

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

309 541

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)
C12N 9/52 (2006.01)
C12R 1/19 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2021-400**
(22) Přihlášeno: **30.08.2021**
(40) Zveřejněno: **29.03.2023**
(Věstník č. 13/2023)
(47) Uděleno: **15.02.2023**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **29.03.2023**
(Věstník č. 13/2023)

(56) Relevantní dokumenty:
McCARTHY, Robert C., et al. Evolution of enzyme requirements for human islet isolation. OBM Transplantation, 2018, Vol. 2, No. 4, p. 1 - 30, ISSN 2577-5820, celý dokument; DENDO, Mami, et al. Synergistic effect of neural protease and clostripain on rat pancreatic islet isolation. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 2015, Vol. 99, No. 7, p. 1349-1355, ISSN 0041-1337, celý dokument; HEISER, Axel, et al. Isolation of porcine pancreatic islets: Low trypsin activity during the isolation procedure guarantees reproducible high islet yields. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 1994, Vol. 8, No. 6, p. 407-411, ISSN 0887-8013, celý dokument.
CZ 308157 B6; CA 2193354 A1.

(73) Majitel patentu:
MB PHARMA s.r.o., Praha 2, Vinohrady, CZ
(72) Původce:
Mgr. Martin Benešík, Ph.D., Strání, CZ
RNDr. Marek Moša, Ph.D., Mečeříž, CZ
(74) Zástupce:
Rott, Růžička & Guttmann a spol., Vyskočilova
1566, 140 00 Praha 4, Michle

(54) Název vynálezu:
**Kmen produkující clostripain-like protein
pro použití ve směsi s rekombinantní
kolagenázou ColG a ColH pro izolaci
Langerhansových ostrůvků pankreatu**
(57) Anotace:
Geneticky modifikovaný kmen *E. coli* uložený v České sbírce mikroorganismů pod číslem CCM 9176 s vneseným plazmidem pET28 obsahující gen pro clostripainovou peptidázu mající aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1, produkující enzym peptidázu, a jeho použití.

Kmen produkující clostripain-like protein pro použití ve směsi s rekombinantní kolagenázou ColG a ColH pro izolaci Langerhansových ostrůvků pankreatu

5 Oblast techniky

Vynález se týká přípravy rekombinantních proteinů v bakterii *E. coli*, jejich následné purifikace a použití směsi purifikovaných proteinů pro izolaci Langerhansových ostrůvků (LO) z tkáně slinivky břišní. Konkrétně se jedná o dva druhy kolagenáz (ColG a ColH) a hlavně nového druhu clostripainu, který synergicky působí se dvěma zmíněnými kolagenázami při izolaci LO.

Dosavadní stav techniky

15 Izolace Langerhansových ostrůvků (LO) má ve srovnání se separací jiných buněčných typů svá daná specifika. Nesmí při ní docházet k úplnému rozdělení stejných buněčných typů. V rámci této separace tkáňových buněk se stále hledá vyvážený postup, při kterém je nutná desintegrace tkání, ale zároveň protichůdný proces, udržení stejného buněčného klastru (LO) při sobě. Na tomto poli dochází ke značným pokrokům a do dnešní doby byly nastaveny procesy izolace LO a byla
20 vytipována a vyzkoušena řada enzymů, díky kterým lze izolovat LO v poměrně dobré kvalitě. Stále existuje spousta oblastí, kde je nutné zlepšení. Jednou z hlavních je produkce standardizovaných šarží enzymů kolagenázy a pomocných enzymů jako je clostripain a neutrální proteázy a míchání jejich směsí. Prozatím nebyla vytvořena žádná specifická směs enzymů, která by byla rutinně používána pro izolaci LO. Důvodem jsou na jedné straně prozatím stále nedostatečné detailní
25 informace o složení pankreatické tkáně a na straně druhé nedostatečná znalost synergie jednotlivých enzymů kolagenáz, clostripainu a jiných proteáz, při desintegraci tkáně slinivky. Enzymy jsou často detailně popsány po biochemické stránce a jednotlivě samy o sobě, ale chybí množství dat o tom, jak mohou působit *in vivo* při procesu izolace LO.

30 Kolagenázy jsou proteázy rozkládající kolagen, které jsou hojně používány v kosmetice, potravinářství, průmyslu, ale i v medicíně. Pro terapeutické účely, jakým je například i izolace LO, se používají mikrobiální kolagenázy, které na rozdíl od eukaryotických kolagenáz dovedou štěpit kolagen na více místech. Pro kvalitní optimalizaci a vyvážení izolace LO je potřeba najít vhodný poměr používaných enzymů, které mají synergický efekt působení.

35 K izolaci LO se původně využívala směs enzymů izolovaných z lyzátu bakterie *Clostridium histolyticum*, kdy se jednalo o směs až 12 různých enzymů podílejících se na degradaci tkáně. Tato směs ale dle kvality přečištění obsahovala také různé balastní proteiny jako pigmenty nebo endotoxiny. Tyto proteiny mohly být pro proces izolace LO nežádoucí mohou dokonce mít
40 prozánětlivý účinek (Berney et al., 2001; Vargas et al., 1998). Ač tyto směsi byly a jsou produkovány vždy stejným způsobem, jejich charakter vede k nejednoznačným a neinterpretovatelným výsledkům. Tím se ztěžuje jejich kvalitní použití v medicíně. Takové směsi enzymů, které jsou parciálně purifikované, se pro izolace využívají dodnes, jsou však snahy používat vysoce purifikované enzymy přímo z produkčních bakterií, nebo využít produkce
45 rekombinantních proteinů v dobře popsaných systémech, jako jsou bakterie *E. coli* (Ducka et al., 2009; Volpe et al., 2016), *Bacillus* (Jung et al., 1996) atd. Produkce rekombinantních proteinů však sebou nese také úskalí, jelikož nevznikají ve svém přirozeném organismu, mají různé tagy. Z toho důvodu byly optimalizovány (Alipour et al., 2014) například kodony pro produkci klostridiální kolagenázy v *E. coli*.

50 Již v devadesátých letech bylo prokázáno, že kolagenáza třídy I a II (ColH a ColG) stačí k úspěšné izolaci LO z tkáně slinivky břišní (Vos-Scheperkeuter et al., 1997; Gerrit H.J. Wolters et al., 1995). Přidáváním dalších purifikovaných enzymů by docházelo vzhledem k náročnosti procesu výroby, k prodražení celého postupu izolace LO. Několik biotechnologických firem se zaměřilo na purifikaci bakteriálních kolagenáz a tím přispěly k rozšíření metody izolace a transplantace LO

pacientům trpícím diabetem. V první řadě, produkce těchto purifikovaných enzymů v průmyslovém měřítku přispěla k tomu, aby se metoda mohla stát rutinní medicínskou praxí. Ovšem stále je spousta aspektů, které lze vylepšovat, jedním z nich je právě lepší specifita a čistota, ke které může přispívat synergický efekt přídatných enzymů jakými jsou např. *clostripain*.

5

Pro kompletní izolaci a oddělení LO od okolní tkáně potřebuje kolagenáza ColG a ColH působit společně ve specifickém poměru a vyžaduje synergický efekt přídatných enzymů jako jsou neutrální proteázy nebo termolysin (O’Gorman et al., 2005; G. H.J. Wolters et al., 1992). I když jsou schopny kolagenázy ColH a ColG štěpit tkáň slinivky samostatně, případně samotné pouze s příměsí neutrálních proteáz, existují studie na efektivní poměry těchto dvou forem kolagenáz *C. histolyticum*. Uvádí se, že ideální poměr ColH a ColG je 0,64:1,0 (Brandhorst et al., 2008), z čehož vyplývá, že zásadní je pro štěpení v této kombinaci právě ColG. I když samotná ColH s příměsí neutrálních proteáz je schopna štěpit tkáň slinivky. Poměr dvou zmiňovaných kolagenáz určuje také množství neutrálních proteáz nutných k izolaci LO. Tyto poměry také určují kvalitu desintegrace tkání, která vede ke kvalitě a vyšší životaschopnosti (viabilitě) ostrůvků, která je vyžadována pro úspěšnost samotné transplantace.

15

Ideální pro izolaci LO je kromě použití specifických poměrů ColG a ColH také použití speciálně míchaných směsí obsahujících podpůrné lytické proteiny. Kromě neutrálních proteáz, termolysinu a dispázy (používaná v experimentech s prasečími slinivkami) je dalším důležitým enzymem *clostripain*, který je zodpovědný za tryptickou aktivitu ve směsích pro izolaci LO. Experimenty s izolací LO z prasečích slinivky naznačují, že u purifikovaných kolagenáz, které vykazovaly vysokou tryptickou aktivitu a nízkou aktivitu neutrálních proteáz, docházelo k vyššímu výtěžku LO. Další experimenty na potkanech prokázaly, že použití *clostripainu* vede ke zkrácení času digesce tkáně a nedochází k porušení LO jako při použití jiných směsí (Klöck et al., 1996). Základem pro izolaci LO je tedy použití správné proporce nejrozličnějších specifických enzymů, které se mohou lišit také tím, jakým způsobem jsou produkovány. Existuje více studií, které potvrzují, že přítomnost *clostripainu* zvyšuje výnos a kvalitu LO při jejich izolaci (Brandhorst et al., 2009). Na rozdíl od synergického efektu *clostripainu* a neutrálních proteáz, jeho použití s termolysinem nemá žádný pozitivní efekt. Ovšem použití různých enzymů se může lišit také vzhledem k materiálu pro izolaci (slinivka prasat, krys nebo humánní materiál). U izolace LO ze slinivky břišní humánního původu docházelo k lepší izolaci při použití *clostripainu* (Stähle et al., 2015). Mechanismus působení *clostripainu* není do důsledku popsán dodnes, dle hypotéz pomáhá svou aktivitou degradaci elastinu jako součásti extracelulární matrix.

25

Kromě použití kolagenáz a proteolytických enzymů, pocházejících přímo z produkčních organismů, lze využít k produkci dobře definované systémy pro rekombinantní proteiny. Příprava takových kmenů nemusí být snadná, jelikož protein nemusí být v cílovém organismu dobře produkován. Již v roce 1996 byla připravena kolagenáza ColH z *C. histolyticum*, produkováná v bakterii *Bacillus subtilis*, jelikož je k *C. histolyticum* více příbuzný než běžně užívaná *E. coli* (Jung et al., 1996). Ovšem také v *E. coli* byla připravena funkční rekombinantní kolagenáza (Ducka et al., 2009), kterou lze použít pro izolaci LO.

40

Takto připravené enzymy byly úspěšně použity pro izolaci LO v experimentech (Brandhorst et al., 2003; Loganathan et al., 2018) a nebyly pozorovány žádné velké signifikantní rozdíly mezi purifikovanou kolagenázou a rekombinantní verzí proteinu. Některé vlastnosti LO byly lepší při použití clostridiální kolagenázy a jiné u té produkované v *E. coli*. Ovšem použitý poměr kolagenáz je stále předmětem výzkumů a možnost variant poměrů a kombinací s jinými enzymy (*clostripain*, neutrální proteázy) zvyšují počet všech možných kombinací pro izolaci LO.

45

Podobně jako rekombinantní kolagenázy byl připraven i rekombinantní *clostripain*, ovšem ten je odlišný od enzymu produkovaného podle tohoto vynálezu. Jedná se o protein, který má, podobně jako protilátky, lehký a těžký aminokyselinový řetězec a lze jej nalézt v proteinových databázích pod přístupovým číslem WP_138210406.1. Tento protein byl také připraven jako rekombinantní, ale vzhledem k jeho povaze musela být zvolena složitější příprava než u běžných bakteriálních

50

55

proteinů. (Kim et al., 2007; Witte et al., 1994). Existuje několik studií, při kterých byl použit klostridiální purifikovaný nebo rekombinantní purifikovaný clostripain, jenž zvýšil efektivitu izolace LO (Brandhorst et al., 2019; Dendo et al., 2015; Stähle et al., 2015), ale vždy se jednalo o protein zmíněný výše (WP_138210406.1).

5

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je kmen *Escherichia coli* CCM 9176, produkující v plazmidu pET28 rekombinantní protein identifikovaný jako clostripain. Dále způsob produkce, purifikace a použití tohoto proteinu (clostripainu Clos) ve směsi s rekombinantní kolagenázou G a H (ColG a ColH) pro izolaci Langerhansových ostrůvků. Při použití přídavku clostripainu produkovaného z kmene CCM 9176 dochází vždy k zisku vyššího počtu LO při izolaci než při použití samotné surové kolagenázy nebo směsi rekombinantních kolagenáz produkovaných kmeny CCM 9174 a CCM 9175. Součástí příkladů je také produkce kolagenázy G a kolagenázy H produkované kmeny *E. coli* CCM 9174 a CCM 9175 vytvořenými v laboratoři, s nimiž lze zaručit tento synergický účinek.

Pomocí bioinformatických nástrojů byly v genomu bakterie *C. histolyticum* (=Hathewayia histolytica) identifikovány geny pro kolagenázu typu I a typu II (ColG a ColH) a také geny pro podjednotky clostripainu, využívaného běžně ve směsích pro izolaci LO (WP_138210406.1). Dále byl identifikován gen, který některé databáze označily automatickou anotací jako clostripain, ale sekvenčně se liší od běžně používaných clostripainů používaných ve studiích s izolacemi LO. Sekvence tohoto clostripain-like proteinu označeného jako clostripain CCM 9176 je znázorněna na obrázku 1 (SEQ ID NO: 1). Tento gen byl naklonován do expresního plazmidu pomocí restričního klonování (NcoI a BamHI) a histidinová kotva byla umístěna na C-konec proteinové sekvence. Místo pro odštěpení tagu nebylo integrováno, jelikož protein je funkční i bez odstranění. Teoretický izoelektrický bod proteinu včetně his-tagu je 8,31 a molekulová hmotnost (mw) je 45,7 kDa. Po analýze sekvence aminokyselin vyplývá, že protein obsahuje cystein-peptidázovou doménu patřící do peptidázové rodiny C11 (obrázek 4), která je označovaná jako clostripainová rodina enzymů a obsahuje chymotripsin-like specifické sekvence (Barrett & Rawlings, 2014).

Clostripain má pozitivní vliv na použití směsi kolagenáz pro izolaci LO a byl zkoušen s rekombinantními kolagenázami, produkovanými v *E. coli* kmen CCM 9174 a CCM 9175. Jedná se o kolagenázy ColG a ColH (SEQ ID NO: 2 a 3, obrázek 2 a 3) původem z *C. histolyticum* a produkované z plazmidu pET28 pomocí expresních buněk *E. coli*. V případě ColH se jedná o protein, na jehož C-konci je přidána histidinová kotva, která nemá místo pro odštěpení aminokyselinové sekvence. Produkovaný protein má předpokládanou molekulovou hmotnost 114 kDa a izoelektrický bod 5,68. V případě kolagenázy označené ColG je his-tag na N-konci proteinu a za ním následuje štěpné místo pro trombin, kterým lze kotvu odštěpit. Oba proteiny vykazují biochemickou aktivitu i bez odštěpení histidinové kotvy. ColG má molekulovou hmotnost 123 kDa a teoretický izoelektrický bod 5,58. Všechny postupy jsou optimalizovány tak, aby při produkci a purifikaci proteinů byly použity shodné podmínky. Nedochází sice k produkci a přečištění vysoce purifikovaných enzymů, ale procesy jsou snadno proveditelné pro všechny zmíněné proteiny.

45

Podstata vynálezu

Celý proces, exprese a purifikace a zapracování je navržen tak, aby byl shodný u všech proteinů, kolagenázy G, kolagenázy H a hlavně nově popsaného clostripainu, který má zásadní pozitivní efekt na izolaci LO. To znamená, že níže popsaný postup lze použít pro všechny bakteriální kultury (*E. coli* CCM 9174, CCM 9175 a CCM 9176) a všechny produkované a purifikované proteiny (ColG, ColH a Clostripain).

Příprava konzervy bakteriální kultury: Práce s bakteriální kulturou probíhá sterilně, při pipetování kultur se používají špičky s filtrem. Do 50 ml LB média (trypton 5 g/l, yeast extract 10 g/l, NaCl

55

5 g/l, pH 7) se přidá 50 µl zásobního roztoku kanamycinu (finální koncentrace 0,05 mg/ml) a 20 µl kultury obsahující plazmid pET28 pro produkci Clostripainu nebo ColH nebo ColG. Kultivuje se ve 200 ml Erlenmayerově baňce, v inkubátoru na třepačce, při 37 °C přes noc (14 až 18 hodin). Druhý den se kultura centrifuguje (3500 x g, 20 min, 4 °C), supernatant se odstraní. Pelet se rozpustí v 1 ml vychlazeného 10% glycerolu a po 200 µl rozdělí do sterilních zkumavek, které budou sloužit jako zásobní konzervy. Připravené konzervy se dají zamrazit do -80 °C a takto se dlouhodobě uchovávají. Z nich se vychází při přípravě všech proteinů (ColG, ColH a Clos).

Produkce kolagenáz a clostripainu: Při přípravě produkční kultury se do 600 ml LB média přidá 600 µl zásobního roztoku kanamycinu a zaočkuje 50 µl zásobní kultury v glycerolu, kultivuje se ve 2 l Erlenmayerově baňce. Kultivace probíhá v termoboxu při 37 °C za intenzivního třepání. Kultura se nechá růst do $OD_{600} = 0,5$ po dobu přibližně 3 hodiny. Po dosažení cílené optické denzity se indukuje exprese přidáním IPTG do finální koncentrace 0,2 mM. Po přidání induktoru se kultura následně kultivuje při 22 °C po dobu 18 hodin a stále intenzivně aeruje. Druhý den ráno se sklídí narostlá kultura pomocí centrifugace. Centrifuguje se při 3500 rpm, 20 min, 4 °C. Supernatant se slije a k peletům se přidá 10 až 100 ml vychlazeného sonikačního pufru (do každé kyvety 10 ml), chladí se ledem. Centrifugační kyvety se opláchnou dalšími 10 ml sonikačního pufru a zbytek buněk se přenesse k hlavní frakci buněčného peletu ve vhodné nádobě.

Zpracování kultury po expresi proteinů: Pro uvolnění proteinů z buněk se sonikují 3x10 min na ledu, nebo se buňky desintegrují jiným vhodným způsobem, po každých 10 minutách se udělá 5 min pauza, aby se lyzát příliš nezahříval. Sonikuje se na 70% výkonu, při vyšších hodnotách se lyzát velmi rychle zahřívá. Po skončení sonikace se lyzát přenesse do ultracentrifugačních zkumavek (Beckman coulter). Centrifuguje se při 1400 x g, 30 min, 4 °C. Získaný supernatant se přefiltruje přes 0,22 µm filtr s PES membránou, aby během purifikace větší části buněčných zbytků neucpaly chromatografickou kolonu. Pelet se uschová do lednice pro pozdější analýzu na SDS-PAGE.

Přečištění proteinů: Purifikace proteinu s histidinovou kotvou se provádí pomocí metalochelatační chromatografie. Používá se např. kolona HisTrap HP 5ml (naplněná a nabitá Ni Sepharose High Performance). Metodika ekvilibrace kolony, nanesení vzorku a eluce vzorku je pro všechny systémy stejná. Používané pufrů a vodu je nutné před purifikací 10 až 15 min odvdzdušit v ultrazvukové lázni. Niže používaná zkratka CV, znamená objem kolony (column volume). Kolona je ekvilibrována minimálně 5 CV pufru pro nastavení vhodných podmínek pro purifikaci (50mM Tris, 300mM NaCl, 10mM imidazol, pH 7,5). Po ekvilibraci kolony je na ni nanesen lyzát obsahující požadovaný solubilní protein (ColG, nebo ColH, nebo Clostripain). Po nanesení celého objemu na kolonu dojde k zachycení proteinu na koloně pomocí histidinové kotvy a odstranění balastních proteinů. Kolona je promyta opět ekvilibračním pufem (3 CV), pro dodatečné odstranění nezachycených nečistot. Na kolonu je nanesen 8% eluční pufr (50mM Tris, 300mM NaCl, 500mM imidazol, pH 7,5) pro odstranění slabě se vázajících proteinů. Clostripain zůstává zachycený na koloně, část se sice může odmýt, ale dochází k přečištění produktu. Ve druhém kroku je na kolonu nanesen 50% roztok elučního pufru (50mM Tris, 300mM NaCl, 500mM imidazol, pH 7,5), který zapříčiní uvolnění clostripainu z kolony. Tato frakce (obrázek 5) je použita při dalším postupu.

Krok následující po purifikaci je odstranění imidazolu a převod do finálního pufru (50mM Tris, 300mM NaCl, pH 7,5), k tomu se použije chromatografická kolona HiTrap Desalting 5 ml (náplň je na bázi dextranu – Sephadex G-25 Superfine). Metoda pracuje na principu SEC (size exclusion chromatography). V případě, že dojde k tvorbě sraženiny v purifikovaném vzorku, je nutné ho před výměnou pufru přefiltrovat přes 0,45 µm filtr. Pro práci s HiTrap Desalting kolonou lze opět použít injekční stříkačku nebo peristaltickou pumpu. Injekční stříkačka se naplní pufrem pro výměnu v objemu 25 ml (50mM Tris, 300mM NaCl, pH 7,5) a připojí se Luer Lock nástavec. K nástavci se připojí kolona tak, aby nedošlo ke vstupu vzduchu do kolony („drop to drop“). Kolona se ekvilibruje 25 ml pufru při průtoku 5 ml/min (maximální doporučený průtok pro kolonu je 10 ml/min, a tlak 0,25 bar = 25 kPa). V případě, že se do kolony dostane vzduch, proplachuje se

tak dlouho, dokud bublina nevyjde ven (otočení kolony během proplachu odstraní vzduch efektivněji).

Na obrázku 5 je fotka gelu po provedené SDS PAGE jednotlivých purifikovaných frakcí clostripainu. Clostripain je přítomen ve všech frakcích, nejčistší je však frakce A10. Koncentrace elučního pufru použitá pro frakci A10 byla použita jako finální eluční koncentrace.

Odstranění imidazolu ze vzorku: Vzorek se na kolonu nanáší injekční stříkačkou 2 až 5 ml. Stříkačka se naplní pufrem pro výměnu a opět připojí bez průniku vzduchu do kolony. Vzorek z kolony se eluuje objemem pufru v závislosti na objemu nanášeného vzorku. V eluátu je poté přítomen požadovaný protein v novém pufru bez imidazolu. Lze také využít klasickou dialýzu proti stejnému pufru s vhodnou dialyzační hadicí s odpovídající porozitou. Dialyzuje se proti 10 x většímu objemu pufru, aby došlo k odstranění nežádoucího imidazolu.

Lyofilizace: Po odstranění imidazolu a po převodu do vhodného pufru, se vzorek přefiltruje přes 0,22 µm PES filtr. Do nové eppendorfky se odebere 50 až 100 µl vzorku pro další analýzy charakterizující finální produkt (měření koncentrace proteinů – Bradford, určení čistoty produktu – SDS-PAGE, aktivita enzymu). Přefiltrovaný vzorek se sterilně plní do zvážených vialek dle požadovaného množství jednotek potřebných v jedné vialce. Naplněné vialky se dají zamrazit na – 80 °C, alespoň na 1 hodinu. Po namrazení lyofilizátoru a zmrznutí vzorku se dají vialky lyofilizovat. Pokud je objem vzorku do 10 ml, vzorek je zlyofilizován do 24 h. Po ukončení lyofilizace se zváží vialka s lyofilizátem a určí se hmotnost produktu.

25 Objasnění výkresů

Obrázek 1 znázorňuje aminokyselinovou sekvenci clostripainového proteinu podle vynálezu produkovaného kmenem *E. coli* CCM 9176. Geneticky modifikovaný kmen zachovává sekvenci zjištěnou sekvenací kmene *Clostridium histolyticum* CCM 8656, popsáno v české přihlášce vynálezu zn. PV 2017-537, na niž byl udělen patent CZ 308157.

Obrázek 2 znázorňuje aminokyselinovou sekvenci kolagenázy ColG produkovanou kmenem *E. coli* CCM 9174. Geneticky modifikovaný kmen zachovává sekvenci zjištěnou sekvenací kmene *Clostridium histolyticum* CCM 8656, popsáno v české přihlášce vynálezu zn. PV 2017-537, na niž byl udělen patent CZ 308157.

Obrázek 3 znázorňuje aminokyselinovou sekvenci ColH produkovanou kmenem *E. coli* CCM 9175. Geneticky modifikovaný kmen zachovává sekvenci zjištěnou sekvenací kmene *Clostridium histolyticum* CCM 8656, popsáno v české přihlášce vynálezu zn. PV 2017-537, na niž byl udělen patent CZ 308157.

Obrázek 4 představuje schematické znázornění peptidázové domény predikované v proteinu clostripain podle vynálezu.

Obrázek 5 je fotografie gelu po provedené SDS PAGE jednotlivých purifikovaných frakcí clostripainu. Clostripain je přítomen ve všech frakcích, nejčistší je však frakce A10. Koncentrace elučního pufru použitá pro frakci A10 byla použita jako finální eluční koncentrace.

50 Příklady uskutečnění vynálezu

1. Příklad kultivace/produkce ve fermentoru:

Při přípravě produkční kultury se do 10 litrů LB média přidá 10 ml zásobního roztoku kanamycinu a zaočkuje se 10 ml zásobní kultury v glycerolu, kultivuje se v objemu 10 l ve fermentoru při

teplotě 37 °C za intenzivního míchání a vzdušnění. Kultura se nechá růst do $OD_{600} = 0,5$. Po dosažení cílené optické denzity se indukuje exprese přidáním IPTG do finální koncentrace 0,2 mM. Po přidání induktoru se kultura následně kultivuje při 22 °C po dobu 18 hodin a stále intenzivně aeruje. Druhý den ráno se narostlá kultura centrifuguje v 0,5 l kyvetách při 3500 x g, 20 min, 4 °C.

5 Supernatant se slijí a k peletům se přidá 10 až 100 ml vychlazeného sonikačního pufru (do každé kyvety 10 ml) do falkony, která se chladí ledem.

2. Příklad purifikace pomocí centrifugace:

10 Protino Ni-NTA Agarose lze využít pro purifikaci na běžné centrifuze bez nutnosti použití FPLC apod. Při ekvilibraci se resuspenduje Protino Ni-NTA Agarose důkladným protřepáním. Ihned se odebere potřebné množství suspenze do vhodné zkumavky (objem se volí min. 10 x větší, než je objem agarózových kuliček – gelu. Například pro 1 ml gelu se použijí 12 ml zkumavky). Gel se sedimentuje centrifugací při 500 x g, 5 minut. Přidá se 10 objemů ekvilibračního pufru (50mM

15 NaH_2PO_4 , 300mM NaCl, 10mM imidazol) pro kalibraci gelu. Opakovaným otočením zkumavky se její obsah promíchá. Gel se sedimentuje při 500 x g, 5 minut. Opatrně se odebere supernatant do odpadní nádoby. Pro navázání proteinů ke gelu se aplikuje přefiltrovaný bakteriální lyzát s obsahem požadovaných proteinů. Celá suspenze se jemně míchá po dobu 30 až 60 min (vznik vazby mezi His-tag proteiny a Ni^{2+} ionty). Gel se sedimentuje centrifugací 500 x g, 5 minut.

20 Opatrně se odebere supernatant do odpadní nádoby. Přidá se 10 objemů oplachového pufru (50mM NaH_2PO_4 , 300mM NaCl, 20mM imidazol) pro oplach gelu. Opakovaným otočením zkumavky se její obsah promíchá. Gel se sedimentuje při 500 x g, 5 minut. Opatrně se odebere supernatant do odpadní nádoby a opakuje se oplachovací krok. Pro eluci proteinu se k sedimentovanému gelu přidá 1 objem elučního pufru (50mM NaH_2PO_4 , 300mM NaCl, 250mM

25 imidazol). Suspenze se jemně míchá 2 min při pokojové teplotě. Dojde k uvolnění navázaných His-tag proteinů (Clostripain, nebo ColG nebo ColH) z gelu. Gel se sedimentuje při 500 x g, 5 minut. Opatrně se odebere supernatant s požadovanými proteiny do nové zkumavky. Eluované proteiny se skladují na ledu. Eluční kroky se opakují celkem 5 x. Eluované frakce se odebírají vždy do nové zkumavky. Ze vzorku se odstraní imidazol dialýzou, ultrafiltrací nebo pomocí odsolovací kolony

30 (HiTrap desalting).

3. Izolace LO ze slinivky břišní na experimentálních zvířatech (potkani wistar):

Potkaní slinivky byly ošetřeny kontrolní kolagenázou (Sigma Aldrich) a kolagenázou

35 produkovanou kmeny *E. coli* CCM 9174 a CCM 9175 s přídavkem clostripainu produkovaného kmenem *E. coli* CCM 9176. Byl použit objem 15 ml roztoku směsi s kolagenázovou aktivitou 2 U/ml. Poměr enzymů činil ColG:ColH:Clos (5:5:1). Digescce probíhá v teplotě 37 °C po dobu 10 až 40 minut dle stavu pankreatu a jednotlivé buněčné tkáně jsou následně separovány pomocí diskontinuální gradientové centrifugace. Izolované ostrůvky byly kultivovány v CMRL-1066

40 médiu doplněném o 10% FBS, 5% HEPES, 1% Glutamax a 1% penicilinu-streptomycinu v zvlhčovacím inkubátoru v 37 °C a 5% atmosféře CO_2 . Kvalita izolovaných LO byla stanovena pomocí vitálního barvení a stimulovanou sekrecí inzulinu.

4. Izolace LO ze slinivky břišní na experimentálních zvířatech v jiných poměrech A:

45 Potkaní slinivky byly ošetřeny kontrolní kolagenázou (Sigma Aldrich) a kolagenázou ColH podle vynálezu s přídavkem clostripainu Clos podle vynálezu. Byl použit objem 15 ml roztoku směsi s kolagenázovou aktivitou 2 U/ml. Poměr kolagenáz činil ColH:Clos (5:2). Digescce probíhá dle příkladu č. 3.

5. Izolace LO ze slinivky břišní na experimentálních zvířatech v jiných poměrech B:

Potkaní slinivky byly ošetřeny kontrolní kolagenázou (Sigma Aldrich) a kolagenázou CCM 9174 a CCM 9175 s přídavkem clostripainu CCM 9176. Byl použit objem 15 ml roztoku směsi

s kolagenázovou aktivitou 2 U/ml. Poměr kolagenáz činil ColG:ColH:Clos (7:4:2). Digestce probíhá dle příkladu č. 3.

5 Průmyslová využitelnost

Směs rekombinantní kolagenázy G a H obsahující nový typ clostripainu lze využít pro zefektivnění izolace LO. Nový typ rekombinantního clostripainu produkovaný bakterií *E. coli* CCM 9176 může být přidán také do směsí surových kolagenáz anebo být využit do jiných směsí rekombinantních kolagenáz, než je výše zmíněná směs CCM 9174 a CCM 9175.

Seznam sekvencí:

SEQ ID NO: 1

15

Clostripain podle vynálezu Clos

MENKKFKKWTILYTDGNNEMEDIMFKSMNDCKSVEVKEDINLVMQIGLLGESKLYNK
NKFSGVRRYYLNAKEPMLLENLGKANMGDPNILYNFIRWGIKEFPAHHYMVIIISGHGTS
20 FVGALTDTSLDKNYIMGIPEMIKAISLGCKELKSIIDILVDMCFMNSIEILYELSQYESIDR
MITYTDTAPYGGGLGYKKLVEAIEKNCNLKDIDLFTKNLITNLFNLTAIDLDFKLELIK
KKFSYLAFFNYLNNKERSKNPLDIINSIHPSNPYYSFNNTYYDYFNEINGTIKSTIIHDKSKF
NGINSSIKIENKDINNLIAYFRKLEFSRENSWTDLLYNNSNTQKRDINKVKVRTPTSSLTTT
HYILQFNPKDPNSSSVDKLAAALEHHHHHH

25

SEQ ID NO: 2

Sekvence produkované kolagenázy ColG

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMEPIENTNDTSIKNVEKLARNAPNEENSKKVEDSKNDKVE
HVKNIEEAKVEQVAPEVKSSTLRSASIANNTSEKYDFEYLNGLSYTELNLINIKWNQI
NGLFNYSTGSQKFFGDKNRVQAIINALQESGRTYTANDMKGIETFEVLRAFGYLGYYN
DGLSYLNDRNFQDKCIPAMIAIQKNPNFKLGTAVQDEVITSLGKLIGNASANAEEVNNC
VPVLKQFRENLNQYAPDYVKGTAVNELIKGIEFDFSGAAEYKDVKTMPWYGKIDPFINE
35 LKALGLYGNITSATEWASDVGIYYLSKFGLYSTNRNDIVQSLEKAVDMYKYGKIAFVAM
ERITWDYDYGISNGKKVDHDKFLDDAEKHYPKTYTFDNGTFIIRAGDKVSEEKIKRLY
WASREVKSQFHRVVGNDKALEVGNADDVLTMKIFNSPEEYKFNTNINGVSTDNGGLYIE
PRGTFYTYERTPQQSIFSLEELFRHEYTHYLQARYLVDGLWGQGPFEYKRNRLTWFDGT
AEFFAGSTRTSGVLPRKSILGYLAKDKVDHRYSLKKTLNSGYDDSDWMFYNYGFAVAH
40 YLYEKDMPTFIKMNKAILNTDVKSYDEIHKLSDDANKNTEYQNHIEQELADKYQGAGIPL
VSDDYLKDHGYKKASEVYSEISKAASLTNTSVTAESQYFNTFTLRGTYTGETSKGEFK
DWDEMSKKLDGTLESKNSWSGYKTLTAYFTNYRVTSNDKVQYDVVFHGVLTNDAD
ISNNKAPIAKVTGPSTGAVGRNIEFSGKDSKDEDGKIVSYDWDFGDGATSRGKNSVHAY
KKAGTYNVTLKVTDDKGATATESFTIEIKNEDTTTPITKEMEPNDDIKEANGPIVEGTV
45 KGDLNGSDDADTFYFDVKEDGDVTIELPYSGSSNFTWLKYKEGDDQNHASGIDKNNSK
VGTFKSTKGRHYVFIYKHDSASNISYSLNIKGLGNEKLKEKENNDSSDKATVIPNFNTTM
QGSLLGDDSRDYYSFEVKEEGEVNIELDKKDEFGVTWTLHPESNINDRITYGQVDGNKV
SNKVKLPRGKYLLVYKYSGSGNYELRVNK

50

SEQ ID NO: 3

Sekvence produkované kolagenázy ColH

MVQNESKRYTVSYLKTLYNDLVDLLVKTEIENLPDLFQYSSDAKEFYGNKTRMSFIMD
55 EIGRRAPQYTEIDHKGIPTLVEVVVRAGFYLGFGHNKELNEINKRSFKERVIPSILAIQKNPNF

KLGTEVQDKIVSATGLLAGNETAPPEVVNNFTPIQLQDCIKNIDRYALDDLKSKALFNVLA
 APTYDITEYL RATKEKPENTPWY GKIDGFINELKKLALYGKNDNNSWIIDNGIYHIAPLG
 KLHSSNNKIGIETL TEVMKVYPYLSMQHLQSADQIKRHYDSKDAEGNKIPLDKFKKEGKE
 KYCPKTYTFDDGKVIIKAGARVEEEKVKRLY WASKEVNSQFFRVYGIDKPLEEGNPDDI
 5 LTMVIYNSPEEYKLSNVLYGYDTNNGGMYIEPEGTFFTYEREAQESTYTL EELFRHEYTH
 YLQGRYAVPGQWGRTKLYDNDRLTWYEEGGAELFAGSTRTSGILPRKSIVSNIHNTTRN
 NRYKLSDTVHISKY GASFEFYNYACMFMDYMYNKMGMILNKLNDLAKNNDVDGYDNY
 IRLSSNYALNDKYQDHMQERIDNYENLTVPFVADDYLV RHAYKNPNEIYSEISEVAKL
 KDAKSEVKKSQYFSTFTLRGSYTG GASKGKLEDQKAMNKFIDDSLKKLDTYSWSGYKT
 10 LTAYFTNYKVDSSNRVTYDVVFHGYLPNEGDSKNSLPYGKINGTYKGTEKEKIKFSSEG
 SFDPDGKIVSYEWD FGDGNGKSNEENPEHSYDKVGT YTVKLKVTD DKGESSVSTTTAEIK
 DLSENKLPVIYMHVPKSGALNQKVVFY GKGTYDPD GSIAGYQWDFGDGSDFSSEQNPS
 HVTYTKKGEYTVTLRVMDSSGQMSEKTMKIKITDPVYPIGTEKEPNNSKETASGPVPGIP
 VSGTIENTSDQDYFYFDVITPGEVKIDINKLGYGGATWVVYDENNNAVSATDDGQNLS
 15 GKFKADKPGRYYIHL YMFNGSYMPYRINIEG SVGRDPNSSSVDKLAAALEHHHHHH

Přehled literatury

- Alipour, H., Raz, A., Dinparast Djadid, N., Rami, A., & Mahdian, S. M. A. (2014). Codon
 20 optimization of Col H gene encoding *Clostridium histolyticum* collagenase to express in
Escherichia coli. *Codon Optimization of Col H Gene Encoding Clostridium Histolyticum*
Collagenase to Express in Escherichia Coli. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.754>
- Barrett, A. J., & Rawlings, N. D. (2014). Evolutionary Lines of Cysteine Peptidases. *Biological*
 25 *Chemistry*. <https://doi.org/10.1515/bchm.2001.382.5.727>
- Berney, T., Molano, R. D., Cattani, P., Pileggi, A., Vizzardelli, C., Oliver, R., Ricordi, C., &
 Inverardi, L. (2001). Endotoxin-mediated delayed islet graft function is associated with increased
 intra-islet cytokine production and islet cell apoptosis. *Transplantation*.
 30 <https://doi.org/10.1097/00007890-200101150-00020>
- Brandhorst, H., Brandhorst, D., Hesse, F., Ambrosius, D., Brendel, M., Kawakami, Y., & Bretzel,
 R. G. (2003). Successful human islet isolation utilizing recombinant collagenase. *Diabetes*.
 35 <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.5.1143>
- Brandhorst, H., Friberg, A., Andersson, H. H., Felldin, M., Foss, A., Salmela, K., Lundgren, T.,
 Tibell, A., Tufveson, G., Korsgren, O., & Brandhorst, D. (2009). The importance of tryptic-like
 activity in purified enzyme blends for efficient islet isolation. *Transplantation*.
 40 <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31819499f0>
- Brandhorst, H., Johnson, P. R., Mönch, J., Kurfürst, M., Korsgren, O., & Brandhorst, D. (2019).
 Comparison of Clostripain and Neutral Protease as Supplementary Enzymes for Human Islet
 Isolation. *Cell Transplantation*. <https://doi.org/10.1177/0963689718811614>
- Brandhorst, H., Raemisch-Guenther, N., Raemisch, C., Friedrich, O., Huettler, S., Kurfürst, M.,
 45 Korsgren, O., & Brandhorst, D. (2008). The ratio between collagenase class I and class II
 influences the efficient islet release from the rat pancreas. *Transplantation*.
<https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31816050c8>
- Dendo, M., Maeda, H., Yamagata, Y., Murayama, K., Watanabe, K., Imura, T., Inagaki, A.,
 50 Igarashi, Y., Katoh, Y., Ebina, M., Fujimori, K., Igarashi, K., Ohuchi, N., Satomi, S., & Goto, M.
 (2015). Synergistic Effect of Neutral Protease and Clostripain on Rat Pancreatic Islet Isolation.
Transplantation. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000662>
- Ducka, P., Eckhard, U., Schönauer, E., Kofler, S., Gottschalk, G., Brandstetter, H., & Nüss, D.
 55

- (2009). A universal strategy for high-yield production of soluble and functional clostridial collagenases in *E. coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1953-4>
- 5 Jung, C. M., Matsushita, O., Katayama, S., Minami, J., Ohhira, I., & Okabe, A. (1996). Expression of the colH gene encoding *Clostridium histolyticum* collagenase in *Bacillus subtilis* and its application to enzyme purification. *Microbiology and Immunology*. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1996.tb01161.x>
- 10 Kim, C. K., Lee, S. Y., Kwon, O. J., Lee, S. M., Nah, S. Y., & Jeong, S. M. (2007). Secretory expression of active clostripain in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.07.936>
- 15 Klöck, G., Kowalski, M. B., Hering, B. J., Eiden, M. E., Weidemann, A., Langer, S., Zimmermann, U., Federlin, K., & Bretzel, R. G. (1996). Fractions from commercial collagenase preparations: Use in enzymic isolation of the islets of Langerhans from porcine pancreas. *Cell Transplantation*. [https://doi.org/10.1016/0963-6897\(96\)00023-1](https://doi.org/10.1016/0963-6897(96)00023-1)
- 20 Loganathan, G., Subhashree, V., Breite, A. G., Tucker, W. W., Narayanan, S., Dhanasekaran, M., Mokshagundam, S. P., Green, M. L., Hughes, M. G., Williams, S. K., Dwulet, F. E., McCarthy, R. C., & Balamurugan, A. N. (2018). Beneficial effect of recombinant rC1rC2 collagenases on human islet function: Efficacy of low-dose enzymes on pancreas digestion and yield. *American Journal of Transplantation*. <https://doi.org/10.1111/ajt.14542>
- 25 O’Gorman, D., Kin, T., McGhee-Wilson, D., Shapiro, A. M. J., & Lakey, J. R. T. (2005). Multi-lot analysis of custom collagenase enzyme blend in human islet isolations. *Transplantation Proceedings*. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2005.09.139>
- 30 Ståhle, M., Foss, A., Gustafsson, B., Lempinen, M., Lundgren, T., Rafael, E., Tufveson, G., Korsgren, O., & Friberg, A. (2015). Clostripain, the Missing Link in the Enzyme Blend for Efficient Human Islet Isolation. *Transplantation Direct*. <https://doi.org/10.1097/txd.0000000000000528>
- 35 Vargas, F., Vives-Pi, M., Somoza, N., Armengol, P., Alcalde, L., Martí, M., Costa, M., Serradell, L., Dominguez, O., Fernández-Llamazares, J., Julian, J. F., Sanmartí, A., & Pujol-Borrell, R. (1998). Endotoxin contamination may be responsible for the unexplained failure of human pancreatic islet transplantation. *Transplantation*. <https://doi.org/10.1097/00007890-199803150-00020>
- 40 Volpe, L., Salamone, M., Giardina, A., & Ghersi, G. (2016). Optimization of a Biotechnological Process for Production and Purification of Two Recombinant Proteins: Col G and Col H. *Chemical Engineering Transactions*. <https://doi.org/10.3303/CET1649011>
- 45 Vos-Scheperkeuter, G. H., Van Suylichem, P. T. R., Vonk, M. W. A., Wolters, G. H. J., & Van Schilfgaarde, R. (1997). Histochemical Analysis of the Role of Class I and Class II *Clostridium Histolyticum* Collagenase in the Degradation of Rat Pancreatic Extracellular Matrix for Islet Isolation. *Cell Transplantation*. <https://doi.org/10.1177/096368979700600407>
- 50 Witte, V., Wolf, N., Diefenthal, T., Reipen, G., & Dargatz, H. (1994). Heterologous expression of the clostripain gene from *Clostridium histolyticum* in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*: Maturation of the clostripain precursor is coupled with self-activation. *Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/13500872-140-5-1175>
- 55 Wolters, G. H.J., Vos -Scheperkeuter, G. H., van Deijnen, J. H. M., & van Schilfgaarde, R. (1992).

An analysis of the role of collagenase and protease in the enzymatic dissociation of the rat pancreas for islet isolation. *Diabetologia*. <https://doi.org/10.1007/BF00429093>

- 5 Wolters, Gerrit H.J., Vos-Scheperkeuter, G. H., Lin, H. C., & Van Schilfgaarde, R. (1995). Different roles of class I and class II *Clostridium histolyticum* collagenase in rat pancreatic islet isolation. *Diabetes*. <https://doi.org/10.2337/diab.44.2.227>

PATENTOVÉ NÁROKY

5 1. Geneticky modifikovaný bakteriální kmen *E. coli* uložený v České sbírce mikroorganismů pod číslem CCM 9176 s vneseným plazmidem pET28 obsahující gen pro clostripainovou peptidázu mající aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO:1, produkující enzym peptidázu.

2. Použití purifikovaného kmene podle nároku 1 pro produkci clostripainové peptidázy o sekvenci SEQ ID NO: 1.

10 3. Použití kmene *E. coli* uloženého v České sbírce mikroorganismů pod číslem CCM 9176 pro produkci clostripainové peptidázy o sekvenci SEQ ID NO: 1 vhodné v kombinaci s kolagenázou G a/nebo kolagenázou H pro izolaci Langerhansových ostrůvků pankreatu.

4. Použití podle nároku 3, kde se použije kolagenáza G o sekvenci SEQ ID NO: 2 produkovaná kmenem *E. coli* CCM 9174 a/nebo kolagenáza H o sekvenci SEQ ID NO: 3 produkovaná kmenem *E. coli* CCM 9175.

15 4 výkresy

MENKKFKKWTILYTDGNNEMEDIMFKSMNDCKSVEVKEDINLVMQIGLLGESKLYNK
NKFSGVRRYYI.NAKEPMI.LENT.GKANMIGDPNILYNFIRWGIKEFPAHHYMVDSGHGTS
FVGALTDTSLDKNYIMGIPEMIKAISLGCKELKSHIDILVDMCFMNSIEILYELSQYESIDR
MITYTDTAOPYGGLGYKKLVEAIEKNCNLKDIDLFTKNLITNLNFNLTAYDLDFKLELIK
KKFSYLAFFNYLNNKERSKNPLDIINSIHPSNPYYSFNNTYYDYFNEINGTIKSTIHDKSKF
NGINSSIKIENKDIINLAFYRKLEFSRENSWTDLLYNNSTQKRDINKVKVRTPTSSLTTT
HYILQFNPKDPNSSSVDKLAAALEHHHHHH

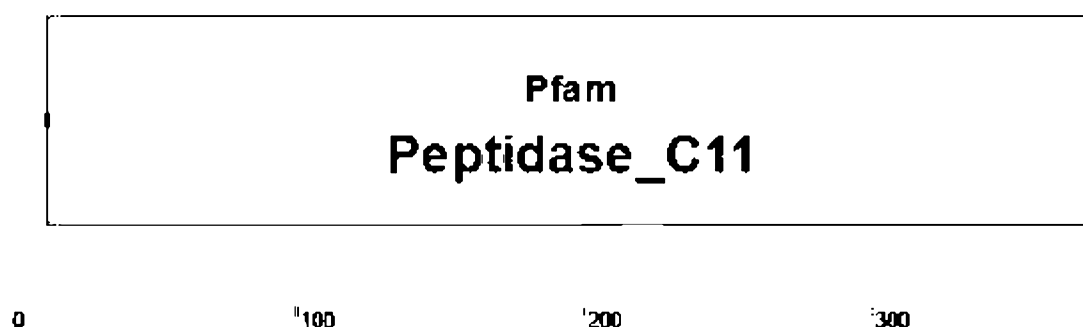
Obr. 1

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMEPIENTNDTSIKNVEKL RNAPNEENSKKVEDSKNDKVE
 HVKNIEEAKVEQVAPEVKSKSTLRSASIAN TNSEKYDFEYLNGLSYTEL TNLIKNIKWNQI
 NGLFNYS TGSQKFFGDKNRVQAIINALQESGRITYTANDMKGIEITFEVLRAGFYLGYYN
 DGLSYLNDRNFQDKCIPAMIAIQKNPNFKLGTAVQDEVITSLGKLIGNASANA EVVNNC
 VPVLKQFRENLNQYAPDYVKGTAVNELIKGIEFDFSGAAYEKDVKTMPWYGKIDPFINE
 LKALGLYGNITSATEWASDVGIYYLSKFGLYSTNRNDIVQSLEKA VDMYKYGKIAFVAM
 ERITWDYDGIGSNGKKVDHDKFLDDAEKH YLPKTYTFDNGTFIIRAGDKVSEEKIKRLY
 WASREVKSQFHRVVGNDKALEVGNADDVLTMKIENSPEEYKFNTNINGVSTDNGGLYIE
 PRGTFYTYERTPQQSIFSLEELFRHEYTHYLQARYLVDGLWGQGPFEKNRLTWFEDEGT
 AEFFAGSTRTSGVLPRKSILGYLAKDKVDHRYSLKKTLNSGYDDSDWMFYNYGFAVAH
 YLYEKDMPTFIKMNKAILNTDVKS YDEIKKLSDDANKNTEYQNHQELADKYQGAGIPL
 VSDDYLDHGYKKASEVYSEISKAASLTNTSVTAEK SQYFNTFTLRGTYTGETSKGEFK
 DWDEMSKKLDGTLES LAKNSWSGYKTLTAYFTNYRVTS DNKVQYDVVFHGVLT DNAD
 ISNNKAPIAKVTGPSTGAVGRNIEFS GKDSKDEDGKIVSYDWDFGDGATSRGKNSVHAY
 KKAGTYNVTLKVTD DKGATATESFTIEIKNEDTTTPITKEMEPNDDIKEANGPIVEGVTV
 KGD LNGSDDADTFYFDVKEDGDVTIELPYSGSSNFTWL VYKEGDDQNHASGDKNNSK
 VGTFKSTKGRHYVFIYKHDSASNISYSLNIKGLGNEKLKEKENNDSSDKATVIPNFNTTM
 QGSL LGDDSRDYYSFEVKEEGEVNIELDKKDEF GVTWTLHPESNINDRITYGQVDGNKV
 SNKVKLRPGKY YLLVYKYSGSGNYELRVNK

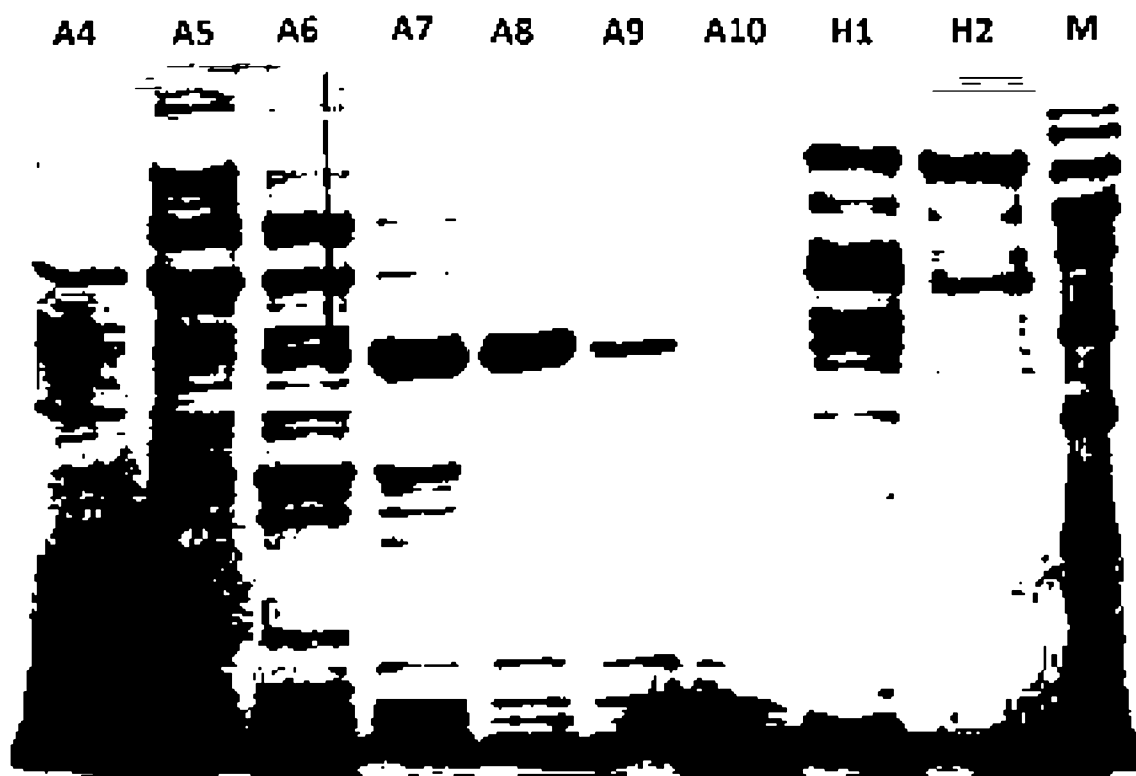
Obr. 2

MVQNESKRYTVSYLKTLNYYDLVDLLVKTEIENLPDLFQYSSDAKEFYGNKTRMSFIMD
 EIGRRAPQYTEIDHKGIPTLVEVVRAGFYLGPHNKELNEINKRSEKERVIPSILAIQKNPNF
 KLGTEVQDKIVSATGLLAGNETAPPEVYNNFTPIIQDCIKNIDRYALDDLKSKALFNVLA
 APTYDITEYLRATKEKPENTPWYGKIDGFNELKKLALYGKNDNNSWIDNGYHIAPLG
 KLHSNNKIGIETLTEVMKVYPYLSMQHILQSADQKRIYDSKDAEGNKIPLDKFKKEGKE
 KYCPKTYTFDDGKVIIKAGARVEEEKVKRLYWASKEVNSQFFRVYGIDKPLEEGNPDDI
 LTMVIYNSPEEYKLNSVLYGYDTNNGGMYIEPEGTFFTYEREAQUESTYTLLEELFRHEYTH
 YLQGRYAVPGQWGRTKLYDNDRLTWYTEEGGAELFAGSTRISGILPRKSIVSNIINTTRN
 NRYKLSDTVIISKYGASFEFYNYACMFMDYMYN'KDMGILNKLNDLAKNNDVDGYDNY
 IRDLSSNYALNDKYQDHMQERIDNYENLTPFVADDYLVRHAYKNPNEIYSEISEVAKI
 KDAKSEVKKSQYFSTFTLRGSYTGGAASKGKLEDQKAMNKFIDDSLKKLDYTSWSGYKT
 LTAYFTNYKVDSSNRVYTDVVFHGYLPNEGDSKNSLPYGKINGTYKGTEKEKIKFSSEG
 SFDPDGKIVSYEWDGFGDNKSNEENPEHSYDKVGTYYVTKLVTDGKGESSVSTTAEIK
 DLSENKLPVTYMHVPKSGALNQKVVTY'GKGTYPDGSAGYQWDFGDSDFSSEQNPS
 HVTYTKKGEYTVTLRVMDSSGQMSEKTMKIKITDPVYPIGTEKEPNNSKETASGPVPGIP
 VSGTIENISDQDYFYFDVITPGEVKIDINKI.GYGGATWV'VYDENNNVSYATDDGQNLIS
 GKFKADKPGRYYHILYMFNGSYMPYRINTEGSGVGRDPNSSSVDKLAAALEHHHHHHH

Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5