologeihin, joilla on seuraava kaava (II).



5

jossa X' tarkoittaa Pro:ta tai vetyä, aprotiniini(3-40) tarkoittaa aminohapposekvenssiä aminohappojäännöksestä 3-43 luonnon aprotiniinissa, Y' on Lys tai ei-emäksinen aminohappojäännös, Z' voi olla Arg tai ei-emäksinen aminohappojäännös, sillä ehdolla, että ainakin Y' tai Z' on ei-emäksinen aminohappojäännös, sekä n että m ovat

10

0 tai 1 ja aprotiniini(43-58) tarkoittaa aminohapposekvenssiä aminohappojäännöksestä 43-58 luonnon aprotiniinissa.

Tätä keksintöä kuvataan lisää viittaamalla mukana oleviin piirroksiin, joissa:

15

Kuvio 1 osoittaa synteettisen geenin, joka koodaa aprotiniini(3-58):aa;

Kuvio 2 kuvaa plasmidien pKFN374 ja pKFN375 rakenteen;

Kuvio 3 kuvaa plasmidin pMT 636 rakenteen;

Kuvio 4 osoittaa synteettisen geenin, joka koodaa aprotiniini(3-58,42 Ser):ä;

Kuvio 5 kuvaa plasmidien pKFN414 ja pKFN416 rakenteen;

20

Kuvio 6 osoittaa synteettisen geenin, joka koodaa aprotiniini (1-58):aa ja

Kuvio 7 osoittaa synteettisen geenin, joka koodaa aprotiniini(1-58,42 Ser):ä.

25

Eritystarkoituksia varten DNA-sekvenssi, joka koodaa toivottua aprotiniinia tai aprotiniinihomologia, fuusioidaan DNA-sekvenssiin, joka koodaa signaali- tai johtavaa peptidisekvenssiä. Transformoitu mikro-organismi pilkkoo signaali- tai johtavat peptidit pois ilmennetyn proteiinituotteen soluista erittämisen aikana, jolloin varmistetaan toivotun tuotteen yksinkertaisempi eristysmenetelmä. Hyvin sopiva johtava peptidisysteemi hiivalle on hiivan MF α 1 johtava sekvenssi tai osa siitä (Kurjan, J. ja Herskowitz, I., Cell 30 (1982) 933-943) tai johtava sekvenssi, joka on

30

kuvattu DK-patenttihakemuksessa 4638/87. Kuitenkin mitä tahansa signaali- tai johtavaa sekvenssiä, joka johtaa eritykseen hiivassa, voidaan käyttää ja tämän keksinnön ei ole suunniteltu rajoittuvan spesifiseen erityssysteemiin.

35

Ilmenemistarkoituksia varten promoottorisekvenssi asetetaan ylävirtaan halutun proteiinituotteen DNA-sekvenssille. Edullisesti käytetään promoottoria geenistä, joka on synnynnäinen hiivaisäntäorganismissa, esim. TPI- (trioosifosfaatti-isomeraasi) geenin promoottori. Halutun tuotteen DNA-sekvenssiä seuraa transkriptioterminaat-

...

torisekvenssi, edullisesti terminaatrisekvenssi geenistä, joka on synnynnäinen isäntähiivaorganismille, esim. TPI-geenin tai MF α 1-geenin terminaattori.

5 DNA-sekvenssi, joka koodaa aprotiniinia tai aprotiniinihomologia ja joka on fuusioitunut sopivaan promoottori-, signaali-, johtavaan ja terminaatrisekvenssiin liitetään ekspressiovektoriin aprotiniinin tai aprotiniinihomologin ilmenemistä varten hiivassa.

10 Ekspressiovektori voi olla plasmidi, joka kykenee replikoitumaan itsenäisesti hiivassa tai kykenee liittymään hiivan kromosomiin. Isäntäorganismi voi edullisesti stabiloida plasmidin plasmidin katoamista vastaan liittämällä isäntäsolujen elinkyvyille tai normaalille kasvulle olennainen geeni, esim. geeni, joka koodaa solun jakautumista, soluseinän biosynteesiä, proteiinisynteesiä, jne.

15 Kuten tässä keksinnössä on käytetty, aprotiniini(1-58) tarkoittaa aprotiniinia, jolla on luonnon aprotiniinin aminohapposekvenssi, kun taas aprotiniini(3-58) tarkoittaa aprotiniinihomologia, jolta puuttuu ensimmäiset kaksi N-terminaalista aminohappojäännöstä. Aprotiniini(1-58,42 Ser) tarkoittaa aprotiniinihomologia, jossa Arg asemassa 42 on korvattu Ser:llä ja aprotiniini (3-58,42 Ser) tarkoittaa aprotiniinihomologia, jolta puuttuu ensimmäiset kaksi N-terminaalista aminohappojäännöstä ja lisäksi niillä on Arg asemassa 42 korvattu Ser:llä.

25 Menetelmät, joita voidaan käyttää toteutettaessa keksintöä hiivan transformoimiseksi ja transformoitujen hiivakantojen viljelemiseksi, ovat alalla tunnettuja, kuten sellaiset kuin on kuvattu edellä mainituissa EP-patenttihakemuksissa 0163529A ja 0189998A.

30 Jotta minimoitaisiin erityksen aikana mahdolliset komplikaatiot, joita "kolmoisemäs"-pilkkomiskohta aprotiniinigeenin N-terminaalisessa päässä aiheuttaa, tuotettiin aprotiniinihomologi, jolta puuttuu ensimmäiset kaksi N-terminaalista aminohappojäännöstä (Arg-Pro).

35 Jotta vältettäisiin tai minimoitaisiin myös mahdollinen aprotiniinin Kex2-pilkkominen Lys(41)-Arg(42):ssa, voidaan valmistaa aprotiniinihomologi, jossa on yksi tai molemmat aminohappojäännökset Lys(41) ja Arg(42) korvattu ei-emäksisellä aminohappojäännöksellä. Edullinen tämän tyyppin aprotiniinihomologi on sellainen, jossa on Ser asemassa 42 Arg:n sijasta.

Yllättäen osoitettiin, että lukuunottamatta tosiasiaa, että luonnon aprotiniinissa on N-terminaalinen emäksinen aminohappojäännös ja kaksiemäksinen sekvenssi, hiivat kykenevät silti ilmentämään ja erittämään tuotetta, joka on identtinen luonnon aprotiniinin kanssa ilman aprotiniinigeenin muokkausta.

5

Näillä uusilla aprotiniinihomologeilla on samat spesifiset inhibiittoritehokkuudet naudan trypsiiniä vastaan kuin luonnon aprotiniinilla ja niitä voidaan sen mukaisesti käyttää korvaamaan luonnon aprotiniinia.

- 10 Keksinnön yhdisteiden spesifinen inhibiittoritehokkuus mitattiin seuraamalla bentsoyliarginiini-p-nitroanilidin trypsiinihydrolyysin (BAPNA) inhibitiota spektrometrisellä analyysillä, kuten Erlanger, B.F., Kokonski, N. ja Cohen, W. kuvaavat, Arch. Biochem. Biophys. 95, (1961) 271.

- 15 Näitä aprotiniinihomologeja koodaavat DNA-sekvenssit tehdään edullisesti oligonukleotidisynteesillä käyttämällä tunnettuja tekniikkoja, koska tämä mahdollistaa valita kodonit, joiden tiedetään olevan edullisia hiivailmentämiselle.

Seuraavat synteettiset geenit on rakennettu:

20

AspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIleIleArg
GATTTCTGTTTGGAACTCCATACACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATCATCAGA
CTAAAGACAAACCTTGGAGGTATGTGACCAGGTACATTTTCGATCTTAGTAGTCT

25

TyrPheTyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGlyGlyCys
TACTTCTACAACGCCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACCTTTCGTTTACGGTGGCTGC
ATGAAGATGTTGCGGTTCCGACCAAACACAGTTTGAAAGCAAATGCCACCGACG

30

ArgAlaLysArgAsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMetArgThrCysGly
AGAGCTAAGAGAAACAACCTTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACTTGTGGT
TCTCGATTCTCTTTGTTGAAGTTCAGACGACTTCTGACGTACTCTTGAACACCA

GlyAla

GGTGCC

35

CCACGG

joka koodaa aprotiniini(3-58):aa,

AspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIleIleArg
 GATTTCTGTTTGGAACTCCATACACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATCATCAGA
 CTAAAGACAAACCTTGGAGGTATGTGACCAGGTACATTTTCGATCTTAGTAGTCT

5 TyrPheTyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGlyGlyCys
 TACTTCTACAACGCCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACCTTTTCGTTTACGGTGGCTGC
 ATGAAGATGTTGCGGTTCCGACCAAACACAGTTTGAAAGCAAATGCCACCGACG

ArgAlaLysSerAsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMetArgThrCysGly
 10 AGAGCTAAGTCCAACAACTTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACTTGTGGT
 TCTCGATTCAAGTTGTTGAAGTTCAGACGACTTCTGACGTACTCTTGAACACCA

GlyAla
 GGTGCC

15 CCACGG joka koodaa aprotiniini (3-58,42 Ser):ä,

ArgProAspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIle
 AGGCCTGATTTCTGTTTGGAACTCCATACACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATC
 TCCGGACTAAAGACAAACCTTGGAGGTATGTGACCAGGTACATTTTCGATCTTAG
 20

IleArgTyrPheTyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGly
 ATCAGATACTTCTACAACGCCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACCTTTTCGTTTACGGT
 TAGTCTATGAAGATGTTGCGGTTCCGACCAAACACAGTTTGAAAGCAAATGCCA

25 GlyCysArgAlaLysArgAsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMetArgThr
 GGCTGCAGAGCTAAGAGAAACAACTTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACT
 CCGACGTCTCGATTCTCTTTGTTGAAGTTCAGACGACTTCTGACGTACTCTTGA

CysGlyGlyAla
 30 TGTGGTGGTGCC

ACACCACCACGG joka koodaa aprotiini(1-58):aa ja

ArgProAspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIle
 AGGCCTGATTTCTGTTTGGAACCTCCATACACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATC
 TCCGGACTAAAGACAAACCTTGGAGGTATGTGACCAGGTACATTTTCGATCTTAG

5 IleArgTyrPheTyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGly
 ATCAGATACTTCTACAACGCCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACTTTCGTTTACGGT
 TAGTCTATGAAGATGTTGCGGTTCCGACCAAACACAGTTTGAAAGCAAATGCCA

GlyCysArgAlaLysSerAsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMetArgThr
 10 GGCTGCAGAGCTAAGTCCAACAACTTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACT
 CCGACGTCTCGATTTCAGGTTGTTGAAGTTCAGACGACTTCTGACGTACTCTTGA

CysGlyGlyAla
 TGTGGTGGTGCC

15 ACACCACCACGG joka koodaa aprotiini(1-58,42 Ser):ä.

Esimerkki 1

Aprotiniini(3-58):n tuotto

20 Aprotiniini(3-58):n synteettinen geeni tehtiin lukuisista oligonukleotideistä ligaatiol-
 la.

Oligonukleotidit syntetisoitiin automaattisella DNA-syntetisaattorilla käyttämällä
 fosforamidiittikemiaa kontrolloidulla huokoisella lasipidikkeellä (Beaucage, S.L. ja
 25 Caruthers, M.H., Tetrahedron Letters 22 (1981) 1859-1869).

Syntetisoitiin 10 seuraavaa oligonukleotidia:

I: AAAGAGATTTCTGTTTGGAACCTCCATACACTGGTCC
 30 37meeri

II: TTACATGGACCAGTGTATGGAGGTTCCAAACAGAACT
 38meeri

35 III: ATGTAAAGCTAGAATCATCAGATACTTCTACAACG
 35meeri

IV: CTTGGCGTTGTAGAAGTATCTGATGATTCTAGCT

34meeri

V: CCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACCTTCGTTTACGGTGGCT

5

39meeri

VI: CTCTGCAGCCACCGTAAACGAAAGTTTGACACAAACCAGC

40meeri

10 VII: GCAGAGCTAAGAGAAACAACCTTCAAGT

27meeri

VIII: AGCAGACTTGAAGTTGTTTCTCTTAG

26meeri

15

IX: CTGCTGAAGACTGCATGAGAACTTGTGGTGGTGCCTAAT

39meeri

X: CTAGATTAGGCACCACCACAAGTTCTCATGCAGTCTTC

20

38meeri

5 dupleksia A-E muodostettiin edellä olevista oligonukleotideistä, kuten kuviossa 1 nähdään.

25 Jokaista dupleksia A-E muodostui 20 pmol vastaavista 5'-fosforyloiduista oligonukleotidipareista I-X kuumentamalla 5 min 90 °C:ssa, minkä jälkeen jäähdytettiin huoneenlämpötilaan yli 75 min ajan. Viisi dupleksia sekoitettiin ja käsiteltiin T4-ligaasilla. Synteettinen geeni eristettiin 176 bp vyöhykkeenä ligaatioseoksen elektroforeesissa 2 % agarosigeelissä. Saatu synteettinen geeni näkyy kuviossa 1.

30

Synteettinen geeni ligoitiin 330 bp EcoRI-HgaI-fragmenttiin plasmidilta pKFN9, joka koodaa MF α 1-signaalia ja johtavaa sekvenssiä(1-85) ja suureen EcoRI-XbaI-fragmenttiin pUC19:ltä. pKFN9-rakenne, joka sisältää HgaI-kohdan välittömästi MF α 1 johtavan sekvenssin jälkeen, on kuvattu EP-patenttihakemuksessa 0214826.

35

Ligaatioseosta käytettiin transformoimaan kompetenttia *E. coli*-kantaa (r^- , m^+), joka selektoi ampisilliiniresistenssille. Kun sekvensoitiin 32 P-XbaI-EcoRI-fragmentti

(Maxam, A. ja Gilbert, W., Methods Enzymol. 65 (1980) 499-560), osoitettiin että saatujen pesäkkeiden plasmidit sisälsivät oikean DNA-sekvenssin aprotiniini(3-58):lle.

- 5 Plasmidi pKNF305 valittiin lisäkäyttöön. Plasmidin pKNF305 rakenne on kuvattu kuviossa 2.

- pKNF305 pilkottiin EcoRI:lla ja XbaI:llä ja 0,5 kb fragmentti ligoitiin 9,5 kb NcoI-XbaI-fragmenttiin pMT636:lta ja 1,4 kb NcoI-EcoRI-fragmenttiin pMT636:lta, jolloin saatiin pKNF374-plasmidi, ks. kuvio 2. Plasmidi pMT636 tehtiin pMT608:sta deletoimalla LEU-2-geeni ja pMT479:stä, katso kuvio 3. pMT608 on kuvattu EP-patenttihakemuksessa 195691. pMT479 on kuvattu EP-patenttihakemuksessa 163529. pMT479 sisältää Schizo. pombe TPI-geenin (POT), S. cerevisiae trioosifosfaatti-isomeraasipromoottorin ja terminaattorin, TPI_P ja TPI_T (Alber, T. ja Kawasaki, G. J.Mol. Appl. Gen. 1 (1982) 419-434). Plasmidilla pKNF374 on seuraava sekvenssi:

TPI_P-MFα1-signaali-johtava(1-85)-aprotiniini(3-58)-TPI_T,

- 20 jossa MFα1 on S. cerevisiaeen risteytymistekijä alfa 1 koodaussekvenssi (Kurjan, J. ja Herskowitz, I., Cell 30, (1982) 933-943), signaali-johtava(1-85) tarkoittaa, että sekvenssissä on MFα1 signaali-johtavan sekvenssin ensimmäiset 85 aminohappojäännöstä ja aprotiniini(3-58) synteettinen sekvenssi, joka koodaa aprotiniini johdannaista, jolta puuttuvat ensimmäiset kaksi aminohappojäännöstä.

- 25 S. cerevisiae -kantaa MT663 (E2-7B XE11-36 a/α, Δtpi Δtpi, pep 4-3/pep 4-3) kasvatettiin YPGal:lla (1 % Bacto hiivaekstrakti, 2 % Bacto peptoni, 2 % galaktoosi, 1 % laktaatti) OD_{600nm} = 0,6 asti.

- 30 Kerättiin 100 ml viljelmää sentrifugoimalla, pestiin 10 ml:lla vettä, sentrifugoitiin uudestaan ja suspendoitiin uudestaan 10 ml:aan liuosta, jossa oli 1,2 M sorbitolia, 25 mM Na₂EDTA:ta pH = 8,0 ja 6,7 mg/ml ditiotreitolia. Seosta inkuboitiin 30 °C:ssa 15 min, sentrifugoitiin ja solut suspendoitiin uudestaan 10 ml:aan liuosta, jossa oli 1,2 M sorbitolia, 10 mM Na₂EDTA:ta, 0,1 M natriumsitraattia, pH = 5,8 ja
35 2 mg Novozym^R 234. Seosta inkuboitiin 30 °C:ssa 30 min, solut kerättiin sentrifugoimalla, pestiin 10 ml:ssa 1,2 M sorbitolia ja 10 ml:ssa CAS (1,2 M sorbitoli, 10 mM CaCl₂, 10 mM Tris HCl (Tris = Tris(hydroksimetyyli)aminometaani) pH = 7,5)

ja suspendoitiin uudestaan 2 ml:aan CAS:a. Transformaatiota varten 0,1 ml CAS:iin uudelleen suspendoituja soluja sekoitettiin noin 1 µg kanssa pKFN374-plasmidia ja jätettiin huoneenlämpötilaan 15 min. Lisättiin 1 ml (20 % polyetyleeniglykoli 4000, 10 mM CaCl₂, 10 mM Tris HCl, pH = 7,5) ja seoksen annettiin seistä vielä 30 min

5 huoneenlämpötilassa. Seos sentrifugoitiin ja pelletti suspendoitiin uudestaan 0,1 ml:aan SOS:a (1,2 M sorbitoli, 33 % v/v YPD, 6,7 mM CaCl₂, 14 µg/ml leusii-ni) ja inkuboitiin 30 °C:ssa 2 h. Sitten seosta sentrifugoitiin ja pelletti suspendoitiin uudestaan 0,5 ml:aan 1,2 M sorbitolia. Sitten lisättiin 6 ml pehmeäagaria (Sherman et al., SC-alusta (Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory,

10 1981), jossa oli 1,2 M sorbitoli plus 2,5 % agari) 52 °C:ssa ja seos kaadettiin pehmytagarmaljoihin, joissa oli samaa agarilla kovetettua, sorbitolia sisältävää alustaa. Transformanttipesäkkeet kerättiin 3 d kuluttua 30 °C:ssa, eristettiin uudelleen ja käytettiin aloittamaan nesteviljelmiä. Eräs sellainen transformantti, KFN322 valittiin lisäluonnehtimista varten.

15

Hiivakantaa KFN322 kasvatettiin YPD-alustalla (1% hiivaekstrakti, 2 % peptoni (Difco Laboratoriot) ja 2 % glukoosi). 10 ml viljelmää, jossa oli kanta, ravisteltiin 30 °C:ssa OD_{600nm} = 32. Sentrifugaation jälkeen supernatantti analysoitiin FPLC-ioninvaihtokromatografialla. Hiivasupernatantti suodatettiin 0,22 µm Millex^R GV-suodatinyksikön läpi ja lisättiin 1 ml MonoS-kationinvaihtopylvääseen (0,5 x 0,5 cm), joka oli tasapainotettu 20 mM Bicinellä, pH 8,7. Sen jälkeen, kun pylväs oli pesty tasapainotuspuskurilla, pylväs eluoiitiin lineaarisella NaCl-gradientilla (0-1 M) tasapainotuspuskurissa. Trypsiini-inhibiittoriaktiivisuus määritettiin eluoiduista fraktioista spektrofotometrisellä määrittelyllä ja lisäksi absorptiointegraatiolla

20

25 280 nm:ssä

$$E_{280}^{1\%}(\text{aprotiniini}) = 8,3$$

Saanto oli noin 3 mg/l aprotiniini(3-58):aa.

30

Aminohappoanalyysiä ja N-terminaalisekvensointia varten hiivasupernatantti (7 ml) säädettiin pH 8,7:ksi 0,1 M NaOH:lla ja suodatettiin (0,22 µm). Q-Sepharose-anioninvaihtopylväästä (1 x 4 cm) ulos virtaava neste, joka tasapainotettiin 20 mM Bicinellä, pH 8,7, lisättiin MonoS-kationinvaihtopylvääseen (0,5 x 5 cm). Kationinvaihtokromatografia suoritettiin kuten edellä kuvattiin. Gradientissa eluoidun aprotiniini(3-58):n konsentraatio mitattiin kromatografoimalla uudestaan MonoS:ssä ja eluoimalla jyrkällä NaCl-gradientilla. Kerättyjä fraktioita konsentroitiin lisää tyhji-

35

ösentrifugaatiossa noin 100 µl:aan ja laitettiin RP-HPLC-pylvääseen (Vydac C4, 4,6 x 250 mm). Eluaatio suoritettiin CH₃CN-gradientilla 0,1 % TFA:ssa. Kerätyt fraktiot konsentroitiin noin 100 µl:aan tyhjiösentrifugaatiolla ja otettiin näytteitä N-terminaalisekvensointia ja aminohappoanalyysiä varten.

5

N-terminaalisekvensoinnilla saatiin seuraava sekvenssi:

Asp-Phe-Cys-Leu-Glu-Pro-Pro-Tyr-Thr-Gly-Pro-Cys-Lys-Ala-Arg-Ile-Ile-Arg

10 mikä vahvisti, että N-terminaali on oikea.

Aminohappoanalyysi nähdään seuraavassa taulukossa 1. Tästä taulukosta on ilmeistä, että tuotteella on odotettu aminohappokoostumus, so. vähemmän Arg:a ja Pro:ta. Hieman alentunut Ile-sisältö voidaan todennäköisemmin lukea epätäydellisen

15 Ile(18)-Ile(19)-hydrolyysin ansioksi (tämä tunnetaan hyvin alalla). Myös Pro ja Arg ovat hieman odotettua korkeampia. Tämä on nähty myös aprotiniinilla itsellään (taulukko 1, toinen palsta).

Kun verrataan edellä mainitulla Erlanger et al:n menetelmällä, aprotiniini(3-58):n

20 spesifisen aktiivisuuden havaittiin olevan identtinen koevirheen puitteissa luonnon aprotiniinin spesifisen aktiivisuuden kanssa.

Esimerkki 2

Aprotiniini(3-58,42 Ser) tuottaminen

25

Aprotiniini(3-58,42 Ser):n synteettinen geeni rakennettiin kuten esimerkissä 1 on kuvattu. Tarkoituksena korvata Arg(42) Ser:llä, käytettiin seuraavia oligonukleotideja VIIa ja VIIIa VII:n ja VIII:n sijasta:

30 VIIa: GCAGAGCTAAGTCCAACAACCTCAAGT
27meeri

VIIIa: AGCAGACTTGAAGTTGTTGGACTTAG
26meeri

35

Saatu syntetttinen geeni nähdään kuviossa 4. Tämä geeni fuusioituneena MF α 1-signaali-johtava(1-85)-sekvenssiin kloonattiin pUC19:stä johdettuun plasmidiin pKFN306 (katso kuvio 2).

- 5 Seuraamalla esimerkin 1 menetelmää saatiin plasmidi pKFN-375, jolla oli seuraava rakenne

TPI_P-MF α 1-signaali-johtava(1-85)-aprotiniini(3-58,42 Ser)-TPI_T

- 10 jossa aprotiniini(3-58,42 Ser) on syntetttinen geeni, joka koodaa aprotiniinijohdannaista, jolta puuttuu ensimmäiset kaksi aminohappojäännöstä ja jossa on Ser Arg:n sijasta asemassa 42.

- 15 Hiivakanta MT663 transformoitiin plasmidilla pKFN375, kuten edellä on kuvattu, ja transformoidun kannan KFN324 kasvattaminen antoi noin 12 mg/l aprotiniini(3-58,42 Ser):ä.

Kun suoritettiin N-terminaalin sekvensointi, kuten edellä on kuvattu, vahvistettiin seuraava N-terminaalisekvenssi

20

Asp-Phe-Cys-Leu-Glu-Pro-Pro-Tyr-Thr-Gly-Pro-Cys-Lys-Ala-Arg-Ile-Ile-Arg-Tyr-Phe

so. oikea sekvenssi.

25

Aminohappoanalyysi nähdään taulukossa 1 ja se vahvistaa odotetun aminohappokoostumuksen, so. vähemmän Pro:a ja Arg:a ja enemmän Ser:ä (katso myös edellä olevat huomautukset esimerkissä 1).

- 30 Kun verrataan edellä mainitulla Erlanger et al:n menetelmällä, aprotiniini(3-58,42 Ser):n spesifisen aktiivisuuden havaittiin olevan identtinen koevirheen puitteissa luonnon aprotiniinin spesifisen aktiivisuuden kanssa.

Esimerkki 3**Aprotiniini(1-58):n tuotto**

5 Kuviossa 5 näkyvä synteettinen duplexi ligoitiin 330 bp:n EcoRI-HgaI-fragmenttiin plasmidilta pKFN9, joka koodaa MF- α 1-signaali ja johtavaa sekvenssiä ja 144 bp:n

10 AvaII-XbaI-fragmenttiin pKFN305:ltä ja suureen EcoRI-XbaI-fragmenttiin pUC19:ltä.

10 Ligaatioseosta käytettiin transformoimaan kompetenttia *E. coli*-kanta (*r*⁻, *m*⁺), joka selektoi ampicilliiniresistenssille. Kun sekvensoitiin ³²P-leimattu XbaI-EcoRI-fragmentti, osoitettiin että saatujen pesäkkeiden plasmidit sisälsivät oikean DNA-sekvenssin aprotiniini(1-58):lle.

15 Plasmidi pKFN414 valittiin lisäkäyttöön. Plasmidin pKFN414 rakenne kuvataan kuviossa 5.

Seuraamalla esimerkin 1 menetelmää saatiin plasmidi pKFN-418, jolla oli seuraava rakenne:

20 TPI_p-MF α 1-signaali-johtava(1-85)-aprotiniini(1-58)-TPI_T

Hiivakanta MT663 transformoitiin plasmidilla pKFN418, kuten edellä on kuvattu ja transformoidun kannan KFN385 kasvattaminen antoi noin 1-13 mg/l aprotiniini(1-58):aa.

25 Kun verrataan edellä mainitulla Erlanger et al:n menetelmällä, aprotiniini(1-58):n, joka tuotettiin tämän keksinnön mukaisesti, spesifisen aktiivisuuden havaittiin olevan identtinen koeverheen puitteissa luonnon aprotiniinin spesifisen aktiivisuuden kanssa.

30

Esimerkki 4**Aprotiniini(1-58,42 Ser):n tuotto**

35 Plasmidi pKFN416, jossa on aprotiniini(1-58,42 Ser):n geeni, rakennettiin kuten esimerkissä 3 kuvattiin. Seuraamalla esimerkin 1 menetelmää saatiin hiivaplasmidi pKFN420, jolla oli seuraava rakenne:

TPI_P-MF α 1-signaali-johtava(1-85)-aprotiniini(1-58,42 Ser)-TPI_T

5 Hiivakanta MT663 transformoitiin plasmidilla pKFN420, kuten edellä on kuvattu, ja transformoidun kannan KFN387 kasvattaminen antoi noin 1-13 mg/l aprotiniini(1-58,42 Ser):ä.

10 Kun verrataan edellä mainitulla Erlanger et al:n menetelmällä, aprotiniini(1-58,42 Ser):n spesifisen aktiivisuuden havaittiin olevan identtinen koevirheen puitteissa luonnon aprotiniinin spesifisen aktiivisuuden kanssa.

Taulukko 1

Aminohappo	Aprotiniini (teoreett.)	Aprotiniini (havaittu)	Aprotiniini (3-58) (havaittu)	Aprotiniini (3-58,42 Ser) (havaittu)
Asx	5	5,00	4,96	5,02
Thr	3	2,86	2,83	2,85
Ser	1	0,94	0,97	1,78
Glx	3	3,04	3,01	3,02
Pro	4	4,18	3,15	3,19
Gly	6	5,95	6,00	5,99
Ala	6	5,85	5,93	6,01
Cys	6	5,20	5,03	5,41
Val	1	0,99	0,98	0,98
Met	1	0,83	0,85	0,96
Ile	2	1,39	1,41	1,50
Leu	2	1,97	1,98	2,03
Tyr	4	3,84	3,80	3,82
Phe	4	3,98	3,92	3,96
Lys	4	3,92	4,02	3,93
Arg	6	6,39	5,20	4,28
Yhteensä	58	56,33	54,04	54,73

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä aprotiniinin tai sen homologin tuottamiseksi hiivassa, **tunnettu** siitä, että kasvatetaan hiivakantaa, jossa on replikoituva ekspressiovektori vektorin sisältäessä aprotiniinia tai sen homologia koodaavan DNA-sekvenssin fuusioituna DNA-sekvenssiin, joka koodaa signaali- ja johtopeptidiä, joka huolehtii aprotiniinin tai sen homologin erittymisestä sopivalla ravintoalustalla ja erittyneen aprotiniinin tai aprotiniinihomologin talteenottamisen.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että DNA-sekvenssi koodaa aprotiniini(3-58):aa, jolla DNA-sekvenssillä on seuraava sekvenssi:

AspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIleIleArg
 GATTTCTGTTTGGAACTCCATACACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATCATCAGA
 CTAAAGACAAACCTTGGAGGTATGTGACCAGGTACATTTTCGATCTTAGTAGTCT

TyrPheTyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGlyGlyCys
 TACTTCTACAACGCCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACCTTTCGTTTACGGTGGCTGC
 ATGAAGATGTTGCGGTTCGACCAAACACAGTTTGAAAGCAAATGCCACCGACG

20

ArgAlaLysArgAsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMetArgThrCysGly
 AGAGCTAAGAGAAACAACCTTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACTTGTGGT
 TCTCGATTCTCTTTGTTGAAGTTCAGACGACTTCTGACGTACTCTTGAACACCA

25 GlyAla
 GGTGCC
 CCACGG

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että DNA-sekvenssi koodaa aprotiniini(3-58,42 Ser):ä, jolla DNA-sekvenssillä on seuraava sekvenssi:

30

AspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIleIleArg
GATTTCTGTTTGGAACTCCATACACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATCATCAGA
CTAAAGACAAACCTTGGAGGTATGTGACCAGGTACATTTTCGATCTTAGTAGTCT

5 TyrPheTyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGlyGlyCys
TACTTCTACAACGCCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACCTTTCGTTTACGGTGGCTGC
ATGAAGATGTTGCGGTTCCGACCAAACACAGTTTGAAAGCAAATGCCACCGACG

ArgAlaLysSerAsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMetArgThrCysGly
10 AGAGCTAAGTCCAACAACTTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACTTGTGGT
TCTCGATTCAAGTTGTTGAAGTTCAGACGACTTCTGACGTACTCTTGAACACCA

GlyAla

GGTGCC

15 CCACGG

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että DNA-sekvenssi koodaa aprotiniini(1-58):aa, jolla DNA-sekvenssillä on seuraava sekvenssi:

20 ArgProAspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIle
AGGCCTGATTTCTGTTTGGAACTCCATACACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATC
TCCGGAATAAGACAAACCTTGGAGGTATGTGACCAGGTACATTTTCGATCTTAG

IleArgTyrPheTyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGly
25 ATCAGATACTTCTACAACGCCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACCTTTCGTTTACGGT
TAGTCTATGAAGATGTTGCGGTTCCGACCAAACACAGTTTGAAAGCAAATGCCA

GlyCysArgAlaLysArgAsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMetArgThr
GGCTGCAGAGCTAAGAGAAACAACTTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACT
30 CCGACGTCTCGATTCTCTTTGTTGAAGTTCAGACGACTTCTGACGTACTCTTGA

CysGlyGlyAla

TGTGGTGGTGCC

ACACCACCACGG

35

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että DNA-sekvenssi koodaa aprotiniini(1-58,42 Ser):ä, jolla DNA-sekvenssillä on seuraava nukleotidisekvenssi

5 ArgProAspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIle
AGGCCTGATTTCTGTTTGGAACCTCCATACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATC
TCCGGACTAAAGACAAACCTTGGAGGTATGTGACCAGGTACATTTTCGATCTTAG

IleArgTyrPheTyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGly
10 ATCAGATACTTCTACAACGCCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACTTTCGTTTACGGT
TAGTCTATGAAGATGTTGCGGTTCCGACCAAACACAGTTTGAAAGCAAATGCCA

GlyCysArgAlaLysSerAsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMetArgThr
GGCTGCAGAGCTAAGTCCAACAACCTTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACT
15 CCGACGTCTCGATTTCAGGTTGTTGAAGTTCAGACGACTTCTGACGTACTCTTGA

CysGlyGlyAla
TGTGGTGGTGCC
ACACCACCACGG

20

6. Vektori, joka kykenee replikoitumaan hiivassa ja sisältää aprotiniinia tai sen homologia koodaavan DNA-sekvenssin fuusioituna DNA-sekvenssiin, joka koodaa signaali- ja johtopeptidiä, joka sallii aprotiniinin tai aprotiniinihomologin erittymisen.

25

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen vektori, **tunnettu** siitä, että DNA-sekvenssi koodaa aprotiniini(3-58):aa ja sillä on seuraava sekvenssi:

AspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIleIleArg
30 GATTTCTGTTTGGAACCTCCATACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATCATCAGA
CTAAAGACAAACCTTGGAGGTATGTGACCAGGTACATTTTCGATCTTAGTAGTCT

TyrPheTyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGlyGlyCys
TACTTCTACAACGCCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACTTTCGTTTACGGTGGCTGC
35 ATGAAGATGTTGCGGTTCCGACCAAACACAGTTTGAAAGCAAATGCCACCGACG

ArgAlaLysArgAsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMetArgThrCysGly
 AGAGCTAAGAGAAACAACCTTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACTTGTGGT
 TCTCGATTCTCTTTGTTGAAGTTCAGACGACTTCTGACGTACTCTTGAACACCA

5 GlyAla
 GGTGCC
 CCACGG

8. Patenttivaatimuksen 6 mukainen vektori, **tunnettu** siitä, että DNA-sekvenssi
 10 koodaa aprotiniini(3-58,42 Ser):ä ja sillä on seuraava sekvenssi:

AspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIleIleArg
 GATTTCTGTTTGGAACCTCCATACACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATCATCAGA
 CTAAAGACAAACCTTGGAGGTATGTGACCAGGTACATTTTCGATCTTAGTAGTCT
 15

TyrPheTyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGlyGlyCys
 TACTTCTACAACGCCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACCTTTCGTTTACGGTGGCTGC
 ATGAAGATGTTGCGGTTCCGACCAAACACAGTTTGAAGCAAATGCCACCGACG

20 ArgAlaLysSerAsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMetArgThrCysGly
 AGAGCTAAGTCCAACAACCTTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACTTGTGGT
 TCTCGATTGAGGTTGTTGAAGTTCAGACGACTTCTGACGTACTCTTGAACACCA

GlyAla
 25 GGTGCC
 CCACGG

9. Patenttivaatimuksen 6 mukainen vektori, **tunnettu** siitä, että DNA-sekvenssi
 koodaa aprotiniini(1-58):aa ja sillä on seuraava sekvenssi:

30 ArgProAspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIle
 AGGCCTGATTTCTGTTTGGAACCTCCATACACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATC
 TCCGGAATAAGACAAACCTTGGAGGTATGTGACCAGGTACATTTTCGATCTTAG

35 IleArgTyrPheTyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGly
 ATCAGATACTTCTACAACGCCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACCTTTCGTTTACGGT
 TAGTCTATGAAGATGTTGCGGTTCCGACCAAACACAGTTTGAAGCAAATGCCA

GlyCysArgAlaLysArgAsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMetArgThr
 GGCTGCAGAGCTAAGAGAAACAACTTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACT
 CCGACGTCTCGATTCTCTTTGTTGAAGTTCAGACGACTTCTGACGTACTCTTGA

5 CysGlyGlyAla
 TGTGGTGGTGCC
 ACACCACCACGG

10. Patenttivaatimuksen 6 mukainen vektori, **tunnettu** siitä, että DNA-sekvenssi
 10 koodaa aprotiniini(1-58,42 Ser):ä ja sillä on seuraava sekvenssi:

ArgProAspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIle
 AGGCCTGATTTCTGTTTGAACCTCCATACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATC
 TCCGGACTAAAGACAAACCTTGGAGGTATGTGACCAGGTACATTTTCGATCTTAG
 15

IleArgTyrPheTyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGly
 ATCAGATACTTCTACAACGCCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACCTTTCGTTTACGGT
 TAGTCTATGAAGATGTTGCGGTTCCGACCAAACACAGTTTGAAAGCAAATGCCA

20 GlyCysArgAlaLysSerAsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMetArgThr
 GGCTGCAGAGCTAAGTCCAACAACTTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACT
 CCGACGTCTCGATTGAGGTTGTTGAAGTTCAGACGACTTCTGACGTACTCTTGA

: 25 CysGlyGlyAla
 TGTGGTGGTGCC
 ACACCACCACGG

11. DNA-sekvenssi koodaa aprotiniini(3-58):aa ja sillä on seuraava sekvenssi:

30 AspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIleIleArg
 GATTTCTGTTTGAACCTCCATACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATCATCAGA
 CTAAAGACAAACCTTGGAGGTATGTGACCAGGTACATTTTCGATCTTAGTAGTCT

TyrPheTyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGlyGlyCys
 35 TACTTCTACAACGCCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACCTTTCGTTTACGGTGGCTGC
 ATGAAGATGTTGCGGTTCCGACCAAACACAGTTTGAAAGCAAATGCCACCGACG

ArgAlaLysArgAsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMetArgThrCysGly
AGAGCTAAGAGAAACAACCTTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACTTGTGGT
TCTCGATTCTCTTTGTTGAAGTTCAGACGACTTCTGACGTACTCTTGAACACCA

5 GlyAla
GGTGCC
CCACGG

tai DNA-sekvenssi koodaa aprotiniini(3-58,42 Ser):ä ja sillä on seuraava sekvenssi:

10

AspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIleIleArg
GATTTCTGTTTGGAACTCCATACACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATCATCAGA
CTAAAGACAAACCTTGGAGGTATGTGACCAGGTACATTTGATCTTAGTAGTCT

15 TyrPheTyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGlyGlyCys
TACTTCTACAACGCCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACCTTTCGTTTACGGTGGCTGC
ATGAAGATGTTGCGGTTCCGACCAAACACAGTTTGAAAGCAAATGCCACCGACG

20 ArgAlaLysSerAsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMetArgThrCysGly
AGAGCTAAGTCCAACAACCTTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACTTGTGGT
TCTCGATTCTAGGTTGTTGAAGTTCAGACGACTTCTGACGTACTCTTGAACACCA

GlyAla
GGTGCC
25 CCACGG

tai DNA-sekvenssi koodaa aprotiniini(1-58,42 Ser):ä ja sillä on seuraava sekvenssi:

30 ArgProAspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIle
AGGCCTGATTTCTGTTTGGAACTCCATACACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATC
TCCGGACTAAAGACAAACCTTGGAGGTATGTGACCAGGTACATTTGATCTTAG

IleArgTyrPheTyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGly
ATCAGATACTTCTACAACGCCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACCTTTCGTTTACGGT
35 TAGTCTATGAAGATGTTGCGGTTCCGACCAAACACAGTTTGAAAGCAAATGCCA

GlyCysArgAlaLysSerAsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMetArgThr
 GGCTGCAGAGCTAAGTCCAACAACCTTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACT
 CCGACGTCTCGATTTCAGGTTGTTGAAGTTCAGACGACTTCTGACGTACTCTTGA

5 CysGlyGlyAla
 TGTGGTGGTGCC
 ACACCACCACGG

12. Hiivakanta, joka on transformoitu patenttivaatimuksen 6 mukaisella vektorilla.
 10

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av aprotinin eller homologer därav i jäst, känne-
 tecknat av att odling av en jäststam innehållande en replikerbar expressionsvektor,
 varvid vektorn innefattar en DNA-sekvens som kodar för aprotinin eller en aproti-
 15 ninhomolog fusionerad till en DNA-sekvens kodande för en signal- och ledarpeptid
 som åstadkommer sekretion av aprotininet eller aprotininhomologen, i ett lämpligt
 näringsmedium samt utvinning av ifrågavarande sekreterade aprotinin eller aproti-
 ninhomolog därifrån.

20 2. Förfarande enligt patentkrav 1, kännetecknat av att DNA-sekvens kodar för
 aprotinin(3-58), vilken DNA-sekvens har följande sekvens:

AspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIleIleArg
 GATTTCTGTTTGGAACTCCATACACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATCATCAGA
 25 CTAAAGACAAACCTTGGAGGTATGTGACCAGGTACATTTGATCTTAGTAGTCT

TyrPheTyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGlyGlyCys
 TACTTCTACAACGCCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACCTTTCGTTTACGGTGGCTGC
 ATGAAGATGTTGCGGTTCCGACCAAACACAGTTTGAAAGCAAATGCCACCGACG

30 ArgAlaLysArgAsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMetArgThrCysGly
 AGAGCTAAGAGAAACAACCTTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACTTGTGGT
 TCTCGATTCTCTTTGTTGAAGTTCAGACGACTTCTGACGTACTCTTGAACACCA

35 GlyAla
 GGTGCC
 CCACGG

3. Förfarande enligt patentkrav 1, kännetecknat av att DNA-sekvens kodar för aprotinin(3-58,42 Ser), vilken DNA-sekvens har följande sekvens:

5 AspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIleIleArg
GATTTCTGTTTGGAACCTCCATACACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATCATCAGA
CTAAAGACAAACCTTGGAGGTATGTGACCAGGTACATTTTCGATCTTAGTAGTCT

TyrPheTyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGlyGlyCys
TACTTCTACAACGCCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACCTTCGTTTACGGTGGCTGC
10 ATGAAGATGTTGCGGTTCCGACCAAACACAGTTTGAAAGCAAATGCCACCGACG

ArgAlaLysSerAsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMetArgThrCysGly
AGAGCTAAGTCCAACAACCTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACTTGTGGT
TCTCGATTGAGGTTGTTGAAGTTCAGACGACTTCTGACGTACTCTTGAACACCA
15
GlyAla
GGTGCC
CCACGG

20 4. Förfarande enligt patentkrav 1, kännetecknat av att DNA-sekvens kodar för aprotinin(1-58), vilken DNA-sekvens har följande sekvens:

ArgProAspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIle
AGGCCTGATTTCTGTTTGGAACCTCCATACACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATC
25 TCCGGACTAAAGACAAACCTTGGAGGTATGTGACCAGGTACATTTTCGATCTTAG

IleArgTyrPheTyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGly
ATCAGATACTTCTACAACGCCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACCTTCGTTTACGGT
TAGTCTATGAAGATGTTGCGGTTCCGACCAAACACAGTTTGAAAGCAAATGCCA
30
GlyCysArgAlaLysArgAsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMetArgThr
GGCTGCAGAGCTAAGAGAAACAACCTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACT
CCGACGTCTCGATTCTCTTTGTTGAAGTTCAGACGACTTCTGACGTACTCTTGA

35 CysGlyGlyAla
TGTGGTGGTGCC
ACACCACCACGG

5. Förfarande enligt patentkrav 1, kännetecknat av att DNA-sekvensen kodar för aprotinin(1-58,42 Ser), vilken DNA-sekvens har följande nukleotidsekvens:

ArgProAspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIle
 5 AGGCCTGATTTCTGTTTGGAACTCCATACACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATC
 TCCGGACTAAAGACAAACCTTGGAGGTATGTGACCAGGTACATTTTCGATCTTAG
 IleArgTyrPheTyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGly
 ATCAGATACTTCTACAACGCCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACCTTTCGTTTACGGT
 10 TAGTCTATGAAGATGTTGCGGTTCCGACCAAACACAGTTTGAAAGCAAATGCCA
 GlyCysArgAlaLysSerAsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMetArgThr
 GGCTGCAGAGCTAAGTCCAACAACCTTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACT
 CCGACGTCTCGATTTCAGGTTGTTGAAGTTCAGACGACTTCTGACGTACTCTTGA
 15 CysGlyGlyAla
 TGTGGTGGTGCC
 ACACCACCACGG

20 6. Vektor med förmåga till replikation i jäst, vilken innefattar en DNA-sekvens som kodar för aprotinin eller en aprotininhomolog fusionerad till en DNA-sekvens som kodar för en signal- och ledarpeptid som åstadkommer sekretion av ifrågasvarande aprotinin eller aprotininhomolog.

25 7. Vektor enligt patentkrav 6, kännetecknad av att DNA-senvensen kodar för aprotinin(3-58) och har följande sekvens:

AspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIleIleArg
 GATTTCTGTTTGGAACTCCATACACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATCATCAGA
 30 CTAAAGACAAACCTTGGAGGTATGTGACCAGGTACATTTTCGATCTTAGTAGTCT
 TyrPheTyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGlyGlyCys
 TACTTCTACAACGCCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACCTTTCGTTTACGGTGGCTGC
 ATGAAGATGTTGCGGTTCCGACCAAACACAGTTTGAAAGCAAATGCCACCGACG
 35

ArgAlaLysArgAsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMetArgThrCysGly
AGAGCTAAGAGAAACAACTTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACTTGTGGT
TCTCGATTCTCTTTGTTGAAGTTCAGACGACTTCTGACGTACTCTTGAACACCA

5 GlyAla
GGTGCC
CCACGG

8. Vektor enligt patentkrav 6, **kännetecknad** av att DNA-sekvensen kodar för
10 aprotinin(3-58,42 Ser) och har följande sekvens:

AspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIleIleArg
GATTTCTGTTTGGAACCTCCATACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATCATCAGA
CTAAAGACAAACCTTGGAGGTATGTGACCAGGTACATTTTCGATCTTAGTAGTCT

15

TyrPheTyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGlyGlyCys
TACTTCTACAACGCCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACCTTTCGTTTACGGTGGCTGC
ATGAAGATGTTGCGGTTCCGACCAAACACAGTTTGAAAGCAAATGCCACCGACG

20 ArgAlaLysSerAsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMetArgThrCysGly
AGAGCTAAGTCCAACAACTTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACTTGTGGT
TCTCGATTGAGGTTGTTGAAGTTCAGACGACTTCTGACGTACTCTTGAACACCA

25 GlyAla
GGTGCC
CCACGG

9. Vektor enligt patentkrav 6, **kännetecknad** av att DNA-sekvensen kodar för
aprotinin(1-58) och har följande sekvens:

30

ArgProAspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIle
AGGCCTGATTTCTGTTTGGAACCTCCATACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATC
TCCGGACTAAAGACAAACCTTGGAGGTATGTGACCAGGTACATTTTCGATCTTAG

35 IleArgTyrPheTyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGly
ATCAGATACTTCTACAACGCCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACCTTTCGTTTACGGT
TAGTCTATGAAGATGTTGCGGTTCCGACCAAACACAGTTTGAAAGCAAATGCCA

GlyCysArgAlaLysArgAsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMetArgThr
 GGCTGCAGAGCTAAGAGAAACAACCTTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACT
 CCGACGTCTCGATTCTCTTTGTTGAAGTTCAGACGACTTCTGACGTACTCTTGA

5 CysGlyGlyAla
 TGTGGTGGTGCC
 ACACCACCACGG

10. Vektor enligt patentkrav 6, **kännetecknad** av att DNA-sekvensen kodar för
 10 aprotinin(1-58,42 Ser) och har följande sekvens:

ArgProAspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIle
 AGGCCTGATTTCTGTTTGGAACTCCATACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATC
 TCCGGACTAAAGACAAACCTTGGAGGTATGTGACCAGGTACATTTTCGATCTTAG
 15

IleArgTyrPheTyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGly
 ATCAGATACTTCTACAACGCCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACCTTTCGTTTACGGT
 TAGTCTATGAAGATGTTGCGGTTCCGACCAAACACAGTTTGAAAGCAAATGCCA

20 GlyCysArgAlaLysSerAsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMetArgThr
 GGCTGCAGAGCTAAGTCCAACAACCTTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACT
 CCGACGTCTCGATTTCAGGTTGTTGAAGTTCAGACGACTTCTGACGTACTCTTGA

CysGlyGlyAla
 25 TGTGGTGGTGCC
 ACACCACCACGG

11. DNA-sekvens som kodar för aprotinin(3-58) och har följande sekvens:

30 AspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIleIleArg
 GATTTCTGTTTGGAACTCCATACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATCATCAGA
 CTAAAGACAAACCTTGGAGGTATGTGACCAGGTACATTTTCGATCTTAGTAGTCT

TyrPheTyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGlyGlyCys
 35 TACTTCTACAACGCCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACCTTTCGTTTACGGTGGCTGC
 ATGAAGATGTTGCGGTTCCGACCAAACACAGTTTGAAAGCAAATGCCACCGACG

ArgAlaLysArgAsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMetArgThrCysGly
 AGAGCTAAGAGAAACAACCTTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACTTGTGGT
 TCTCGATTCTCTTTGTTGAAGTTCAGACGACTTCTGACGTACTCTTGAACACCA

5 GlyAla
 GGTGCC
 CCACGG

eller DNA-sekvensen kodar för aprotinin(3-58,42 Ser) och har följande sekvens:

10 AspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIleIleArg
 GATTTCTGTTTGGAACTCCATACACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATCATCAGA
 CTAAAGACAAACCTTGGAGGTATGTGACCAGGTACATTTGATCTTAGTAGTCT

15 TyrPheTyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGlyGlyCys
 TACTTCTACAACGCCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACCTTTCGTTTACGGTGGCTGC
 ATGAAGATGTTGCGGTTCCGACCAAACACAGTTTGAAAGCAAATGCCACCGACG

ArgAlaLysSerAsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMetArgThrCysGly
 20 AGAGCTAAGTCCAACAACCTTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACTTGTGGT
 TCTCGATTGAGGTTGTTGAAGTTCAGACGACTTCTGACGTACTCTTGAACACCA

GlyAla
 GGTGCC
 : 25 CCACGG

eller DNA-sekvensen kodar för aprotinin(1-58,42 Ser) och har följande sekvens:

ArgProAspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIle
 30 AGGCCTGATTTCTGTTTGGAACTCCATACACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATC
 TCCGGACTAAAGACAAACCTTGGAGGTATGTGACCAGGTACATTTGATCTTAG

IleArgTyrPheTyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGly
 ATCAGATACTTCTACAACGCCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACCTTTCGTTTACGGT
 35 TAGTCTATGAAGATGTTGCGGTTCCGACCAAACACAGTTTGAAAGCAAATGCCA

GlyCysArgAlaLysSerAsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMetArgThr
GGCTGCAGAGCTAAGTCCAACAACCTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACT
CCGACGTCTCGATTTCAGGTTGTTGAAGTTCAGACGACTTCTGACGTACTCTTGA

5 CysGlyGlyAla
TGTGGTGGTGCC
ACACCACCACGG

12. Jäststam transformerad med en vektor enligt patentkav 6.

10

3 5 10 15
 AspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIle
 AAAGAGATTTCTGTTTGGAACCTCCATACACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATC
 CTAAAGACAAACCTTGGAGGTATGTGACCAGGTACATTTCGATCTTAG

 20 25 30 35
 IleArgTyrPheTyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGly
 ATCAGATACTTCTACAACGCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACTTTCGTTTACGGT
 TAGTCTATGAAGATGTTGCGGTTCCGACCAAACACAGTTTGAAAGCAAATGCCA

 40 45 50
 GlyCysArgAlaLysArgAsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMetArgThr
 GGCTGCAGAGCTAAGAGAAACAACTTCAAGTTTGCTGAAGACTGCATGAGAACT
 CCGACGTCTCGATTCTCTTTGTTGAAGTTCAGACGACTTCTGACGTACTCTTGA

 55 58
 CysGlyGlyAlaStopXbaI
 TGTGGTGGTGCCTAAT
 ACACCACCACGGATTAGATC

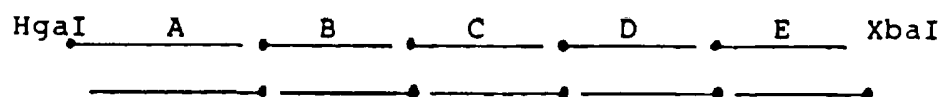


Fig. 1

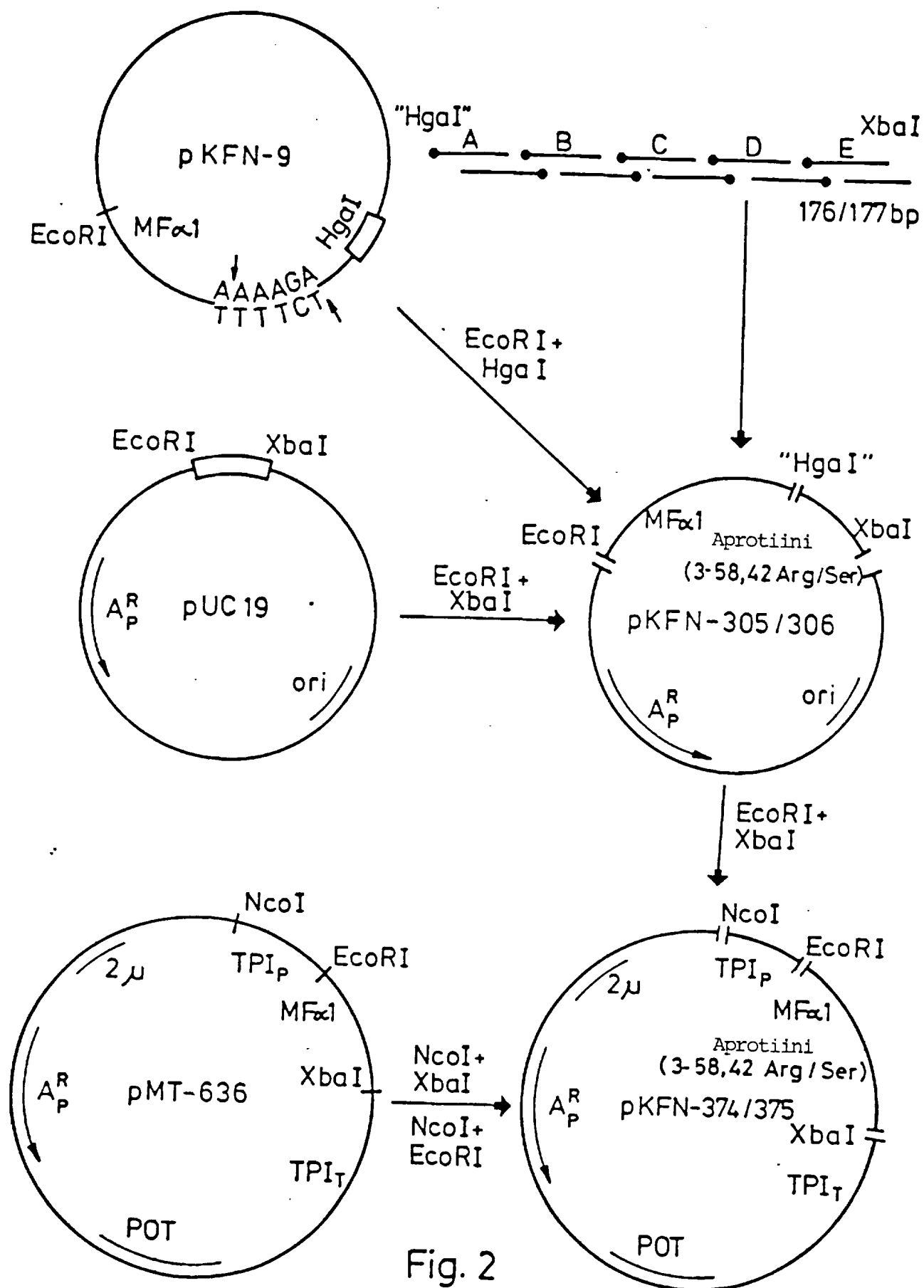


Fig. 2

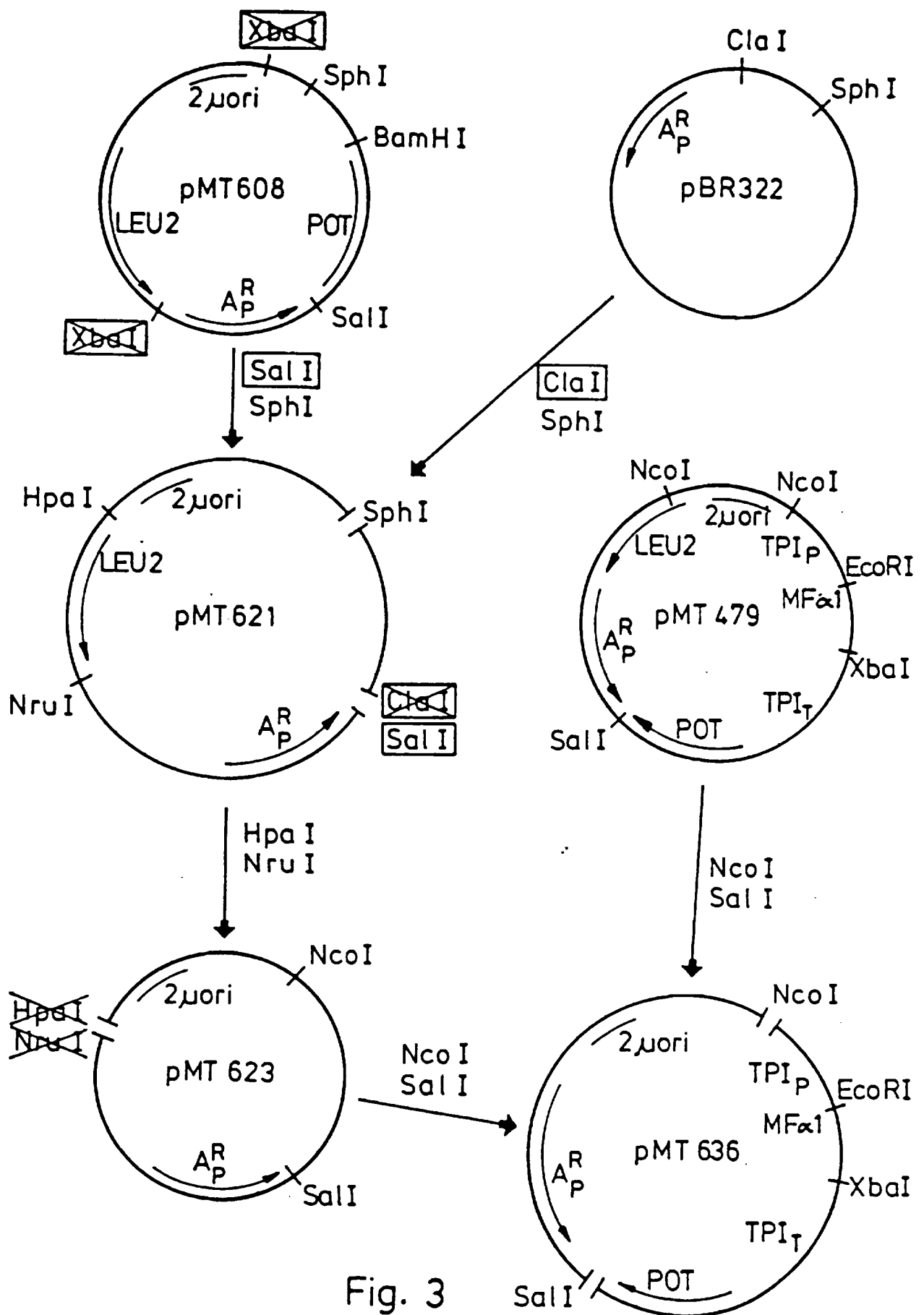


Fig. 3

3 5 10 15
AspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIle
AAAGAGATTTCTGTTTGGAACTCCATACACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATC
CTAAAGACAAACCTTGGAGGTATGTGACCAGGTACATTTCGATCTTAG

20 25 30 35
IleArgTyrPheTyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGly
ATCAGATACTTCTACAACGCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACCTTTCGTTTACGGT
TAGTCTATGAAGATGTTGCGGTTCCGACCAAACACAGTTTGAAAGCAAATGCCA

40 45 50
GlyCysArgAlaLysSerAsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMetArgThr
GGCTGCAGAGCTAAGTCCAACAACCTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACT
CCGACGTCTCGATTCAGGTTGTTGAAGTTCAGACGACTTCTGACGTACTCTTGA

55 58
CysGlyGlyAlaStopXbaI
TGTGGTGGTGCCTAAT
ACACCACCACGGATTAGATC

Fig. 4

Lys Arg Arg Pro Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Tyr Thr Gly
StuI Nla IV Ava II
 AAAGAAGGCCTGATTTCTGTTTGGAACCTCCATACACTG
 TCCGGACTAAAGACAAACCTTGGAGGTATGTGACCAG

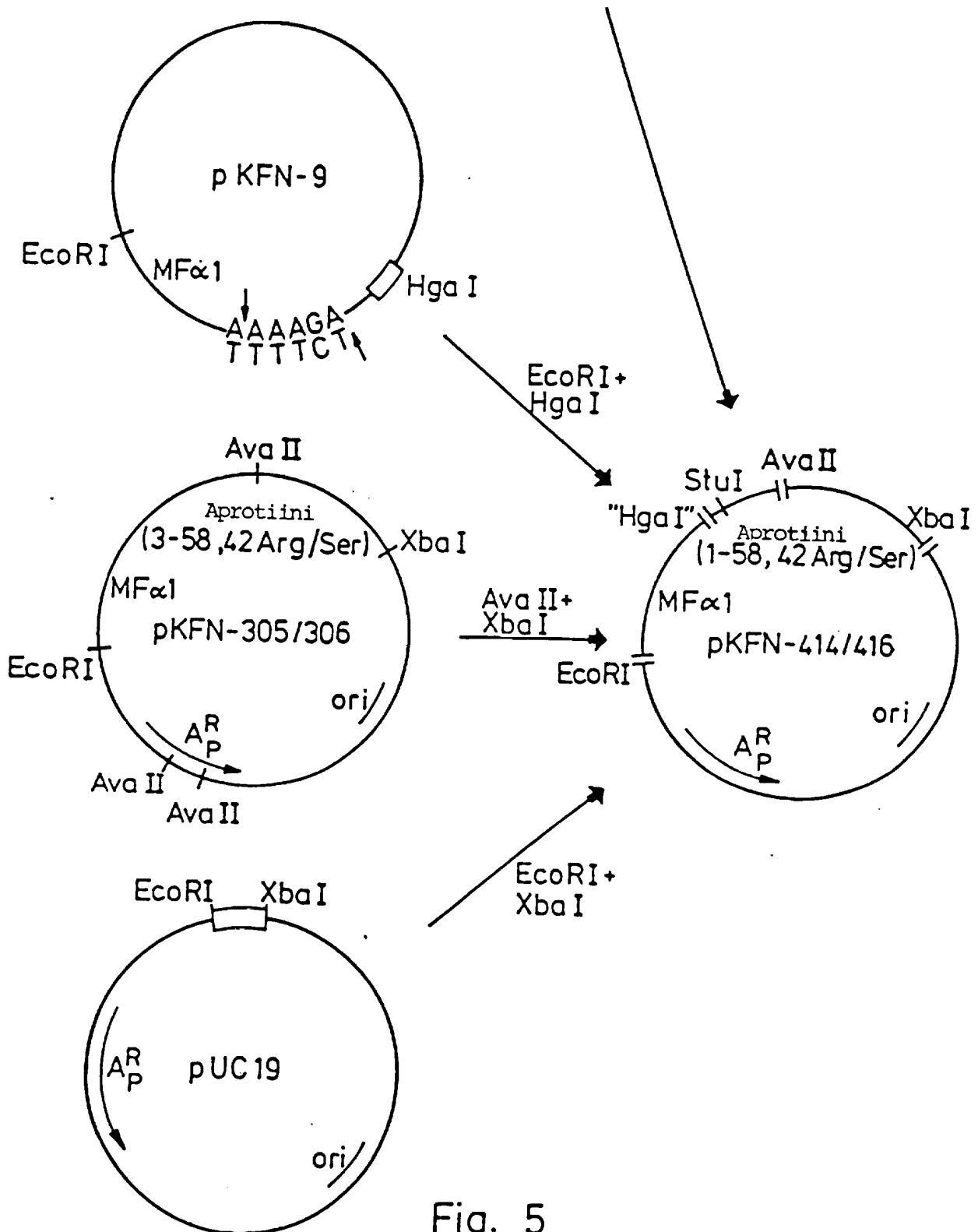


Fig. 5

1 5 10 15
ArgProAspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIle
AGGCCTGATTTCTGTTTGGAACCTCCATACACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATC
TCCGGACTAAAGACAAACCTTGGAGGTATGTGACCAGGTACATTTGATCTTAG

20 25 30 35
IleArgTyrPheTyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGly
ATCAGATACTTCTACAACGCCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACCTTCGTTTACGGT
TAGTCTATGAAGATGTTGCGGTTCCGACCAAACACAGTTTGAAAGCAAATGCCA

40 45 50
GlyCysArgAlaLysArgAsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMetArgThr
GGCTGCAGACGTAAGAGAAACAACCTTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACT
CCGACGTCTCGATTCTCTTTGTTGAAGTTCAGACGACTTCTGACGTACTCTTGA

55 58
CysGlyGlyAlaStopXbaI
TGTGGTGGTGCCTAAT
ACACCACCACGGATTAGATC

Fig. 6

1 5 10 15
ArgProAspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIle
AGGCCTGATTTCTGTTTGGAACCTCCATACACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATC
TCCGGACTAAAGACAAACCTTGGAGGTATGTGACCAGGTACATTTTCGATCTTAG

20 25 30 35
IleArgTyrPheTyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGly
ATCAGATACTTCTACAACGCCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACTTTCGTTTACGGT
TAGTCTATGAAGATGTTGCGGTTCCGACCAAACACAGTTTGAAAGCAAATGCCA

40 45 50
GlyCysArgAlaLysSerAsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMetArgThr
GGCTGCAGACGTAAGTCCAACAACCTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACT
CCGACGTCTCGATTCAGGTTGTTGAAGTTCAGACGACTTCTGACGTACTCTTGA

55 58
CysGlyGlyAlaStopXbaI
TGTGGTGGTGCCTAAT
ACACCACCACGGATTAGATC

Fig. 7