



HU000227387B1

(19) **HU****MAGYAR KÖZTÁRSASÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala(11) Lajstromszám: **227 387**(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 04 02271**(22) A bejelentés napja: **2002. 11. 20.**(40) A közzététel napja: **2005. 02. 28.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértékesítőben: **2011. 05. 30.**(51) Int. Cl.: **C07K 14/37** (2006.01)(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:
PCT/DK 02/00781(87) A nemzetközi közzétételi szám:
WO 03044049

(30) Elsőbbségi adatok: PA 2001 01732 2001. 11. 20. DK PA 2002 01243 2002. 08. 23. DK	(73) Jogosult(ak): Novozymes Adenium Biotech A/S, Bagsvaerd (DK)
(72) Feltaláló(k): Schnorr, Kirk Matthew, Holte (DK) Hansen, Mogens Trier, Soborg (DK) Mygind, Per Holse, Soborg (DK) Segura, Dorotea Raventos, Humlebaek (DK) Kristensen, Hans-Henrik Hogenhaug, Holte (DK)	(74) Képviselő: S.B.G. & K. Szabadalmi Ügyvivői Iroda, Budapest

(54) **Pseudoplectania nigrellá-ból származó antimikrobiális polipeptidek**

(57) Kivonat

A jelen találmány antimikrobiális aktivitással rendelkező polipeptidekkel és a polipeptideket kódoló nukleotid szekvenciával rendelkező polinukleotidokkal kapcsolatos. A jelen találmány nukleinsav szerkezetekkel, vektorokkal és a nukleinsav szerkezetek tartalmazó gazdasejtekkel, valamint a polipeptidek előállítására szolgáló eljárásokkal és azok használatával kapcsolatos.

700007/SZE

NYOMDAPÉLDÁNY**MEGADÁS ALAPJÁUL
SZOLGÁLÓ VÁLTOZAT****PSEUDOPLECTANIA NIGRELLÁ-BÓL SZÁRMAZÓ ANTIMIKROBIÁLIS
POLIPEPTIDEK**

A jelen találmány antimikrobiális aktivitással rendelkező polipeptidekkel és a polipeptideket kódoló nukleotid szekvenciával rendelkező polinukleotidokkal kapcsolatos. A jelen találmány nukleinsav szerkezetekkel, vektorokkal és a nukleinsav szerkezetek tartalmazó gazdasejtekkel, valamint a polipeptidek előállítására szolgáló eljárásokkal és azok használatával kapcsolatos.

A jelen találmány célja olyan polipeptidek biztosítása, amelyek antimikrobiális aktivitással rendelkeznek és olyan polinukleotid biztosítása, amelyek a polipeptideket kódolják.

Az alábbiakban összefoglaljuk a jelen találmányt.

Egy első aspektusban a jelen találmány antimikrobiális aktivitással rendelkező polipeptiddel kapcsolatos, amely az alábbiak valamelyike lehet:

(a) egy polipeptid, amely olyan aminosav szekvenciát tartalmaz, ami legalább 65%-os azonosságot mutat a 2. számú szekvencia 1-40. aminosavaival;

(b) egy polipeptid, amely olyan aminosav szekvenciát tartalmaz, ami legalább 65%-ban azonos a *Pseudoplectania nigrella* CBS 444.97 törzsben jelen levő nukleotid szekvencia antimikrobiális polipeptidjét kódoló része által kódolt polipeptiddel;

(c) egy polipeptid, amelyet egy olyan nukleotid szekvencia kódol, ami alacsony szigorúsági körülmények között hibridizálódik az alábbi polinukleotid próbák egyikével:

(i) az 1. számú szekvencia 166-285 nukleotidjainak komplementer szálával;

(ii) az 1. számú szekvencia 70-285 nukleotidjainak komplementer szálával; vagy

(iii) az 1. számú szekvencia 1-285 nukleotidjainak komplementer szálával; vagy

(d) az (a), (b) vagy (c) pontok egy fragmentje, amely antimikrobiális aktivitással rendelkezik.

Egy második aspektusban a jelen találmány olyan polinukleotidokkal kapcsolatos, amelyek a jelen találmány szerinti polipeptidet kódoló nukleotid szekvenciával rendelkeznek.

Egy harmadik aspektusban a jelen találmány olyan nukleinsav szerkezettel kapcsolatos, amely a jelen találmány polipeptidjét kódoló nukleotid szekvenciát tartalmaz, működőképesen kapcsolódva egy vagy több olyan szabályozó szekvenciához, amelyek egy megfelelő gazdában a polipeptid előállítását irányítják.

Egy negyedik aspektusban a jelen találmány egy a jelen találmány nukleinsav szerkezetét tartalmazó rekombináns expressziós vektorral kapcsolatos.

Egy ötödik aspektusban a jelen találmány egy a jelen találmány nukleinsav szerkezetét tartalmazó rekombináns gazdasejttel kapcsolatos.

Egy hatodik aspektusban a jelen találmány olyan eljárással kapcsolatos, ami a jelen találmány szerinti polipeptid előállítására szolgál, ahol az eljárás a következőkből áll:

- (a) egy a vad formájában a polipeptid előállítására képes törzset tenyésztünk a polipeptid előállítása céljából, és
- (b) a polipeptidet kinyerjük.

Egy hetedik aspektusban a jelen találmány olyan eljárással kapcsolatos, ami a jelen találmány szerinti polipeptid előállítására szolgál, ahol az eljárás a következőkből áll:

- (a) egy a jelen találmány szerinti rekombináns gazdasejtet tenyésztünk olyan körülmények között, ami a polipeptid előállításához vezet, és
- (b) a polipeptidet kinyerjük.

A jelen találmány egyéb aspektusai nyilvánvalóak lesznek az alábbi leírás és a csatolt igénypontok alapján.

A jelen találmányban az alábbi fogalmakat használjuk.

A jelen találmány részletes leírása előtt, meghatározzuk, hogy melyik fogalmon, mit értünk:

Lényegében tiszta polipeptid: A jelen szövegösszefüggésben a „lényegében tiszta polipeptid” olyan polipeptid készítményt jelent, amely maximum 10 tömeg% egyéb polipeptid anyagot tartalmaz, amellyel natív állapotában kapcsolatban áll (az egyéb polipeptidek alacsonyabb százalékaik előnyösebbek, például maximum 8 tömeg%, maximum 6 tömeg%, maximum 5 tömeg%, maximum 4 tömeg%, maximum 3 tömeg%, maximum 2 tömeg%, maximum 1 tömeg%, maximum 0,5

tömeg%). Így előnyös, ha a lényegében tiszta polipeptid legalább 92%-ban tiszta, azaz a polipeptid a készítményben jelen levő teljes polipeptid anyag legalább 92 tömeg%-át jelenti, és magasabb százalékok előnyösebbek, például a legalább 94%-os tisztaság, a legalább 95%-os tisztaság, a legalább 96%-os tisztaság, a legalább 97%-os tisztaság, a legalább 98%-os tisztaság, a legalább 99%-os tisztaság, és a legalább 99,5%-os tisztaság. A jelen találmányban leírt polipeptidek előnyösen lényegében tiszta formában vannak. Részletesebben, előnyös, ha a jelen találmányban leírt polipeptidek „alapjában véve tiszta formában” vannak jelen, azaz a polipeptid készítmény alapjában véve mentes az egyéb olyan polipeptid anyagtól, amivel a polipeptid natívan kapcsolódik. Ez megvalósítható úgy, például hogy a polipeptidet jól ismert rekombináns módszerekkel állítjuk elő. A jelen találmányban a „lényegében tiszta polipeptid” kifejezés szinonim az „izolált polipeptid” és az „izolált formában levő polipeptid” kifejezésekkel.

Antimikrobiális aktivitás: Az „antimikrobiális aktivitás” a jelen találmány szerinti használatban a mikrobiális sejtek elpusztításának képességét vagy szaporodásának gátló képességét jelöli. A jelen találmány szövegösszefüggésében az „antimikrobiális” kifejezés baktericid és/vagy bakteriosztatikus és/vagy fungicid és/vagy fungisztatikus hatást és/vagy virucid hatást jelent, ahol a „baktericid” kifejezésen azt kell érteni, hogy képes baktérium sejteket elpusztítani. A „bakteriosztatikus” kifejezés azt jelenti, hogy képes gátolni a bakteriális szaporodást, azaz gátolja a baktérium sejtek szaporodását. A „fungicid” kifejezésen azt értjük, hogy képes elpusztítani a gombasejteket. A „fungisztatikus” kifejezés azt jelenti, hogy képes gátolni a gomba szaporodását, azaz akadályozza a gomba sejtek szaporodását. A „virucid” kifejezésen azt értjük, hogy képes inaktiválni a vírusokat. A „mikrobiális sejt” kifejezés baktérium vagy gomba sejteket jelöl (az élesztőgombákat is ideértve).

A jelen találmány szövegösszefüggésében a „mikrobiális sejtek szaporodásának gátlása” kifejezés azt jelenti, hogy a sejtek nem szaporodó állapotban vannak, azaz azok nem képesek megsokszorozódni.

A jelen találmány céljához az antimikrobiális aktivitás meghatározható a Lehrer és munkatársai által leírt (Journal of Immunological Methods, Vol. 137(2) pp. 167-174, 1991) eljárások szerint.

Az antimikrobiális aktivitással rendelkező polipeptidek képesek lehetnek az *Escherichia coli* (DSM 1576) élő sejtszámát 1/100 részére csökkenteni 20°C hőmérsékleten végzett 30 percig tartó inkubálás után, az antimikrobiális aktivitású polipeptid 25 (tömeg/tömeg)%-os vizes oldatában, előnyösen 10 (tömeg/tömeg)%-os vizes oldatában, még előnyösebben 5 (tömeg/tömeg)%-os vizes oldatában, még előnyösebben 1 (tömeg/tömeg)%-os vizes oldatában, 0,5 (tömeg/tömeg)%-os vizes oldatában, és különösen előnyösen 0,1 (tömeg/tömeg)%-os vizes oldatában.

Az antimikrobiális aktivitással rendelkező polipeptidek képesek lehetnek gátolni az *Escherichia coli* (DSM 1576) szaporodását 25°C hőmérsékleten 24 óráig tartó inkubálás alatt mikrobiális szaporító tápközegen, ha 1000 ppm mennyiségben adjuk hozzá a tápközeghez, előnyösen ha 500 ppm koncentrációban adjuk a tápközeghez, még előnyösebben ha 250 ppm koncentrációban adjuk a tápközeghez, még előnyösebben, ha 100 ppm koncentrációban adjuk a tápközeghez, még előnyösebben, ha 50 ppm koncentrációban adjuk a tápközeghez, és különösen előnyösen, ha 25 ppm koncentrációban adjuk a tápközeghez.

Az antimikrobiális aktivitással rendelkező polipeptidek képesek lehetnek a *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) élő sejtszámát 1/100 részére csökkenteni 20°C hőmérsékleten végzett 30 percig tartó inkubálás után, az antimikrobiális aktivitású polipeptid 25 (tömeg/tömeg)%-os vizes oldatában, előnyösen 10 (tömeg/tömeg)%-os vizes oldatában, még

előnyösebben 5 (tömeg/tömeg)%-os vizes oldatában, még előnyösebben 1 (tömeg/tömeg)%-os vizes oldatában, 0,5 (tömeg/tömeg)%-os vizes oldatában, és különösen előnyösen 0,1 (tömeg/tömeg)%-os vizes oldatában.

Az antimikrobiális aktivitással rendelkező polipeptidek képesek gátolni a *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) szaporodását 25°C hőmérsékleten 24 óráig tartó inkubálás alatt mikrobiális szaporító tápközegen, ha 1000 ppm mennyiségben adjuk hozzá a tápközeghez, előnyösen ha 500 ppm koncentrációban adjuk a tápközeghez, még előnyösebben ha 250 ppm koncentrációban adjuk a tápközeghez, még előnyösebben, ha 100 ppm koncentrációban adjuk a tápközeghez, még előnyösebben, ha 50 ppm koncentrációban adjuk a tápközeghez, és különösen előnyösen, ha 25 ppm koncentrációban adjuk a tápközeghez.

A jelen találmány polipeptidjei a 2. számú szekvencia 1-40 aminosavaiban bemutatott aminosav szekvenciát tartalmazó polipeptid antimikrobiális aktivitásának előnyösen legalább 20%-ával rendelkeznek. Egy különösen előnyös kiviteli alakban a polipeptidek a 2. számú szekvencia 1-40 aminosavaiban bemutatott aminosav szekvenciát tartalmazó polipeptid antimikrobiális aktivitásának legalább 40%-ával, például legalább 50%-ával, előnyösen legalább 60%-ával, például legalább 70%-ával, még előnyösebben legalább 80%-ával, például legalább 90%-ával, még előnyösebben legalább 95%-ával, például körülbelül vagy legalább 100%-ával rendelkeznek.

Azonosság: A jelen találmány szövegösszefüggésében, a két aminosav szekvencia vagy két nukleotid szekvencia közötti homológiát az „azonosság” paraméterével írjuk le.

A jelen találmány céljaihoz a két aminosav szekvencia közötti azonosságot a 2.0-ás FASTA program csomagban található FASTA programmal (lásd W.R. Pearson and D.J. Lipman, 1988, „Improved Tools for Biological Sequence Analysis”, PNAS 85:2444-2448; és W.R.

Pearson, 1990, „Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA”, Methods in Enzymology, 183:63-98) határozzuk meg. A használt értékelő mátrix a BLOSUM50, a „gap penalty” -12, és a „gap extension penalty” -2.

A két nukleotid szekvencia közötti azonosság mértékét ugyanezt a fent leírt algoritmust és software csomagot használva határozzuk meg. A használt értékelő mátrix az azonossági mátrix, a „gap penalty” -16, és a „gap extension penalty” -4.

Fragment: A jelen találmány szerinti használatban a 2. számú szekvencia „fragmentje” kifejezés olyan polipeptidet jelent, ahol az ezen aminosav szekvencia amino- és/vagy karboxi-terminusából delécióval egy vagy több aminosavat eltávolítottunk.

Allél variáns: A jelen találmány szövegösszefüggésében az „allél variáns” kifejezés ugyanazon kromoszóma lokuszt elfoglaló gén bármely két vagy több alternatív formáját jelöli. Az allél variáció természetes úton mutáció révén következik be, és populációkon belüli polimorfizmushoz vezethet. A génmutáció lehet csendes (nincs változás a kódolt polipeptidben), vagy kódolhat megváltozott aminosav szekvenciával rendelkező polipeptideket. Egy polipeptid allél variánsa egy gén allél variánsa által kódolt polipeptidet jelent.

Lényegében tiszta polinukleotid: A „lényegében tiszta polinukleotid” kifejezés a jelen találmány szerinti használatban olyan polinukleotid készítményre utal, ahol a polinukleotidot eltávolították természetes genetikai környezetéből, és így mentes az egyéb külső vagy nem kívánatos kódoló szekvenciáktól, és olyan formában található, amely megfelelő a genetikailag módosított protein termelési rendszeren belüli használathoz. Így a lényegében tiszta polinukleotid legfeljebb 10 tömeg% olyan egyéb polinukleotid anyagot tartalmaz, amely természetesen hozzákapcsolódik (az egyéb polinukleotid anyagok kisebb %-a előnyösebb, például legfeljebb 8 tömeg%-a, legfeljebb 6 tömeg%-a,

legfeljebb 5 tömeg%-a, legfeljebb 4 tömeg%-a, legfeljebb 3 tömeg%-a, legfeljebb 2 tömeg%-a, legfeljebb 1 tömeg%-a, legfeljebb 0,5 tömeg%-a). A lényegében tiszta polinukleotid azonban magába foglalhat természetesen előforduló 5' és 3' nem-transzlált régiókat, például promótereket és terminátorokat. Előnyös, ha a lényegében tiszta polinukleotid legalább 92%-ban tiszta, azaz a polinukleotid a készítményben levő polinukleotid anyag legalább 92 tömeg%-át tartalmazza, és a még nagyobb %-ok előnyösek, mint például a legalább 94%-os tisztaság, a legalább 95%-os tisztaság, a legalább 96%-os tisztaság, a legalább 97%-os tisztaság, a legalább 98%-os tisztaság, a legalább 99%-os tisztaság, és a legalább 99,5%-os tisztaság. Az itt leírt polinukleotidok előnyösen lényegében tiszta formában vannak. Főként az előnyös, ha az itt leírt polinukleotidok „lényegében tiszta formában” vannak, azaz a polinukleotid készítmény lényegében az egyéb olyan polinukleotid anyagoktól mentes, amelyekkel a természetben összekapcsolódik. A jelen találmányban a „lényegében tiszta polinukleotid” kifejezés szinonimja az „izolált polinukleotid” és az „izolált formában levő polinukleotid” kifejezéseknek.

Módosítás(ok): A jelen találmány szövegösszefüggésében a „módosítás(ok)” kifejezés a polipeptid bármilyen kémiai módosítását magába foglalja, amely a 2. számú szekvencia 1-40 aminosavaként bemutatott aminosav szekvenciát tartalmazza, valamint a polipeptidet kódoló DNS genetikai manipulációját. A módosítás(ok) lehet(nek) az aminosav lánc(ok) helyettesítése, szubsztitúciója, delécioja és/vagy inszercioja a kérdéses aminosavban vagy aminosavnál.

Mesterséges variáns: A jelen találmány szerinti használatban a „mesterséges variáns” kifejezés olyan antimikrobiális aktivitással rendelkező polipeptidet jelent, amelyet egy az 1. számú szekvenciához képest módosított gént expresszáló organizmus termel. A módosított gént, amelyből az említett variáns létrejön, ha a megfelelő gazdában

expresszálódik, emberi beavatkozás révén nyerjük ki az 1. számú szekvenciában leírt nukleotid szekvencia módosításával.

cDNS: A „cDNS” kifejezés a jelen találmány szövegösszefüggésében olyan DNS molekulát jelöl, amit egy eukarióta sejtől származó érett, összeillesztett mRNS molekula reverz transzkripciójával állítunk elő. A cDNS-ből hiányoznak azok az intron szekvenciák, amelyek általában jelen vannak a megfelelő genom DNS-ben. A kezdeti, elsődleges RNS transzkript az mRNS prekursora, és egy sor feldolgozási eseményen esik át érett, összeillesztett mRNS-ként való megjelenése előtt. Ezen események közé tartozik az intron szekvenciák illesztésnek nevezett eljárással történő eltávolítása. Ha a cDNS mRNS-ből származik, akkor abból hiányoznak az intron szekvenciák.

Nukleinsav szerkezet: A jelen találmány szerinti használatban a „nukleinsav szerkezet” kifejezés olyan nukleinsav - akár egyszálú, akár kétszálú – molekulát jelöl, amelyet egy természetesen előforduló génből izoláltak, vagy amelyet úgy módosítottak, hogy nukleinsavak szegmentjeit tartalmazza oly módon, ahogy az egyébként nem létezik a természetben. A nukleinsav szerkezet kifejezés szinonim az „expressziós kazetta” kifejezéssel, ha a nukleinsav szerkezet a jelen találmány kódoló szekvenciájának expressziójához szükséges szabályozó szekvenciákat tartalmaz.

Szabályozó szekvencia: A „szabályozó szekvencia” kifejezés a jelen találmány szerinti használatban magába foglalja az összes olyan komponenst, amire szükség van, vagy ami előnyös a jelen találmány szerinti polipeptid expressziójához. Az egyes szabályozó szekvenciák lehetnek natívak vagy idegenek a polipeptidet kódoló nukleotid szekvencia számára. Az ilyen szabályozó szekvenciák közé tartoznak az ezekre való korlátozás nélkül a vezető szekvencia, a poliadenilációs szekvencia, a propeptid szekvencia, a promóter, a jel peptid szekvencia, és a transzkripció terminátor szekvencia. A szabályozó szekvencia egy

promótert és egy transzkripció és transzláció stop jelet minimum magába kell foglaljon. A szabályozó szekvenciák biztosíthatók kötőkkel abból a célból, hogy specifikus restrikciós helyeket biztosítsunk a szabályozó szekvenciák egy polipeptidet kódoló nukleotid szekvencia kódoló régiójához való ligálásának elősegítéséhez.

Működőképesen kapcsolt: A „működőképesen kapcsolt” kifejezést olyan konfigurációként határozzuk meg, ahol a szabályozó szekvencia megfelelő módon olyan pozícióban található a DNS szekvencia kódoló szekvenciájához képest, hogy a szabályozó szekvencia irányítja a polipeptid expresszióját.

Kódoló szekvencia: A jelen találmány szerinti használatban a „kódoló szekvencia” olyan nukleotid szekvenciát takar, ami közvetlenül specifikálja protein termékének aminosav szekvenciáját. A kódoló szekvencia határait általában egy nyílt leolvasási keret határozza meg, ami általában az ATG start kódonnal kezdődik. A kódoló szekvencia tipikusan DNS, cDNS és rekombináns nukleotid szekvenciákat foglal magába.

Expresszió: A jelen találmány szövegösszefüggésében az „expresszió” kifejezés a polipeptid létrehozásának bármilyen lépését magába foglalja, ideértve az ezekre való korlátozás nélkül a transzkripciót, a post-transzkripció módosítást, a transzlációt, a post-transzlációs módosítást és a szekréciót.

Expressziós vektor: A jelen szövegösszefüggésben az „expressziós vektor” kifejezés egy lineáris vagy cirkuláris DNS molekulát takar, ami egy a jelen találmány szerinti polipeptidet kódoló szegmentet tartalmaz, és ami működőképesen kapcsolódik további olyan szegmensekhez, amik transzkripcióját biztosítják.

Gazdasejt: A gazdasejt kifejezés a jelen találmány szerinti használatban bármilyen sejttípust magába foglal, ami fogékony a nukleinsav szerkezettel végzett transzformációra.

A „polinukleotid próba”, a „hibridizáció” kifejezéseket valamint a különböző szigorúsági körülményeket az „Antimikrobiális aktivitással rendelkező polipeptidek” című részben írjuk le.

Az alábbiakban részletesen bemutatjuk a jelen találmányt.

Antimikrobiális aktivitással rendelkező polipeptidek

Egy első kiviteli alakban a jelen találmány antimikrobiális aktivitással rendelkező polipeptidekkel kapcsolatos, ahol a polipeptidek egy olyan aminosav szekvenciát tartalmaznak, vagy előnyösen olyan aminosav szekvenciából állnak, amely a 2. számú szekvencia 1-40 aminosavaival (azaz az érett polipeptiddel) legalább 65%-os, előnyösen legalább 70%-os, például legalább 75%-os, még előnyösebben legalább 80%-os, például legalább 85%-os, még előnyösebben legalább 90%-os, még előnyösebben legalább 95%-os, például legalább 96%-os, mint például 97%-os, és még előnyösebben legalább 98%-os, például legalább 99%-os mértékű azonosságot mutat (a későbbiekben „homológ polipeptidként” utalunk rá). Egy érdekes kiviteli alakban az aminosav szekvencia legfeljebb 10 aminosavban (például 10 aminosavban), különösen előnyös esetben legfeljebb 5 aminosavban (például 5 aminosavban), például legfeljebb 4 aminosavban (például 4 aminosavban), például legfeljebb 3 aminosavban (például 3 aminosavban) tér el a 2. számú szekvencia 1-40 aminosavaitól. Egy különösen előnyös kiviteli alakban az aminosav szekvencia legfeljebb 2 aminosavban (például 2 aminosavban), például 1 aminosavban tér el a 2. számú szekvencia 1-40 aminosavaitól.

Előnyösen a jelen találmány polipeptidjei tartalmazzák a 2. számú szekvencia aminosav szekvenciáját, ennek egy allél variánsát, vagy antimikrobiális aktivitással rendelkező fragmentjét. Egy másik előnyös kiviteli alakban a jelen találmány polipeptidje magába foglalja a 2. számú

szekvencia 1-40 aminosavaiból. Egy további előnyös kiviteli alakban a polipeptid a 2. számú szekvencia 1-40 aminosavaiból áll.

A jelen találmány polipeptidjét alkotó aminosavak egymástól függetlenül lehetnek D vagy L formájú aminosavak.

A jelen találmány polipeptidje lehet egy antimikrobiális aktivitással rendelkező vad típusú polipeptid, amelyet egy természetes forrásból azonosítottunk és izoláltunk. Az ilyen vad típusú polipeptidek specifikusan szkrinálhatók a tudomány e területén ismert standard technikákkal. Ezenkívül, a jelen találmány polipeptidje előállítható DNS keverési technikával, mint amit például J.E. Ness és munkatársai írtak le (Nature Biotechnology 17:893-896 (1999)). Sőt, a jelen találmány polipeptidje lehet egy mesterséges variáns, amely olyan aminosav szekvenciát tartalmaz, vagy amely előnyösen olyan szekvenciából áll, ami a 2. számú szekvencia 1-40 aminosavaival képest legalább egy helyettesítést, deléciót és/vagy inszerciót tartalmaz. Az ilyen mesterséges variánsok megszerkeszthetők a tudomány e területén ismert standard technikákkal, például a 2. számú szekvencia 1-40 aminosavaiként bemutatott aminosav szekvenciát tartalmazó polipeptid hely irányított/random mutagenézisével. A jelen találmány egy kiviteli alakjában az aminosav változások (a mesterséges variánsokban, valamint a vad típusú polipeptidekben) kis jelentőségűek, azaz olyan konzervatív aminosav szubsztitúciók, amelyek nincsenek szignifikáns hatással a protein feltekeredésére és/vagy aktivitására; kis deléciók, tipikusan körülbelül 1-30 aminosavból állók; kis amino- vagy karboxi-terminális extenziók, például egy amino-terminális metionin maradék; egy kis, körülbelül 20-25 maradékból álló, kötő polipeptid, vagy egy kis extenzió, amely elősegíti a tisztítást a nettó töltés vagy egyéb funkció, például egy polihisztidin terület, egy antigén epitóp vagy egy kötő domén megváltoztatása révén.

A konzervatív szubsztitúciók példái a bázikus aminosavak (arginin, lizin, hisztidin), a savas aminosavak (glutaminsav, és aszparaginsav), a

poláros aminosavak (glutamin és aszparagin), a hidrofób aminosavak (leucin, izoleucin, valin és metionin), aromás aminosavak (fenilalanin, triptofán, tirozin) és kis aminosavak (glicin, alanin, szerin, threonin) körében történnek. Az olyan aminosav szubsztitúciók, amelyek általában nem változtatják meg a specifikus aktivitást, ismertek a tudomány e területén, és például H. Neurath és R.L. Hill írták le (1979, *The Proteins* c. könyvben, Academic Press, New York). A leggyakrabban előforduló cserék a következők: Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu és Asp/Gly, valamint ezek fordítottjai.

A jelen találmány egy érdekes kiviteli alakjában az aminosav változások olyan természetűek, hogy a polipeptidek fiziko-kémiai tulajdonságai megváltoznak. Például, olyan aminosav változtatás végezhető el, ami javítja a polipeptid hőstabilitását, ami megváltoztatja a szubsztrát specifikitást, ami megváltoztatja a pH optimumot és más hasonló tulajdonságokat.

Előnyösen, a 2. számú szekvencia 1-40 aminosavaihoz képest az ilyen szubsztitúciók, deléciók és/vagy inszerciók száma legfeljebb 10, például legfeljebb 9, például legfeljebb 8, még előnyösebben legfeljebb 7, például legfeljebb 6, például legfeljebb 5, legelőnyösebben legfeljebb 4, például legfeljebb 3, például legfeljebb 2, speciálisan legfeljebb 1.

A jelen bejelentés feltalálói izoláltak egy antimikrobiális aktivitással rendelkező polipeptidet kódoló gént a *Pseudoplectania nigrella*-ból. A génnek otthont adó *Pseudoplectania nigrella* törzset a Szabadalmi Céllal Deponált Mikroorganizmus Letétek Nemzetközi Elismerésére vonatkozó Budapesti Szerződés szerint 1997 január 28.-án deponáltuk a Centraalbureau Voor Schimmelcultures törzsgyűjteménynél (CBS)(Uppsalalaan 8, 3584 CT Utrecht, The Netherlands (vagy P.O.Box 85167, 3508 AD Utrecht, The Netherlands), ahol a CBS 444.97 katalógusszámot kapta.

Így egy második kiviteli alakban, a jelen találmány olyan polipeptidekkel kapcsolatos, amelyek előnyösen olyan aminosav szekvenciát tartalmaznak (előnyösen abból állnak), ami legalább 65%-ban azonos azzal az antimikrobiális polipeptidet kódoló nukleotid szekvencia résszel, ami a *Pseudoplectania nigrella* CBS 444.97 törzsben van jelen. A jelen találmány egy érdekes kiviteli alakjában a polipeptid olyan aminosav szekvenciát tartalmaz/előnyösen olyan szekvenciából áll, amely legalább 70%-ban, például legalább 75%-ban, előnyösen legalább 80%-ban, például 85%-ban, még előnyösebben legalább 90%-ban, még előnyösebben legalább 95%-ban, például 96%-ban, például legalább 97%-ban, és még előnyösebben legalább 98%-ban, például legalább 99%-ban azonos azzal az antimikrobiális polipeptidet kódoló nukleotid szekvencia résszel, ami a *Pseudoplectania nigrella* CBS 444.97 törzsben van jelen (a későbbiekben „homológ polipeptidekként” utalunk rájuk). Egy érdekes kiviteli alakban az aminosav szekvencia legfeljebb 10 aminosavban (például 10 aminosavban), speciálisan legfeljebb 5 aminosavban (például 5 aminosavban), például legfeljebb 4 aminosavban (például 4 aminosavban), például legfeljebb 3 aminosavban (például 3 aminosavban) tér el attól az antimikrobiális polipeptidet kódoló nukleotid szekvencia résztől, ami a *Pseudoplectania nigrella* CBS 444.97 törzsben van jelen. Egy különösen érdekes kiviteli alakban az aminosav szekvencia legfeljebb 2 aminosavban (például 2 aminosavban), például 1 aminosavban tér el a a *Pseudoplectania nigrella* CBS 444.97 törzsben jelen levő nukleotid szekvencia antimikrobiális polipeptidet kódoló részének aminosav szekvenciájától.

Előnyösen, a jelen találmány polipeptidjei magukba foglalják a *Pseudoplectania nigrella* CBS 444.97 törzsben jelen levő nukleotid szekvencia antimikrobiális polipeptidet kódoló részének aminosav szekvenciáját. Egy másik előnyös kiviteli alakban a jelen találmány polipeptidje a *Pseudoplectania nigrella* CBS 444.97 törzsben jelen levő

nukleotid szekvencia antimikrobiális polipeptidet kódoló része által kódolt polipeptid aminosav szekvenciájából áll.

A fentiekben leírtakhoz hasonlóan, a jelen találmány polipeptidje lehet egy olyan mesterséges variáns, ami előnyösen egy olyan aminosav szekvenciából áll, ami legalább egy aminosav szubsztitúciót, deléciót és/vagy inszerciót tartalmaz a *Pseudoplectania nigrella* CBS 444.97 törzsben jelen levő nukleotid szekvencia antimikrobiális polipeptidet kódoló része által kódolt aminosav szekvenciához képest.

Egy harmadik kiviteli alakban a jelen találmány antimikrobiális aktivitással rendelkező polipeptidekkel kapcsolatos, amelyeket egy polinukleotid próbával nagyon alacsony szigorúsági körülmények között, előnyösen alacsony szigorúsági körülmények között, még előnyösebben közepes szigorúsági körülmények között, még előnyösebben közepes-erős szigorúsági körülmények között, és még előnyösebben szigorú körülmények között, és még előnyösebben nagyon szigorú körülmények között hibridizálódó nukleotid szekvenciák kódolnak. Az említett polinukleotid próba lehet (i) az 1. számú szekvencia 166-285 nukleotidjainak komplementer szála; (ii) az 1. számú szekvencia 70-285 nukleotidjait tartalmazó cDNS szekvencia komplementer szála; és (iii) az 1. számú szekvencia 1-285 nukleotidjainak komplementer szála (J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor, New York).

Az 1.számú nukleotid szekvencia, vagy ennek egy alszekvenciája, valamint a 2. számú aminosav szekvencia vagy ennek egy fragmentje felhasználható egy polinukleotid próba megtervezéséhez, hogy antimikrobiális aktivitással rendelkező polipeptideket kódoló DNS-t azonosítsunk és klónozzunk a különböző nemzetségekből vagy fajokból származó törzsekből a tudomány e területén insert módszereket használva. Nevezetesen, az ilyen próbák felhasználhatók a kérdéses nemzetség vagy faj genom vagy cDNS-ével való hibridizációhoz a

standard southern lenyomat eljárást követően, a bennük levő megfelelő gén azonosítása és izolálása céljából. Az ilyen próbák jelentősen rövidebbek lehetnek, mint a teljes szekvencia, azonban legalább 15, előnyösen legalább 25, még előnyösebben legalább 35 nukleotid hosszúságúak, lehetnek akár 70 nukleotid hosszúságúak. Azonban, előnyös, ha a polinukleotid próba legalább 100 nukleotid hosszúságú. Például, a polinukleotid próba lehet legalább 200 nukleotid hosszúságú, legalább 300 nukleotid hosszúságú, legalább 400 nukleotid hosszúságú, vagy legalább 500 nukleotid hosszúságú. Akár ennél hosszabb próbák is használhatók, például olyan polinukleotid próbák, amik legalább 600 nukleotid hosszúságúak, legalább 700 nukleotid hosszúságúak, legalább 800 nukleotid hosszúságúak, vagy legalább 900 nukleotid hosszúságúak. DNS és RNS próbák is felhasználhatók. A próbákat tipikusan jelöljük a megfelelő gének detektálásához (például ^{32}P -vel, ^3H -val, ^{35}S -sel, biotinnal vagy avidinnel).

Így az egyéb ilyen szervezetekből előállított genom DNS vagy cDNS könyvtár szkrínélhető olyan DNS-re, amely hibridizálódik a fent leírt próbákkal, és amely antimikrobiális aktivitással rendelkező polipeptidet kódol. Az egyéb ilyen szervezetekből származó genom vagy egyéb DNS agaróz vagy poliakrilamid gélelektroforézissel, vagy egyéb szeparációs technikával szeparálható. A könyvtárakból származó DNS vagy a szeparált DNS transzferálható, és immobilizálható nitrocellulózon vagy egyéb megfelelő hordozó anyagon. Egy az 1. számú szekvenciával homológ klón vagy DNS azonosításához az immobilizált DNS-t tartalmazó hordozó anyagot használjuk southern lenyomat vizsgálathoz.

A jelen találmány céljaihoz, a hibridizáció azt jelzi, hogy a nukleotid szekvencia hibridizálódik egy jelölt polinukleotid próbával, amely nagyon alacsony – nagyon magas szigorúsági körülmények között hibridizálódik az 1. számú szekvenciában bemutatott nukleotid szekvenciával. Azok a molekulák, amelyekhez a polinukleotid próba ilyen körülmények között

hibridizálódik, detektálhatók röntgen filmmel vagy bármely egyéb, a tudomány e területén ismert eljárással. Ha a „polinukleotid próba” kifejezést bármikor a jelen szövegösszefüggésben használjuk, akkor ezen azt kell érteni, hogy az ilyen próba legalább 15 nukleotidot tartalmaz.

Egy érdekes kiviteli alakban a polinukleotid próba az 1. számú szekvencia 166-285 nukleotidjainak, a 70-285 nukleotidjainak vagy az 1-285 nukleotidjainak komplementer szálát jelenti.

Egy megint más érdekes kiviteli alakban a polinukleotid próba a 2. számú szekvencia polipeptidjét kódoló nukleotid szekvencia komplementer szálát jelenti. Egy további érdekes kiviteli alakban a polinukleotid próba az 1. számú szekvencia komplementer szálát jelenti. Egy megint más érdekes kiviteli alakban a polinukleotid próba az 1. számú szekvencia érett polipeptid kódoló régiójának komplementer szálát jelenti. Egy megint más érdekes kiviteli alakban a polinukleotid próba a *Pseudoplectania nigrella* CBS 444.97 törzsben jelen levő antimikrobiális polipeptidet kódoló régió komplementer szálát jelenti. Egy megint más kiviteli alakban a polinukleotid próba a *Pseudoplectania nigrella* CBS 444.97 törzsben jelen levő érett antimikrobiális polipeptidet kódoló régió komplementer szálát jelenti.

A legalább 100 nukleotid hosszúságú, hosszú próbákhoz nagyon alacsony – nagyon magas szigorúsági körülményeket határoznak meg előhibridizációs és hibridizációs körülményeként, 42°C hőmérsékleten, 5X SSPE, 1,0% SDS, 5X Denhardt-féle oldat, 100 µg/ml feldarabolt, denaturált lazac sperma DNS elegyében, amit standard southern lenyomat eljárás követ. Előnyösen, a legalább 100 nukleotidból álló hosszú próbák nem tartalmaznak 1000 nukleotidnál többet. A legalább 100 nukleotidból álló hosszú próbákhoz a hordozó anyagot végül 3-szor mossuk egy-egy alkalommal 15 percig 2 x SSC-t, 0,1% SDS-t használva 42°C hőmérsékleten (nagyon alacsony szigorúsági körülmény), előnyösen 3-szor mossuk egy-egy alkalommal 15 percig 0,5 x SSC-t,

0,1% SDS-t használva 42°C hőmérsékleten (alacsony szigorúsági körülmény), még előnyösebben 3-szor mossuk egy-egy alkalommal 15 percig 0,2 x SSC-t, 0,1% SDS-t használva 42°C hőmérsékleten (közepes szigorúsági körülmény), még előnyösebben 3-szor mossuk egy-egy alkalommal 15 percig 0,2 x SSC-t, 0,1% SDS-t használva 55°C hőmérsékleten (közepes-erős szigorúsági körülmény), legelőnyösebben 3-szor mossuk egy-egy alkalommal 15 percig 0,1SSC-t, 0,1% SDS-t használva 60°C hőmérsékleten (szigorú körülmény), és főként 3-szor mossuk egy-egy alkalommal 15 percig 0,1 x SSC-t, 0,1 SDS-t használva 68°C hőmérsékleten (nagyon szigorú körülmény).

Bár nem különösebben előnyös, úgy tartjuk, hogy a rövidebb próbák, például a körülbelül 15-99 nukleotid hosszúságú próbák, mint a körülbelül 15-70 nukleotid hosszúságú próbák, szintén felhasználhatók. Az ilyen rövid próbákhoz a szigorúsági körülményeket a következőkben határozzuk meg: előhibridizáció, hibridizáció és hibridizáció utáni mosás a számított T_m értéknél 5-10°C-kal alacsonyabb hőmérsékleten, a számítást Bolton and McCarthy szerint végezzük el (1962, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 48:1390) ml mennyiségenként 0,9 M NaCl, 0,09 M Tris-HCl, pH 7,6, 6 mM EDTA, 0,5% NP-40, 1x Denhardt-féle oldat, 1 mM nátrium-pirofoszfát, 1 mM nátrium-monobázisos foszfát, 0,1 mM ATP és 0,2 mg élesztőgomba RNS elegyében a standard southern lenyomat eljárást követően.

A rövid próbákhoz, amelyek körülbelül 15-99 nukleotid hosszúságúak, a hordozó anyagot egyszer mossuk 6x SSC+ 0,1% SDS-ben 15 percig, majd kétszer 15 percig 6x SSC-ben a számított T_m értéknél 5-10°C-kal alacsonyabb hőmérsékleten.

N-terminális extenzió

Az N-terminális extenzió megfelelő módon állhat 1-50 aminosavból, előnyösen 2-20 aminosavból, különösen 3-15 aminosavból. Egy kivételi

alakban az N-terminális peptid extenzió nem tartalmaz Arg-ot (R). Egy másik kiviteli alakban az N-terminális extenzió egy kex2-öt vagy kex2-szerű hasítási helyet tartalmaz, ahogy azt a későbbiekben meghatározzuk. Egy előnyös kiviteli alakban az N-terminális extenzió egy peptid, amely legalább 2 Glu (E) és/vagy Asp (D) aminosav maradékot tartalmaz, mint például az az N-terminális extenzió, amely az alábbi szekvenciák egyikéből áll:

EAE EE, DE, DD.

Kex2 helyek

A kex2 helyek (lásd például Methods in Enzymology Vol. 185, ed. D. Goeddel, Academic Press Inc., 1990, San Diego, CA, „Gene Expression Technology”) és a kex2-szerű helyek dibázisos felismerési helyek (azaz hasítási helyek), amelyek a pro-peptid kódoló régió és néhány protein érett régiója között található.

A kex2 hely vagy a kex2-szerű hely inszerciójáról bizonyos esetekben kimutatták, hogy javítják a helyes endopeptidáz feldolgozást a pro-peptid hasítási helynél, ami fokozott protein szekrécións szinteket eredményez.

A jelen találmány szövegösszefüggésében egy kex2 vagy egy kex2-szerű hely azt eredményezi, hogy lehetővé válik egy bizonyos pozícióban az N-terminális extenzió hasítása, ami olyan antimikrobiális aktivitással rendelkező polipeptidet eredményez, ami hosszabb a 2. számú szekvencia 1-40 aminosavaként bemutatott érett polipeptidnél.

Az antimikrobiális aktivitással rendelkező polipeptidek forrása

A jelen találmány polipeptidje kinyerhető bármilyen nemzetségbe tartozó mikroorganizmusból. A jelen találmány céljaihoz, a „kinyerhető valamiből” kifejezés a jelen találmány szerinti használatban azt jelenti, hogy a nukleotid szekvencia által kódolt polipeptidet olyan sejt termeli,

amelyben a nukleotid szekvencia természetes módon jelen van, vagy amelybe a nukleotid szekvenciát inszertálták. Egy előnyös kiviteli alakban a polipeptid extracellulárisan szekretálódik.

A jelen találmány polipeptidje lehet bakteriális polipeptid. Például, a polipeptid lehet egy gram pozitív bakteriális polipeptid, például egy *Bacillus* polipeptid, például egy *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus strearothermophilus*, *Bacillus subtilis* vagy *Bacillus thuringiensis* polipeptid; vagy egy *Streptomyces* polipeptid, például egy *Streptomyces lividans* vagy *Streptomyces murinus* polipeptid; vagy egy gram negatív bakteriális polipeptid, például egy *E. coli* vagy egy *Pseudomonas* sp. polipeptid.

A jelen találmány polipeptidje lehet gomba polipeptid is, és még előnyösebben egy élesztőgomba polipeptid, például egy *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* vagy *Yarrowia* polipeptid, vagy még előnyösebben egy fonalasgomba polipeptid, például egy *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastrix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Piromyces*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium* vagy *Trichoderma* polipeptid.

Egy érdekes kiviteli alakban a polipeptid egy *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyverii*, *Saccharomyces norbensis* vagy *Saccharomyces oviformis* polipeptid.

Egy megint másik, érdekes kiviteli alakban a polipeptid egy *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium*

crookwellense, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* vagy *Trichoderma viride* polipeptid.

Egy előnyös kiviteli alakban a polipeptid egy *Pseudoplectania nigrella* polipeptid, még előnyösebben egy *Pseudoplectania nigrella* CBS 444.97 polipeptid, például a 2. számú szekvencia 1-40 aminosavaiból álló polipeptid.

Érthető, hogy az előbb említett fajok esetében a jelen találmány magába foglalja a perfekt és az imperfekt alakokat is, valamint egyéb taxonómiai megfelelőket, például az anamorfokat, a jelenleg ismert fajnévtől függetlenül. A tudomány e területén képzett szakember könnyen felismeri a megfelelő ekvivalensek azonosságát.

Ezen fajok törzsei könnyen beszerezhetők számos törzsgyűjteményből, ilyenek például az American Type Culture Collection (ATCC), a Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM), a Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) és az Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

Ezenkívül, az ilyen polipeptidek azonosíthatók és beszerezhetők egyéb forrásokból, ideértve a természetből (például talajból, komposztból, vízből stb.) izolálható mikroorganizmusokat, a fent említett próbákat használva. A természetes élőhelyről származó mikroorganizmusok izolálásához való technikák jól ismertek a tudomány e területén. A

nukleotid szekvencia ezután származtatható az egyéb mikroorganizmus genom vagy cDNS könyvtárának hasonló szkrínelésével. Ha egy polipeptidet kódoló nukleotid szekvenciát detektáltunk a próbákkal, a szekvencia izolálható vagy klónozható a tudomány e területén jártas szakember számára ismert technikák felhasználásával (lásd például Sambrook et al., 1989, *supra*).

A jelen találmány nukleotid szekvenciái által kódolt polipeptidek magukba foglalnak fuzionált polipeptideket, vagy hasítható fúziós polipeptideket is, amelyekben egy másik polipeptid fuzionált a polipeptid vagy egy fragmentje N-terminusához vagy C-terminusához. Fuzionált polipeptid jön létre, ha egy másik polipeptidet kódoló nukleotid szekvenciát (vagy ennek egy részét) fuzionáltatunk a jelen találmány egy nukleotid szekvenciájához (vagy ennek egy részéhez). A fúziós polipeptidek létrehozására szolgáló technikák ismertek a tudomány e területén, és ide tartozik a polipeptideket kódoló kódolószekvencia oly módon történő ligálása, hogy ezek kereten belül vannak, és a fuzionált polipeptid expressziója ugyanazon promóter(ek) és terminátor szabályozása alatt áll.

Polinukleotidok és nukleotid szekvenciák

A jelen találmány kapcsolatos olyan polinukleotidokkal is, amelyek a jelen találmány polipeptidjét kódoló nukleotid szekvenciával rendelkeznek. A jelen találmány leginkább olyan polinukleotidokkal kapcsolatos, amelyek a jelen találmány polipeptidjét kódoló nukleotid szekvenciát kódolnak. Egy előnyösen kiviteli alakban a nukleotid szekvenciát az 1. számú szekvenciában mutatjuk be. Egy még előnyösebb kiviteli alakban a nukleotid szekvencia az 1. számú szekvencia érett polipeptidjét kódoló régiót jelenti. Egy megint más előnyös kiviteli alakban a nukleotid szekvencia a *Pseudoplectania nigrella* CBS 444.97 törzsben jelen levő érett antimikrobiális polipeptidet kódoló

régiót jelenti. A jelen találmány magába foglal olyan polinukleotidokat, amelyek a 2. számú szekvencia aminosav szekvenciáját tartalmazó polipeptidet kódoló nukleotid szekvenciákkal, vagy ennek egy érett polipeptidjével rendelkeznek, vagy előnyösen ebből állnak, amik a genetikai kód degeneráltságából adódóan különbözik az 1. számú szekvenciától.

A jelen találmány olyan polinukleotidokkal is kapcsolatos, vagy előnyösen olyan polinukleotidokból áll, amelyek az 1. számú szekvencia egy alszekvenciájával rendelkeznek, ami a 2. számú szekvencia antimikrobiális aktivitással rendelkező fragmentjeit kódolja. Az 1. számú szekvencia alszekvenciája olyan nukleotid szekvenciát jelent, ami magába foglalja az 1. számú szekvenciát, azt leszámítva, hogy az 5' és/vagy 3' végről egy vagy több nukleotidot delécióval eltávolítottunk.

A jelen találmány olyan polinukleotidokkal is kapcsolatos, amelyek olyan módosított nukleotid szekvenciával rendelkeznek, vagy előnyösen olyan módosított nukleotid szekvenciából állnak, ami legalább egy módosítást tartalmaz az 1. számú szekvencia érett polipeptidet kódoló szekvenciájában, és ahol a módosított nukleotid szekvencia a 2. számú szekvencia 1-40 aminosavaiból álló polipeptidet kódol.

A polipeptidet kódoló nukleotid szekvencia izolálásához vagy klónozásához használt technikák ismertek a tudomány e területén, és ezek közé tartoznak a genom DNS-ből való izolálás, a cDNS-ből való előállítás, vagy ezek kombinációja. A jelen találmány nukleotid szekvenciájának ilyen genom DNS-ből való klónozása megvalósítható, például a jól ismert polimeráz láncreakcióval (PCR) vagy az expressziós könyvtárak antitest szkrinelésével a közös szerkezeti tulajdonságokkal rendelkező, klónozott DNS fragmentek detektálása céljából. Lásd például Innis et al., 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, New York. Egyéb amplifikációs eljárások, mint például a ligáz láncreakció (LCR) a ligált aktivált transzkripció (LAT) és a nukleotid

szekvencia-alapú amplifikáció (NASBA) is használhatók. A nukleotid szekvencia klónozható egy a *Pseudoplectania* egy törzsében jelen levő antimikrobiális polipeptidet kódoló nukleotid szekvenciából, vagy egy másik, vagy rokon szervezetből, és így például lehet a nukleotid szekvencia polipeptidet kódoló régiójának egy allél vagy faj variánsa.

A nukleotid szekvencia kinyerhető a génsebészetben használt standard klónozási eljárásokkal abból a célból, hogy áthelyezzük a nukleotid szekvenciát a természetes előfordulási helyéről egy másik helyre, ahol reprodukálódik. A klónozási eljárások magukba foglalhatják a polipeptidet kódoló nukleotid szekvenciát tartalmazó, kívánt fragment kimetszését és izolálását, a fragment egy vektor molekulába való inszertálását és a rekombináns vektor olyan gazdasejtbe való beépítését, ahol a nukleotid szekvencia több kópiája vagy klónja replikálódni fog. A nukleotid szekvencia lehet genom, cDNS, RNS, félszintetikus, vagy szintetikus eredetű, vagy lehet ezek bármilyen kombinációja.

A jelen találmány egy olyan polinukleotiddal is kapcsolatos, amely előnyösen olyan nukleotid szekvenciából áll, ami legalább 65%-ban azonos az 1. számú szekvencia 166-285 nukleotidjaival. Előnyösen a nukleotid szekvencia legalább 70%-ban azonos, például legalább 80%-ban azonos, például legalább 90%-ban azonos, még előnyösebben legalább 95%-ban azonos, például legalább 96%-ban azonos, például legalább 97%-ban azonos, vagy még előnyösebben legalább 98%-ban azonos, például legalább 99%-ban azonos az 1. számú szekvencia 166-285 nukleotidjaival. Előnyösen a nukleotid szekvencia antimikrobiális aktivitással rendelkező polipeptidet kódol. A két nukleotid szekvencia közötti azonosság mértéke a fentiekben leírtak szerint határozható meg (lásd a „definíciókról” szóló részt). Előnyösen, a nukleotid szekvencia tartalmazza az 1. számú szekvencia 166-285 nukleotidjait. Egy még előnyösebb kivételi alakban a nukleotid szekvencia az 1. számú szekvencia 166-285 nukleotidjaiból áll.

Egy másik érdekes aspektusban a jelen találmány olyan polinukleotiddal kapcsolatos, amely előnyösen olyan nukleotid szekvenciát tartalmaz, vagy olyan nukleotid szekvenciából áll, ami legalább 65%-ban azonos a *Pseudoplectania nigrella* CBS 444.97 törzsben jelen levő antimikrobiális aktivitást kódoló nukleotid szekvenciában jelen levő nukleotid szekvencia antimikrobiális polipeptidet kódoló régiójával. Egy előnyös kiviteli alakban a *Pseudoplectania nigrella* CBS 444.97 törzsben jelen levő antimikrobiális polipeptidet kódoló nukleotid szekvenciában jelen levő nukleotid szekvencia antimikrobiális polipeptidet kódoló régiójával való azonosság mértéke legalább 70%-os, például legalább 80%-os, például legalább 90%-os, még előnyösebben legalább 95%-os, például legalább 96%-os, például legalább 97%-os, még előnyösebben legalább 98%-os, például 99%-os. Előnyösen a nukleotid szekvencia magába foglalja a *Pseudoplectania nigrella* CBS 444.97 törzsben jelen levő antimikrobiális polipeptidet kódoló nukleotid szekvenciában jelen levő nukleotid szekvencia antimikrobiális kódoló régióját. Egy még előnyösebb kiviteli alakban a nukleotid szekvencia magába foglalja a *Pseudoplectania nigrella* CBS 444.97 törzsben jelen levő antimikrobiális polipeptidet kódoló nukleotid szekvenciában jelen levő nukleotid szekvencia antimikrobiális polipeptidet kódoló régióját.

A jelen találmány polipeptidjét kódoló nukleotid szekvencia módosítására szükség lehet azon polipeptid szintéziséhez, amely olyan aminosav szekvenciát foglal magába, ami a 2. számú szekvencia 1-40 aminosavához képest legalább egy szubsztitúciót, deléciót és/vagy inszerciót tartalmaz. Ezek a mesterséges variánsok különbözhetnek némely génsebészetiileg manipulált módon a natív forrásból izolált polipeptidről, például lehetnek olyan variánsok, amelyek specifikus aktivitásukban, hőstabilitásukban, pH optimumukban vagy más hasonló tulajdonságukban különböznek.

A tudomány e területén képzett szakember számára nyilvánvaló, hogy az ilyen módosítások a molekula funkció szempontjából kritikus fontosságú régiókon kívül végezhetők el, és még mindig aktív polipeptidet eredményeznek. A jelen találmány nukleotid szekvenciája által kódolt polipeptid aktivitásához létfontosságú, és ezért előnyösen a módosítás, például szubsztitúció céljai közé nem tartozó aminosav maradékok azonosíthatók a tudomány e területén ismert eljárásokkal, például hely irányított mutagenézissel vagy alanin-szkennelő mutagenézissel (lásd például Cunningham and Wells, 1989, Science 244:1081-1085). Ez utóbbi technikában a mutációkat minden pozitív töltésű maradéknál bejuttatjuk a molekulába, és a kapott mutáns molekulát teszteljük antimikrobiális aktivitásra, hogy azonosítsuk a molekula aktivitásához létfontosságú aminosav maradékokat. A szubsztrát-enzim kölcsönhatás helyei szintén meghatározhatók a három-dimenziós szerkezet elemzéséből, amint azt például a nukleáris mágneses rezonancia analízises, krisztallográfiás vagy fotoaffinitási jelöléses technikával meghatároztuk (lásd például de Vos et al., 1992, Science, 255:306-312; Smith et al., 1992, Journal of Molecular Biology, 224:899-904; Wlodaver et al., 1992, FEBS Letters 309:59-64).

Sőt, a jelen találmány polipeptidjét kódoló nukleotid szekvencia módosítható úgy, hogy egy nukleotid szubsztitúciót juttatunk be, amely nem eredményez a nukleotid szekvencia által kódolt másik aminosav szekvenciát, de amely megfelel az enzim termeléshez szánt gazda mikroorganizmus kódon használatának.

A nukleotid szekvenciába egy nukleotid másikkra való cseréjét szolgáló mutáció létrehozása megvalósítható hely irányított mutagenézissel, a tudomány e területén ismert bármilyen eljárást használva. Különösen hasznos eljárás, amely egy kérdéses inszertet tartalmazó, szuper feltekeredett, kétszálú DNS vektort használ, és két, a kívánt mutációt tartalmazó szintetikus primert. Az oligonukleotid primerek,

amelyek mindegyike komplementer a vektor ellentétes szálával, a Pfu DNS polimeráz segítségével hosszabbodnak meg a hőmérsékleti ciklusolás során. A primerek beépítésekor, az eltoló elrendezésű nickeket tartalmazó mutált plazmid jön létre. A hőmérsékleti ciklusolás után a terméket DpnI-gyel kezeljük, amely specifikus a metilált és hemimetilált DNS-re, hogy megemésszük a szülői DNS templátot, és mutációt tartalmazó szintetizált DNS-t szelektáljunk. A tudomány e területén ismert egyéb eljárások is használhatók. A nukleotid helyettesítések általános leírásához lásd például Ford et al., 1991, *Protein Expression and Purification* 2:95-107.

A jelen találmány olyan polinukleotiddal is kapcsolatos, amely előnyösen olyan nukleotid szekvenciát tartalmaz, ami antimikrobiális aktivitással rendelkező polipeptidet kódol, és ami nagyon alacsony szigorúsági körülmények között, előnyösen alacsony szigorúsági körülmények között, még előnyösebben közepes szigorúsági körülmények között, még előnyösebben közepes-erős szigorú körülmények között, és még előnyösebben igen szigorú, és még előnyösebben nagyon szigorú körülmények között hibridizálódik egy olyan polinukleotid próbával, ami lehet (i) komplementer az 1. számú szekvencia 166-285 nukleotidjaival, (ii) az 1. számú szekvencia 70-285 nukleotidjait tartalmazó cDNS szekvencia komplementer szála; és (iii) az 1. számú szekvencia 1-285 nukleotidjainak komplementer szála.

Érthető, hogy a nukleotid szekvenciák hibridizációjára vonatkozó részletek és sajátosságok ugyanazok vagy analógok a jelen találmány „Antimikrobiális aktivitással rendelkező polipeptidek” c. részben leírt hibridizációs aspektusaival.

Nukleinsav szerkezetek

A jelen találmány kapcsolatos olyan nukleotid szerkezetekkel is, amelyek a jelen találmány egy nukleotid szekvenciáját tartalmazzák

működőképesen kapcsolódva egy vagy több - a kódoló szekvencia expresszióját irányító - szabályozó szekvenciához megfelelő gazdasejtben olyan körülmények között, ami kompatibilis a szabályozó szekvenciákkal.

A jelen találmány polipeptidjét kódoló nukleotid szekvencia különféle módokon manipulálható, hogy a polipeptid expresszióját biztosítsa. A nukleotid szekvencia vektorba való inszerciója előtti manipulálása kívánatos vagy szükséges lehet az expressziós vektortól függően. A rekombináns DNS módszereket használó nukleotid szekvenciák módosítására szolgáló technikák jól ismertek a tudomány e területén.

A szabályozó szekvencia lehet egy megfelelő promóter szekvencia, egy olyan nukleotid szekvencia, amit a nukleotid szekvencia expressziójához való gazdasejt felismer. A promóter szekvencia tartalmaz a polipeptid expresszióját közvetítő transzkripciós szabályozó szekvenciákat. A promóter lehet bármilyen nukleotid szekvencia, amely transzkripciós aktivitást mutat a választott gazdasejtben, ideértve a mutáns, csonkított, és hibrid promótereket, és kinyerhető extracelluláris vagy intracelluláris polipeptideket kódoló génekből, amelyek homológok vagy heterológok a gazdasejttel.

A jelen találmány nukleinsav szerkezeteinek különösen egy bakteriális gazdasejtben való transzkripciójának irányításához megfelelő promóterekre példák, az *E. coli lac* operonból, a *Streptomyces coelicolor* agaráz génből (*dagA*), a *Bacillus subtilis* levanszukráz génből (*sacB*), a *Bacillus licheniformis* alfa-amiláz génből (*amyL*), a *Bacillus stearothermophilus* maltogén amiláz génből (*amyM*), a *Bacillus amyloliquefaciens* alfa-amiláz génből (*amyQ*), a *Bacillus licheniformis* penicillináz génből (*penP*), a *Bacillus subtilis xylA* és *xylB* génekből és a prokarióta beta-laktamáz génből származó promóterek (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Science USA 75:3727-

3731), valamint a tac promóter (DeBoer et al., 1983, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80:21-25). További promóterek kerültek leírásra a következőkben: „Useful proteins from recombinant bacteria” in Scientific American, 1980, 242:74-94 és Sambrook et al., 1989, *supra*.

A jelen találmány nukleinsav szerkezetei transzkripciójának irányításra szolgáló megfelelő promóterekre példák fonalasgomba gazdasejtekben azok a promóterek, amiket az *Aspergillus oryzae* TAKA amilázhoz, a *Rhizomucor miehei* aszparagin-proteinázhoz, az *Aspergillus niger* semleges alfa-amilázhoz, *Aspergillus niger* sav stabil alfa-amilázhoz, az *Aspergillus niger* vagy *Aspergillus awamori* glükóamilázhoz (*glaA*), a *Rhizomucor miehei* lipázhoz, az *Aspergillus oryzae* alkalikus proteázhoz, *Aspergillus oryzae* trióz-foszfát izomerázhoz, *Aspergillus nidulans* acetamidázhoz, és a *Fusarium oxysporum* tripszín-szerű proteázhoz való (WO 96/00787) génekből nyertünk, valamint az NA2-tpi promóter (az *Aspergillus niger* semleges alfa-amilázhoz és az *Aspergillus oryzae* trióz foszfát izomerázhoz való génekből származó promóterek hibridje), és ezek mutánsa, csonkított és hibrid promóterei.

Az élesztőgomba gazdában hasznos promóterek a *Saccharomyces cerevisiae* enolázhoz (ENO-1), a *Saccharomyces cerevisiae* galaktokinázhoz (GAL1), a *Saccharomyces cerevisiae* alkohol dehidrogenáz/gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenázhoz (ADH2/GAP) és a *Saccharomyces cerevisiae* 3-foszfoglicerát kinázhoz való génekből nyerhetők. Egyéb az élesztőgomba gazdasejtekhez hasznos promótereket írtak le Romanos és munkatársai (1992, Yeast 8:423-488).

A szabályozó szekvencia is lehet megfelelő transzkripció terminátor szekvencia, egy olyan szekvencia, amit a gazdasejt a transzkripció terminálásához ismer fel. A terminátor szekvencia működőképesen kapcsolódik a polipeptidet kódoló nukleotid szekvencia

3' terminusához. Bármilyen terminátor, ami működik a választott gazdasejtben felhasználható a jelen találmányban.

A fonalgomba gazdasejtekhez előnyös terminátorok nyerhetők az *Aspergillus oryzae* TAKA amilázhoz, az *Aspergillus niger* glükóamilázhoz, az *Aspergillus nidulans* anthranilát szintázhoz, az *Aspergillus niger* alfa-glükózidázhoz és a *Fusarium oxysporum* tripszinszerű proteázhoz való génekből.

Az élesztőgomba gazdasejtekhez való előnyös terminátorok nyerhetők a *Saccharomyces cerevisiae* enolázhoz, a *Saccharomyces cerevisiae* citokrom C-hez (CYC1) és a *Saccharomyces cerevisiae* gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenázhoz való génekből. Az élesztőgomba gazdasejtekhez hasznos egyéb terminátorok kerültek leírásra Romanos et al., munkájában 1992, *supra*.

A szabályozó szekvencia lehet egy megfelelő vezető szekvencia is, egy mRNS olyan nem transzlált régiója, ami a gazdasejt általi transzlációhoz lényeges. A vezető szekvencia működőképesen kapcsolódik a polipeptidet kódoló nukleotid szekvencia 5' terminusához. A választott gazdasejtben működőképes bármilyen vezető szekvencia felhasználható a jelen találmányban.

A fonalgomba gazdasejtekhez előnyös vezetőket az *Aspergillus oryzae* TAKA amilázhoz és az *Aspergillus nidulans* trióz-foszfát izomerázhoz való génekből nyerjük.

Az élesztőgomba gazdasejtekhez való megfelelő vezetők kinyerhetők a *Saccharomyces cerevisiae* enolázhoz (ENO-1), a *Saccharomyces cerevisiae* 3-foszfoglicerát kinázhoz, a *Saccharomyces cerevisiae* alfa-faktorhoz és a *Saccharomyces cerevisiae* alkohol dehidrogenáz/gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenázhoz (ADH2/GAP) való génekből.

A szabályozó szekvencia lehet egy poliadenilációs szekvencia, egy a nukleotid szekvencia 3' terminusához működőképesen kapcsolódó

szekvencia és egy olyan szekvencia, ami ha átíródik, a gazdasejt olyan jelként ismeri fel, aminek hatására poliadenozin maradékokat ad az átírt mRNS-hez. Bármilyen poliadenilációs szekvencia, ami működik a választott gazdasejtben, felhasználható a jelen találmányban.

Előnyös poliadenilációs szekvencia nyerhető a fonalasgomba gazdasejtekhez az *Aspergillus oryzae* TAKA amilázhoz, az *Aspergillus niger* glükóamilázhoz, az *Aspergillus nidulans* anthranilát szintázhoz, a *Fusarium oxysporum* tripszin-szerű proteázhoz és az *Aspergillus niger* alfa-glükozidázhoz való génekből.

Az élesztőgomba gazdasejthez megfelelő poliadenilációs szekvenciákat Guo és Sherman írták le (1995, Molecular Cellular Biology, 15:5983-5990).

A szabályozó szekvencia lehet egy olyan jel peptidet kódoló régió is, ami egy a polipeptid amino-terminusához kötött aminosav szekvenciát kódol, és ami a kódolt polipeptidet a sejt szekrécións reakcióújtára irányítja. A nukleotid szekvencia kódoló szekvenciájának 5' vége inherensen tartalmazhat egy jel peptidet kódoló régiót, ami természetes módon kötődik a transzlációs leolvasási keretben a kódoló régió olyan szegmensével, ami a szekretált polipeptidet kódolja. Másik lehetőségként, a kódoló szekvencia 5' vége tartalmazhat egy olyan jel peptidet kódoló régiót, ami idegen a kódoló szekvencia számára. Az idegen jel peptidet kódoló régióra szükség lehet, ha a kódoló szekvencia természetes módon nem tartalmaz egy jel peptidet kódoló régiót. Másik lehetőségként, az idegen jel peptidet kódoló régió egyszerűen helyettesítheti a természetes jel peptidet kódoló régiót, hogy fokozza a polipeptid szekréciónját. Azonban bármilyen olyan jel peptidet kódoló régió, ami az expresszált polipeptidet a választott gazdasejt szekrécións reakcióújtára irányítja is felhasználható a jelen találmányban.

A jel peptidet kódoló régió az 1. számú szekvencia 1-69 nukleotidjait jelenti, amelyek a 2. számú szekvencia -55 - -33 aminosavait (vagy a 3. számú szekvencia 1-23 aminosavait) kódolják.

A bakteriális gazdasejthez való hatékony jel peptidet kódoló régiók azok a jel peptidet kódoló régiók, amik a *Bacillus* NCIB 11837 maltogén amilázhoz, a *Bacillus stearothermophilus* alfa-amilázhoz, a *Bacillus licheniformis* szubtilizinhez, a *Bacillus licheniformis* beta-laktamázhoz, a *Bacillus stearothermophilus* semleges proteázokhoz (*nprT*, *nprS*, *nprM*) és a *Bacillus subtilis* *prsA*-hoz való génekből nyerhetők. További jel peptideket írtak le Simonen and Palva, 1993, *Microbiological Reviews* 57:109-137.

A fonalgomba gazdasejtekhez való hatékony jel peptidet kódoló régiók azok a jel peptidet kódoló régiók, amik az *Aspergillus oryzae* TAKA amilázhoz, *Aspergillus niger* semleges amilázhoz, az *Aspergillus niger* glükóamilázhoz, *Rhizomucor miehei* aszparagin-proteinázhoz, *Humicola insolens* cellulázhoz és *Humicola lanuginosa* lipázhoz való génekből nyerhetők.

Az élesztőgomba gazdasejtkehez való hasznos jel peptidek nyerhetők a *Saccharomyces cerevisiae* alfa-faktorhoz és a *Saccharomyces cerevisiae* inverzáthoz való génekből. Egyéb hasznos jel peptidet kódoló régiókat írtak le Romanos és munkatársai, 1992, *supra*.

A szabályozó szekvenciák lehetnek olyan propeptid kódoló régiók is, amik a polipeptid amino-terminusán elhelyezett aminosav szekvenciát kódolnak. A kapott polipeptid proenzimként vagy propolipeptidként (vagy bizonyos esetekben zimogénként) ismert. Egy propolipeptid általában inaktív, és érett aktív polipeptiddé konvertálható a propeptid propolipeptidről való katalitikus vagy autokatalitikus hasításával. A propeptidet kódoló régió kinyerhető a *Bacillus subtilis* alkalikus proteázhoz (*aprE*), a *Bacillus subtilis* semleges proteázhoz (*nprT*), a *Saccharomyces cerevisiae* alfa-faktorhoz, a *Rhizomucor miehei*

aszparagin-proteinázhoz és a *Myceliophthora thermophila* lakkázhoz való génekből (WO 95/33836).

A propeptidet kódoló régió az 1. számú szekvencia 70-165 nukleotidjait jelenti, ami a 2. számú szekvencia -32--1 aminosavait (vagy a 3. számú szekvencia 24-55 aminosavait) kódolja.

Ahol a jel peptid és propeptid régió is jelen van a polipeptid amino-terminusán, a propeptid régió a polipeptid amino-terminusa mellett helyezkedik el, a jel peptid pedig a propeptid régió amino-terminusa mellett.

Kíváncos lehet olyan szabályozó szekvenciák hozzáadása is, amik lehetővé teszik a polipeptid expressziójának szabályozását a gazdasejt szaporodásához viszonyítva. A szabályozó rendszerekre példák azok, amik azt okozzák, hogy a gén expressziója be és kikapcsolódik kémiai vagy fizikai stimulus hatására, ideértve egy szabályozó vegyület jelenlétét. A prokarióta rendszerekben levő szabályozó rendszerek közé tartoznak a *lac*, a *tac* és a *trp* operátor rendszerek. Élesztőgombákban az ADH2 rendszer vagy a GAL1 rendszer használható. Fonalgombákban a TAKA alfa-amiláz promóter, az *Aspergillus niger* glükóamiláz promóter és az *Aspergillus oryzae* glükóamiláz promóter használható szabályozó szekvenciaként. A szabályozó szekvenciákra példák még azok, amik lehetővé teszik a gén amplifikálást. Eukarióta rendszerekben ezek közé tartoznak a dihidrofolát reduktáz gén, ami metotrexát jelenlétében amplifikálódik, és a metallotioneín gének, amik nehézfémekkel amplifikálódnak. Ezekben az esetekben a polipeptidet kódoló nukleotid szekvencia működőképesen kapcsolódik a szabályozó szekvenciával.

Expressziós vektorok

A jelen találmány kapcsolatos olyan rekombináns expressziós vektorokkal is, amelyek a jelen találmány nukleinsav szerkezetét tartalmazzák. A különböző fent leírt nukleotid és szabályozó szekvenciák

összekapcsolhatók, hogy olyan rekombináns expressziós vektort hozzanak létre, ami egy vagy több megfelelő restrikciós helyet foglal magába, hogy lehetővé tegye a polipeptidet kódoló nukleotid szekvencia inszercióját vagy helyettesítését az ilyen helyeken. Másik lehetőségként, a jelen találmány nukleotid szekvenciája expresszálnak úgy is, hogy a nukleotid szekvenciát vagy a szekvenciát tartalmazó nukleinsav szerkezetet egy megfelelő vektorba inszertáljuk az expresszióhoz. Az expressziós vektor létrehozásában a kódoló szekvenciát úgy helyezzük el a vektorban, hogy a kódoló szekvencia működőképesen kapcsolódjon az expresszióhoz való megfelelő szabályozó szekvenciákkal.

A rekombináns expressziós vektor lehet bármilyen vektor (például egy plazmid vagy vírus), amely megfelelő rekombináns DNS eljárásoknak vetődő alá, és megvalósíthatja a nukleotid szekvencia expresszióját. A vektor kiválasztása tipikusan a vektor azon gazdasejttel való kompatibilitásától függ, amelybe a vektor be akarjuk juttatni. A vektorok lehetnek lineáris vagy zárt kör alakú plazmidok.

A vektor lehet autonóm módon replikálódó vektor, azaz olyan vektor, ami extrakromoszómális egységként létezik, amelynek replikációja független a kromoszóma replikációtól, például lehet egy plazmid, egy extrakromoszómális elem, egy minikromoszóma, vagy egy mesterséges kromoszóma.

A vektor tartalmazhat bármilyen elemet az önreplikáció biztosításához. Másik lehetőségként a vektor lehet olyan vektor, ami, ha bejuttatják a gazdasejtbe, integrálódik a genomba, és együtt replikálódik azzal/azokkal a kromoszómával/kromoszómákkal, amelyikbe bejuttatták. Ezenkívül, egyellen vektor vagy plazmid, vagy két vagy több vektor vagy plazmid is használható, amelyek együtt tartalmazzák a gazdasejt genomjába bejuttatandó teljes DNS-t, vagy egy transzpozon is alkalmazható.

A jelen találmány vektorai előnyösen egy vagy több szelektálható markert tartalmaznak, amelyek lehetővé teszik a transzformált sejtek könnyű kiválasztását. A szelektálható marker egy olyan gén, amelynek terméke biocid vagy virális rezisztenciát, nehézfémekkel szembeni rezisztenciát, az auxotrófoknak prototrófiát és más hasonló tulajdonságokat biztosít.

A bakteriális szelektálható markerekre példák a *Bacillus subtilis*-ből vagy a *Bacillus licheniformis*-ből származó *dal* gének, vagy olyan markerek, amelyek antibiotikum rezisztenciát, például ampicillin, kanamycin, kloramfenikol vagy tetraciklin rezisztenciát biztosítanak. Az élesztőgomba gazdasejtekhez való megfelelő markerek az ADE2, a HIS3, a LEU2, a LYS2, a MET3, a TRP1 és az URA3. Fonalgomba gazdasejtekben használható szelektálható markerek közé tartoznak az ezekre való korlátozás nélkül az *amdS* (acetamidáz), az *argB* (ornitin karbamoil-transzferáz), a *bar* (foszfinotricin-acetiltranszferáz), a *hygB* (higromicin foszfortranszferáz), a *niaD* (nitrát reduktáz), a *pyrG* (orotidin-5-foszfát dekarboxiláz), az *sC* (szulfát adenil-transzferáz), a *trpC* (antranilát szintáz), valamint ezek ekvivalensei.

Egy *Aspergillus* sejtben való használathoz előnyösek az *Aspergillus nidulans* vagy az *Aspergillus oryzae* *amdS* és a *pyrG* génjei és a *Streptomyces hygroscopicus* *bar* génje.

A jelen találmány vektorai előnyösen tartalmaznak olyan elemet, ami lehetővé teszi a vektor gazdasejt genomjába való stabil integrációját, vagy a vektor autonóm replikációját a sejtben a genomtól függetlenül.

A gazdasejt genomba való integrációhoz a vektor a polipeptidet vagy a vektor bármilyen egyéb elemét kódoló nukleotid szekvenciára támaszkodik a vektor homológ vagy nem homológ rekombinációval genomba történő stabil integrációjához. Másik lehetőségként, a vektor tartalmazhat további nukleotid szekvenciákat a gazdasejt genomjába homológ rekombinációval megvalósuló integráció irányításához. A

további nukleotid szekvenciák lehetővé teszik, hogy a vektor a kromoszómá(k) pontos helye(i)n integrálódjon a gazdasejt genomjában. A pontos helyen bekövetkező integráció valószínűségének növeléséhez az integrációs elemek előnyösen megfelelő számú nukleotidot, például 100-1500 bázispárt, előnyösen 400-1500 bázispárt, még előnyösebben 800-1500 bázispárt tartalmaznak, amelyek erősen homológok a megfelelő cél szekvenciával ahhoz, hogy fokozzák a homológ rekombináció valószínűségét. Az integrációs elemek lehetnek bármilyen szekvenciák, amelyek homológok a gazdasejt genomjában levő cél szekvenciával. Ezenkívül, az integrációs elemek lehetnek nem-kódoló vagy kódoló nukleotid szekvenciák. Másrészt, a vektor integrálódhat a gazdasejt genomjába nem-homológ rekombinációval is.

Az autonóm replikációhoz a vektor még tartalmazhat egy replikációs origót, ami lehetővé teszi, hogy a vektor autonóm módon replikálódjon a kérdéses gazdasejtben. A bakteriális replikációs origóra példák a pBR322, a pUC19, a pACYC177 és a pACYC184 plazmidok, amelyek lehetővé teszik az *E. coli*-ban való replikációt, és a pUB110, a pE194, a pTA1060 és a pAM β 1 plazmidok, amik a *Bacillus*-ban való replikációt teszik lehetővé. Az élesztőgomba gazdasejtben való replikációs origókra példák a 2 μ -os replikációs origó, az ARS1, ARS4, az ARS1 és CEN3 kombinációja és az ARS4 és CEN6 kombinációja. A replikációs origó lehet olyan replikációs origó, ami mutációval rendelkezik, és ez lehetővé teszi, hogy hőszensitívként funkcionáljon a gazdasejtben (lásd például Ehrlich 1978, Proceedings of the National Academy of Science, USA 75:1433).

A jelen találmány nukleotid szekvenciájának egynél több kópiája is inszertálható a gazdasejtbe, hogy fokozza a géntermék termelését. A nukleotid szekvencia kópia számának növelése elérhető, ha legalább egy további szekvencia kópiát integrálunk a gazdasejt genomjába vagy ha egy amplifikálható szelektálható markert építünk a nukleotid

szekvenciába, ahol a szelektálható marker gén amplifikált kópiáit és így a nukleotid szekvencia további kópiáit tartalmazó sejtek oly módon szelektálhatók, hogy a sejteket megfelelő szelektálható anyag jelenlétében tenyésztjük.

A jelen találmány rekombináns expressziós vektorainak megszerkesztését célzó, a fent leírt elemek ligálásához használt eljárások, jól ismertek a tudomány e területén jártas szakemberek számára (Lásd például Sambrook et al., 1989, supra).

Gazdasejtek

A jelen találmány a jelen találmány nukleinsav szerkezetét tartalmazó gazdasejttel is kapcsolatos, amely előnyösen használható a polipeptidek rekombináns létrehozásában. A jelen találmány nukleotid szekvenciáját tartalmazó vektort bejuttatjuk egy gazdasejtbe, hogy a vektor kromoszomális integránsként vagy önreplikálódó extra-kromoszomális vektorként maradjon fenn, ahogy azt korábban leírtuk.

A gazdasejt lehet egysejtű mikroorganizmus, például egy prokarióta vagy egy nem-egysejtű mikroorganizmus, például egy eukarióta.

Hasznos egysejtű sejtek a baktérium sejtek, például a gram pozitív baktériumok, ideértve az ezekre való korlátozás nélkül a *Bacillus* sejteket, mint például a *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* és a *Bacillus thuringiensis* vagy a *Streptomyces* sejtek, például a *Streptomyces lividans*, vagy a *Streptomyces murinus*, vagy a gram negatív baktériumok, mint az *E. coli* és a *Pseudomonas* fajok. Egy előnyös kiviteli alakban a baktérium gazdasejt *Bacillus lentus*-t, *Bacillus licheniformis*-t, *Bacillus stearothermophilus*-t vagy *Bacillus subtilis*-t jelent. Egy másik előnyös kiviteli alakban a *Bacillus* sejt alkalofil *Bacillus*-t jelent.

Egy vektor bakteriális gazdasejtbe való bejuttatása, például protoplaszt transzformációval valósítható meg (lásd például Chang and Cohen, 1979, *Molecular General Genetics* 168:111-115), kompetens sejteket (lásd például Young and Spizizin, 1961, *Journal of Bacteriology*, 81:823-829 vagy Dubnau and Davidoff-Abelson, 1971, *Journal of Molecular Biology*, 56:209-221) elektroporációt (lásd például Shígekawa and Dower, 1988, *Biotechniques* 6:742-751) vagy konjugációt (lásd például Koehler and Thorne, 1987, *Journal of Bacteriology* 169:5771-5278) használva.

A gazdasejt lehet eukarióta, például emlős, rovar, növény vagy gomba sejt.

Egy előnyös kiviteli alakban a gazdasejt gomba sejtet jelent. A „gomba” a jelen találmány szerinti használatban Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota és Zygomycota törzseket jelent (ahogy azt Hawksworth et al., meghatározták in: Ainsworth and Bisby's *Dictionary of The Fungi* 8. ed. 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK), valamint az Oomycota (ahogy Hawksworth et al hivatkozták, 1995, supra, 171. oldal) és az összes mítospórás gombák (Hawksworth et al., 1995, supra).

Egy még előnyösebb kiviteli alakban a gomba gazdasejt élesztőgomba sejtet jelent. Az „élesztőgomba” kifejezés a jelen találmány szerinti használatban ascosporogén élesztőgombákat (*Endomycetales*), basidiosporogén élesztőgombákat és a *Fungi Imperfecti*-be (*Blastomycetes*-be) tartozó élesztőgombákat jelent. Miután a jövőben várható, hogy az élesztőgombák rendszerezése megváltozik, a jelen találmány céljaihoz az élesztőgombákat a *Biology and Activities of Yeast* c. műben meghatározottak szerint használjuk (Skinner, F.A. Passmore, S.M. and Davenport R.R. eds. *Soc. App. Bacteriol. Symposium Series* No.9, 1980).

Egy még előnyösebb kiviteli alakban az élesztőgomba *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces* vagy *Yarrowia* sejtet jelent.

Egy még előnyösebb kiviteli alakban az élesztőgomba gazdasejt *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* vagy *Saccharomyces oviformis* sejt lehet. Egy másik előnyös kiviteli alakban az élesztőgomba gazdasejt *Kluyveromyces lactis* sejtet jelent. Egy megint más előnyös kiviteli alakban az élesztőgomba gazdasejt *Yarrowia lipolytica* sejtet jelent.

Egy másik előnyösebb kiviteli alakban a gomba gazdasejt fonalgomba gazdasejtet jelent. A „fonalgomba” kifejezés az Eumycota és Oomycota szubdivízióba tartozó összes fonalgombát magába foglalja (ahogy azt Hawksworth et al., meghatározták, 1995, supra). A fonalgombák úgy jellemezhetők, hogy sejtfaik kitinből, cellulózból, glükánból, kitozánból, mannánból és egyéb komplex poliszacharidból áll. A vegetatív szaporodás hifa meghosszabbodást jelent, és a szén katabolizmus obligátan aerob. Ezzel szemben az élesztőgombák, például a *Saccharomyces cerevisiae* vegetatív szaporodása az unicelluláris thallus sarjadásával történik, szén katabolizmusuk pedig fermentatív lehet.

Egy még előnyösebb kiviteli alakban a fonalgomba gazdasejtek az ezekre való korlátozás nélkül az alábbi fajok sejtjeit jelentik: *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Thielavia*, *Tolypocladium* vagy *Trichoderma*.

Egy még előnyösebb kiviteli alakban a fonalgomba gazdasejt egy *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, vagy *Aspergillus oryzae* sejtet jelent. Egy másik előnyös kiviteli alakban a fonalgomba gazdasejt *Fusarium bacridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*,

Fusarium culmorum, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotricioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichithecoides* vagy *Fusarium venenatum* sejtet jelent. Egy még előnyösebb kiviteli alakban a fonalasgomba gazdasejt *Fusarium venenatum* (nirenberg sp. nov.) sejtet jelent. Egy megint más, előnyös kiviteli alakban a fonalasgomba gazdasejt *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Thielavia terrestris*, *Trochoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiátum*, *Trichoderma reesei* vagy *Trichoderma viridae* sejtet jelent.

A gomba sejtek transzformálhatók a protoplaszt képződést, a protoplasztok transzformálását és a sejtfal regenerációját magába foglaló, ismert (*per se*) eljárásokkal. Az *Aspergillus* gazdasejtek transzformációjára megfelelő eljárásokat írtak le az EP 238023 szabadalomban és a Proceedings of the National Academy of Science, USA 81:1470-1474 cikkben (Yelton et al., 1984). A *Fusarium* fajok transzformálására szolgáló megfelelő eljárásokat írtak le Maladier és munkatársai (1989, Gene 78:147-156) valamint a WO 96/00787 szabadalomban. Az élesztőgombák transzformálhatók a Becker and Guarente (In: Abelson, J.N. and Simon, M.I. eds, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Vol. 194:182-187, Academic Press, Inc., New York), Ito és munkatársai (1983, Journal of Bacteriology 153:163), és Hinnen és munkatársai (1978, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 75:1920) által leírtak szerint.

Az előállítás eljárásai

A jelen találmány kapcsolatos a jelen találmány polipeptidjének előállítására szolgáló eljárásokkal is, amelynek során (a) egy olyan törzset tenyésztünk, ami vad formájában képes előállítani a polipeptidet, és (b) a polipeptidet kinyerjük. Előnyösen, a *Pseudoplectania* nemzetség törzsét, még előnyösebben a *Pseudoplectania nigrella*-t használjuk.

A jelen találmány a jelen találmány polipeptidjének előállítására szolgáló eljárásokkal is kapcsolatos, amelyek során (a) a gazdasejtet olyan körülmények között tenyésztjük, amely a polipeptid termeléséhez vezet, és (b) a polipeptidet kinyerjük.

A jelen találmány előállítási eljárásaiban a sejteket olyan tenyésztápközegben szaporítjuk, amely megfelel a polipeptid előállításának, és ehhez ismert eljárásokat használunk. Például, a sejt tenyészthető rázó lombikos tenyésztéssel, kis léptékű vagy nagy léptékű fermentációval (ideértve a folyamatos, a batch, fed-batch vagy szilárd fázisú fermentációkat), laboratóriumi vagy ipari fermentorokban, megfelelő tenyésztápközegben, és olyan körülmények között, ami lehetővé teszi a polipeptid expresszálasát és/vagy izolálását. A tenyésztés olyan megfelelő tenyésztápközegben történik, ami szén, nitrogén forrásokat és szervesetlen sókat tartalmaz, és ehhez a tudomány e területén ismert eljárásokat használunk. A megfelelő tenyésztápközegek beszerezhetők kereskedelmi forrásokból, vagy előállíthatók publikált (például az American Type Culture Collection katalógusában publikált) összetételek szerint. Ha a polipeptid a tenyésztápközegbe szekretálódik, a polipeptid kinyerhető közvetlenül a tenyésztápközegből. Ha a polipeptid nem szekretálódik, akkor kinyerhető a sejt lizátumaiból.

A polipeptid detektálható a polipeptidekre specifikus, a tudomány e területén ismert eljárásokkal. Ezen detektálási eljárások közé tartoznak a specifikus antitestek használata, egy enzim termék létrehozása, vagy egy

enzim szubsztrát eltűnése. Például, egy enzim vizsgálat használható az itt leírt polipeptid aktivitásának vizsgálatához.

A kapott polipeptid kinyerhető a tudomány e területén ismert eljárásokkal. Például, a polipeptid kinyerhető a tenyésztápközegből hagyományos eljárásokkal, ideértve az ezekre való korlátozás nélkül a centrifugálást, a szűrést, az extrahálást, a porlasztva szárítást, az evaporációt és a kicsapatást.

A jelen találmány polipeptidjei különböző a tudomány e területén ismert eljárásokkal tisztíthatók, ideértve az ezekre való korlátozás nélkül a kromatográfiát (például ioncserés, affinitás, hidrofób, kromatofókuszáló és méret exklúziós kromatográfiát), az elektroforetikus eljárásokat (például a preparatív izoelektromos fókuszálást), a differenciáló oldékonyságot (például az ammónium szulfátos kicsapatást), az SDS-PAGE-t vagy az extrahálást (lásd például *Protein Purification*, J.-C. Janson and Lars Ryden, eds, VCH Publishers, New York, 1989).

Növények

A jelen találmány olyan transzgenikus növényekkel, növényi részekkel vagy növényi sejtekkel is kapcsolatos, amelyeket a jelen találmány antimikrobiális aktivitásával rendelkező polipeptidet kódoló nukleotid szekvenciával transzformáltak, hogy expresszálna és kinyerhető mennyiségben termelje a polipeptidet. A polipeptid kinyerhető a növényből vagy a növényi részből. Másik lehetőségként a rekombináns polipeptidet tartalmazó növény vagy növényi rész használható az élelmiszer vagy takarmány minőségének javítására, például a tápérték, az ízletesség, és a reológiai tulajdonságok javítására, vagy a tápértéket csökkentő tényezők megsemmisítésére. A kinyert polipeptid, növény vagy növényi rész felhasználható az állatok és gazdasági állatok emésztőflórájának javítására vagy megváltoztatására.

A transzgenikus növény lehet kétszikű vagy egyszikű. Az egyszikű növényekre példák a fűvek, például a réti perje (*Poa*), a takarmány fűvek, mint a *Festuca*, a *Lolium*, a mérsékeltövi fűvek, mint az *Agrostis* és a gabonák, például a búza, zab, rozs, árpa, rizs, cirok, és kukorica.

Kétszikű növényekre példák a dohány, a burgonya, a cukorrépa, a pillangósok, például a csillagfűrt, a borsó, a bab, és a szójabab, a keresztesvirágúak növényei (*Brassicaceae* család tagjai), például a karfiol, a repcemag, és a közeli rokon modell növény az *Arabidopsis thaliana*.

A növényi részekre példák a szár, a kallusz, a levelek, a gyökér, a gyümölcsök, a magok és a gumók. Specifikus növényi szövetek, mint a kloroplasztisz, az apoplaszt, a mitokondrium, a vakuolum, a peroxiszómák, és a citoplazma, szintén a növény részének számítanak. Ezenkívül, bármilyen növényi sejt, bármilyen szövetből származó sejt, szintén a növény részének számít.

A jelen találmány körébe tartoznak az ilyen növények utódai, növényi részei és növényi sejtjei.

A jelen találmány polipeptidjét expresszió transzgenikus növény vagy növényi sejt megszerkeszthető a tudomány e területén ismert eljárások szerint. Röviden, a növényt vagy növényi sejtet úgy szerkesztjük meg, hogy egy a jelen találmány polipeptidjét kódoló egy vagy több expressziós szerkezetet bejuttatunk a növény gazda genomjába, és a kapott módosított növényt vagy növényi sejtet transzgenikus növénné vagy növényi sejté neveljük.

Nehézség nélkül az expressziós szerkezet egy olyan nukleinsav szerkezetet jelent, amely a jelen találmány polipeptidjét kódoló nukleotid szekvenciát kódol, amely működőképesen kapcsolódik a választott növényben vagy növényi részben való nukleotid szekvencia expressziójához szükséges megfelelő szabályozó szekvenciákkal. Ezenkívül, az expressziós szerkezet tartalmazhat egy olyan szelektálható

markert, amely hasznos az olyan gazdasejt azonosításában, amibe az expressziós szerkezetet integrálták, valamint olyan DNS szekvenciákat, amik a szerkezet kérdéses növénybe való bejuttatásához szükségesek (ez utóbbi a használt DNS bejuttatási eljárástól függ).

A szabályozó szekvenciák, például a promóter, és a terminációs szekvenciák, és adott esetben a jel vagy tranzit szekvenciák kiválasztását például az határozza meg, hogy mikor, hol, és hogyan öhajtjuk a polipeptidet expresszálni. Például, a jelen találmány polipeptidjét kódoló gén expressziója lehet konstitutív vagy indukálható, vagy lehet fejlődés-, fázis- vagy szövetspecifikus, és a géntermék kötődhet egy specifikus szövethez, vagy növényi részhez, például magokhoz vagy levelekhez. A szabályozó szekvenciákat például Tague et al. írták le (1988, *Plant Physiology*, 86:506).

A konstitutív expresszióhoz a 35S-CaMV promóter használható (Franck et al., 1980, *Cell*, 21:285-294). A szerv-specifikus promóterek lehetnek olyan promóterek, amik tároló raktározó szövetekből, például magokból, burgonya gumóból és gyümölcsökből származnak (Edwards & Coruzzi, 1990, *Ann. Rev. Genet.*, 24:275-303) vagy metabolikus raktározó szövetekből, például merisztémából származnak (Ito et al., 1994, *Plant Mol. Biol.* 24:863-878), lehetnek mag specifikus promóterek, például rizsből származó glutelin, prolamin, globulin vagy albumin promóterek (Wu et al., 1998, *Plant and Cell Physiology*, 39:885-889) lehet egy *Vicia faba* promóter a legumin B4-ből, és az ismeretlen mag protein gén a *Vicia faba*-ból (Conrad et al., 1998, *Journal of Plant Physiology* 152:708-711), lehet egy mag olaj test proteinből származó promóter (Chen et al., 1998, *Plant and Cell Physiology*, 39:935-941) lehet a *Brassica napus*-ból származó tároló protein - napA – promóter, vagy lehet bármilyen, a tudomány e területén ismert mag specifikus promóter, például a WO 91/14772 szabadalomban leírt promóter. Ezenkívül, a promóter lehet egy levél specifikus promóter, például a rizsből vagy

paradicsomból származó *rbcS* promóter (Kyoizuka et al., 1993, Plant Physiology 102:991-1000) a klorella vírus adenin metil-transzferáz gén promóter (Mitra and Higgins, 1994, Plant Molecular Biology, 26:85-93), vagy a rizsből származó *aldP* gén promóter (Kagaya et al., 1995, Molecular and General Genetics, 248:668-674) vagy lehet egy seb indukálható promóter, például a burgonya pin2 promóter (Xu et al., 1993, Plant Molecular Biology, 22:573-588).

Egy promóter erősítő elem is használható az enzim növényben való magasabb szintű expressziójának eléréséhez. Például, a promóter erősítő elem lehet egy intron, amelyet a promóter és a jelen találmány polipeptidjét kódoló nukleotid szekvencia közé helyeztek. Például, Xu et al., 1993, supra, leírták a rizs aktin 1 gén első intronjának az expresszió fokozásában való használatát.

A szelektálható marker gén és az expressziós szerkezet bármilyen egyéb része választható a tudomány e területén rendelkezésre álló szerkezetek közül.

A nukleinsav szerkezetek a növényi genomba a tudomány e területén ismert, hagyományos technikák szerint építhetők be, ideértve az *Agrobacterium*-által közvetített transzformációt, a vírus által közvetített transzformációt, a mikroinjektálást, a részecske bombázást, a biolisztikus transzformációt és az elektroporációt (Gasser et al., 1990, Science 244:1293; Potrykus, 1990, Bio/Technology 8:535; Shimamoto et. al., 1989 Nature 338:274).

Jelenleg az *Agrobacterium*-által közvetített gén transzfer a választott módszer a transzgenikus kétszikűek létrehozásához (lásd például Hooykas and Schilperoort, 1992, Plant Molecular Biology, 19:15-38). Azonban használható egyszikűek transzformálásához is, bár ezen növények esetében egyéb transzformációs eljárások részesülnek előnyben. Jelenleg, a transzgenikus egyszikűek létrehozásához választott eljárás az embrionális kalluszok vagy fejlődő embriók részecske

bombázása (a transzformáló DNS-sel burkolt mikroszkopikus arany vagy volfrám részecskék)(Christou, 1992, Plant Journal 2:275-281; Shimamoto, 1994, Current Opinion Biotechnology 5:158-162; Vasil et al., 1992, Bio/Technology 10:667-674). Az egyszikűek transzformálásának másik eljárása a protoplasztos transzformációra alapul, amit Omirulleh és munkatársai írtak le (1993, Plant Molecular Biology, 21:415-428).

A transzformációt követően, az expressziós szerkezetet magába foglaló transzformánsok szelektálhatók, és teljes növényre regenerálthatók a tudomány e területén jól ismert eljárásokkal.

A jelen találmány a jelen találmány polipeptidjének előállítására szolgáló eljárásokkal is kapcsolatos, amelynek során (a) a jelen találmány antimikrobiális aktivitásával rendelkező polipeptidet kódoló nukleotid szekvenciát tartalmazó transzgenikus növényt, vagy növényi sejtet olyan körülmények között termesztjük, ami a polipeptid termeléséhez vezet; és (b) a polipeptidet kinyerjük.

Készítmények

Egy további aspektusban a jelen találmány készítményekkel, például a jelen találmány antimikrobiális polipeptidjét tartalmazó gyógyszerészeti készítményekkel kapcsolatos.

A készítmény tartalmazhatja a jelen találmány egy polipeptidjét a fő polipeptid komponensként, például lehet egy mono-komponensű készítmény. Másik lehetőségként, a készítmény tartalmazhat többszörös enzim aktivitásokat, például aminopeptidáz, amiláz, karbohidráz, karboxipeptidáz, kataláz, celluláz, kitináz, kutináz, ciklodextrin, glikozil-transzferáz, dezoxiribonukleáz, észteráz, alfa-galaktozidáz, beta-galaktozidáz, glükóamiláz, alfa-glikozidáz, beta-glükózidáz, haloperoxidáz, invertáz, lakkáz, lipáz, mannozidáz, oxidáz, pektinolitikus enzim, peptidoglutamináz, peroxidáz, fitáz, polifenoloxidáz, proteolitikus enzim, ribonukleáz, transzglutamináz vagy xilánáz aktivitást.

A készítmény a továbbiakban egyéb gyógyszerészetileg aktív anyagot is tartalmazhat, például további biocid anyagot, például egy a fentiekben meghatározott antimikrobiális aktivitást mutató másik antimikrobiális polipeptidet. A biocid anyag lehet antibiotikus, ahogy az a tudomány e területén ismert. Az antibiotikumok osztályába tartoznak például a penicillin G, a penicillin V, a methicillin, az oxacillin, a carbenicillin, a nafcillin, az ampicillin, stb., penicillinek a beta-laktamáz inhibitorokkal együtt, a cephalosporin, például a cefaclor, a cefazolin, a cefuroxime, a moxalactam, stb.; a carbapenemek, a monobactamok, az aminoszteroidok, a tetraciklinek, a makrolidok, a lincomycinek, a polimixinek, a szulfonamidok, a quinolonok, a chloramphenicol, a metronidazol, a spectinomycin, a trimethoprim, a vancomycin, stb. A biocid anyag lehet egy anti-mikotikus anyag is, ideértve a poliéneket, például az amphotericin B, nystatin, az 5-flucosyn és az azolok, például a miconazol, ketoconazol, itraconazol és a fluconazol.

Egy kiviteli alakban a biocid anyag egy nem enzimátikus kémiai anyagot jelent. Egy másik kiviteli alakban a biocid anyag nem-polipeptid kémiai anyagot jelent.

A biocid anyag képes lehet az *Escherichia coli* (DSM 1576) élő sejt számának 1/100 részére csökkentésére 30 percig tartó 20°C hőmérsékleten végzett inkubálás után, a biocid anyag 25 (tömeg/tömeg)%-os vizes oldatában; előnyösen 10%-os vizes oldatában, még előnyösebben 5%-os vizes oldatában, még előnyösebben 1%-os vizes oldatában, még előnyösebben 0,5%-os vizes oldatában és különösen előnyösen 0,1%-os vizes oldatában.

A biocid anyag képes lehet arra is, hogy gátolja az *Escherichia coli* (DSM 1576) szaporodását 24 órán keresztül 25°C hőmérsékleten mikrobiális szaporító tenyésztápközegben, ha 1000 ppm koncentrációban alkalmazzuk, előnyösen 500 ppm koncentrációban, még előnyösebben ha 250 ppm koncentrációban adjuk hozzá és még előnyösebben, ha 100

ppm koncentrációban adjuk hozzá, és legelőnyösebben, ha 50 ppm koncentrációban adjuk, különösen ha 25 ppm koncentrációban adjuk hozzá.

A biocid anyag képes lehet arra, hogy 1/100 részére csökkentse a *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) élő sejtszámát 30 perc inkubálás után, 20°C hőmérsékleten, a biocid anyag 25 (tömeg/tömeg)%-os vizes oldatában, előnyösen 10%-os vizes oldatában, még előnyösebben 5%-os vizes oldatában, még előnyösebben 1%-os vizes oldatában, még előnyösebben 0,5%-os vizes oldatában, és különösen előnyösen 0,1%-os vizes oldatában.

A biocid anyag képes lehet arra is, hogy gátolja a *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) szaporodását 24 órán keresztül 25°C hőmérsékleten mikrobiális szaporító tenyésztápközegben, ha 1000 ppm koncentrációban alkalmazzuk, előnyösen 500 ppm koncentrációban, még előnyösebben, ha 250 ppm koncentrációban adjuk hozzá és még előnyösebben, ha 100 ppm koncentrációban adjuk hozzá, és legelőnyösebben, ha 50 ppm koncentrációban adjuk, különösen ha 25 ppm koncentrációban adjuk hozzá.

A jelen találmány antimikrobiális polipeptidje és a készítmény biocid anyaga kiválasztható úgy, hogy szinergista antimikrobiális hatást érzünk el.

Az antimikrobiális polipeptid és a készítmény biocid anyaga megválasztható úgy is, hogy az *Escherichia coli* (DSM 1576) élő sejtszáma legalább 5%-kal (előnyösen legalább 10%-kal) jobban csökkenjen, ha a baktériumot 10 percig inkubáljuk 20°C hőmérsékleten a biocid anyag 50 (tömeg/tömeg)%-os vizes oldatában (előnyösen 25%-os, még előnyösebben 10%-os, még előnyösebben 5%-os vizes oldatában) és 0,5 ppm (előnyösen 0,1 ppm) antimikrobiális polipeptid koncentrációjával, mintha a biocid anyaggal és az antimikrobiális

polipeptiddel külön-külön történő inkubálás eredményeit összeadjuk és az eredményt ehhez hasonlítjuk, azaz egyszerű additív hatás esetén.

Az enzimatikus komponens és a készítmény biocid anyaga megválasztható úgy is, hogy az *Escherichia coli* (DSM 1576) szaporodása 25°C hőmérsékleten, 500 ppm (előnyösen 250 ppm, még előnyösebben 100 ppm, még előnyösebben 50 ppm) biocid anyagot és 0,5 ppm (előnyösen 0,1 ppm) antimikrobiális polipeptidet tartalmazó mikrobiális szaporító szubsztráton legalább 5%-kal (előnyösen legalább 10%-kal) gátlódjon hosszabb ideig, mint amikor a biocid anyaggal és az antimikrobiális polipeptiddel külön-külön végzett inkubációval kapott eredményeket összeadjuk, azaz egyszerű additív hatás esetén.

Az antimikrobiális polipeptid és a készítmény biocid anyaga megválasztható úgy is, hogy a *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) élő sejtszáma legalább 5%-kal (előnyösen legalább 10%-kal) jobban csökkenjen, ha a baktériumot 10 percig inkubáljuk 20°C hőmérsékleten a biocid anyag 50 (tömeg/tömeg)%-os vizes oldatában (előnyösen 25%-os, még előnyösebben 10%-os, még előnyösebben 5%-os vizes oldatában) és 0,5 ppm (előnyösen 0,1 ppm) antimikrobiális polipeptid koncentrációjával, mintha a biocid anyaggal és az antimikrobiális polipeptiddel külön-külön történő inkubálás eredményeit összeadjuk és az eredményt ehhez hasonlítjuk, azaz egyszerű additív hatás esetén.

Az enzimatikus komponens és a készítmény biocid anyaga megválasztható úgy is, hogy a *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) szaporodása 25°C hőmérsékleten, 500 ppm (előnyösen 250 ppm, még előnyösebben 100 ppm, még előnyösebben 50 ppm) biocid anyagot és 0,5 ppm (előnyösen 0,1 ppm) antimikrobiális polipeptidet tartalmazó mikrobiális szaporító szubsztráton legalább 5%-kal (előnyösen legalább 10%-kal) gátlódjon hosszabb ideig, mint amikor a biocid anyaggal és az antimikrobiális polipeptiddel külön-külön végzett inkubációval kapott eredményeket összeadjuk, azaz egyszerű additív hatás esetén.

A készítmény tartalmazhat megfelelő hordozó anyagot is. A készítmények tartalmazhatnak megfelelő bejuttató eszközt is, amely képes a jelen találmány antimikrobiális polipeptidjét bejuttatni a kívánt lókuszbba, ha a készítményt gyógyszerként használjuk.

A készítmény előállítható a tudomány e területén ismert eljárásokkal és lehet folyadék vagy száraz készítmény formájában. Például a polipeptid készítmény lehet granulátum vagy mikrogranulátum formájában. A készítménybe szánt polipeptid stabilizálható a tudomány e területén ismert eljárások szerint.

A jelen találmány polipeptid készítményei előnyös alkalmazásainak példáit az alábbiakban adjuk meg. A jelen találmány polipeptid készítményének dózisa és az egyéb körülmények, amelyek között a készítményt használjuk, a tudomány e területén ismert eljárások alapján határozhatók meg.

Eljárások és alkalmazások

A jelen találmány magába foglalja az antimikrobiális polipeptidek különböző alkalmazásait is. Az antimikrobiális polipeptidek tipikusan bármely olyan helyen alkalmazhatók, amelyek baktériumos, gombás, élesztős vagy algás szennyeződésnek vannak kitéve. Tipikusan ezek a helyek vizes rendszerek, például hűtővizes rendszerek, mosodai öblítővíz, olaj rendszerek, például hulladék olaj, lubrikáló anyagok, olajmezők és más hasonló, ahol szükség van a mikroorganizmusok elpusztítására vagy ahol szaporodásukat gátolni kell. Azonban a jelen találmány felhasználható minden olyan alkalmazásban is, ahol az ismert antimikrobiális készítmények hasznosak, például fa, latex, ragasztóanyag, enyv, papír, kartonpapír, textil, bőr, műanyagok, tömítések és takarmány védelmében.

Az egyéb alkalmazások közé tartoznak az élelmiszer, ital, kozmetikai szerek, például tejek, krémek, gélek, kenőcsök, szappanok,

samponok, kondicionálók, izzadásgátlók, dezodorok, szájöblögető szerek, kontaktlencse termékek, enzim készítmények vagy élelmiszer alkotórészek tartósítása.

Így, a jelen találmány antimikrobiális polipeptidjei felhasználhatók fertőtlenítőszerként, például acne, szem vagy száj-fertőzések, bőrfertőzések kezelésében, izzadásgátlókban vagy dezodorokban, láb áztató sókban, kontaktlencsék tisztításához és fertőtlenítéséhez, kemény felületek, fogak (orális gondozás), sebek, horzsolások és más hasonló kezelésében.

Általánosságban, azt tartjuk, hogy a jelen találmány antimikrobiális polipeptidjei hasznosak tisztításhoz és fertőtlenítéshez, vagy a mikrobiális szaporodás gátlásához bármilyen kemény felületen. A jelen találmány antimikrobiális polipeptidjével előnyösen érintkezésbe hozható felületekre példák a feldolgozó gépek felületei, például a tejgazdasági, kémiai vagy gyógyszeripari feldolgozó üzemek, a víz higiéniai rendszerek, az olajfeldolgozó üzemek, a papírpép feldolgozó üzemek, a vízkezelő telepek, és a hűtőtornyok berendezéseinek felületei. A jelen találmány antimikrobiális polipeptidjei olyan mennyiségben használandók, ami hatékonyan tisztítja, fertőtleníti a kérdéses felületet vagy gátolja a mikrobiális szaporodást az ilyen felületeken.

Ezenkívül, úgy véljük, a jelen találmány antimikrobiális polipeptidjei előnyösen alkalmazhatók a helybeni tisztítási (C.I.P.) rendszerben, a bármilyen típusú feldolgozó gép tisztításához.

A jelen találmány antimikrobiális polipeptidjei ezenkívül felhasználhatók élelmiszerfeldolgozó üzemek felületeinek és főzőedényeinek tisztítására, és bármilyen olyan területen, ahol élelmiszert készítenek vagy szolgálnak fel, például kórházakban, szanatóriumokban, éttermekben, különösen gyorséttermekben, csemegeüzletekben és más hasonló helyeken. Felhasználhatók élelmiszeripari termékekben antimikrobiális anyagokként is, és különösen hasznosak felületi

antimikrobiális anyagokként sajtoknál, gyümölcsöknél, zöldségeknél és salátabárok élelmiszereinél.

Felhasználhatók konzerválóanyagként vagy fertőtlenítőszerként vizes alapú festékekben.

A jelen találmány antimikrobiális polipeptidjei hasznosak vízvezetékek mikrobiális szaporodásának gátlására, víz fertőtlenítésre, különösen ipari víz fertőtlenítésére.

A jelen találmány kapcsolatos a jelen találmány antimikrobiális polipeptidjének vagy készítményének gyógyszerként való alkalmazásával is. Ezenkívül, a jelen találmány antimikrobiális polipeptidje vagy készítménye felhasználható olyan gyógyszer előállítására is, amely mikroorganizmusok, például gombák, vagy baktériumok, előnyösen gram pozitív baktériumok elleni védekezésre használható.

A jelen találmány antimikrobiális polipeptidje vagy készítménye felhasználható antimikrobiális állatorvosi vagy humán terápiás vagy profilaktikus anyagként is. Így a jelen találmány antimikrobiális polipeptidje vagy készítménye felhasználható mikrobiális, például bakteriális vagy gombás, előnyösen gram pozitív bakteriális fertőzések kezelésére szolgáló állatorvosi vagy humán terápiás vagy profilaktikus anyagok előállítására. Nevezetesen a mikrobiális fertőzés összefüggésben lehet a tüdő betegségeivel, ideértve az ezekre való korlátozás nélkül a tuberculózist, a cisztás fibrózist, a szexuális úton terjedő betegségeket, ideértve az ezekre való korlátozás nélkül a gonorrhéát és a chlamydiát.

A jelen találmány készítménye a jelen találmány antimikrobiális polipeptidjének hatékony mennyiségét tartalmazza.

A „hatékony mennyiség” kifejezés a jelen találmány szerinti használatban a 2. számú szekvencia 1-40 aminosavaiként bemutatott aminosav szekvenciát, vagy ennek egy fragmentjét vagy variánsát

tartalmazó antimikrobiális polipeptid olyan mennyiségét jelenti, ami hatékonyan gátolja a kérdéses mikroorganizmus szaporodását.

A jelen találmány kapcsolatos sebgyógyító készítményekkel vagy termékekkel, például kötszerekkel, orvosi eszközökkel például katéterekkel, valamint korpásodás elleni haj termékekkel, például samponokkal.

In vitro szintézis

A jelen találmány antimikrobiális polipeptidjei előállíthatók in vitro szintézissel, a tudomány e területén ismert hagyományos eljárásokat használva. Különböző kereskedelmi szintetikus készülékek kaphatók, például automatizált szintetizátorok, melyeket az Applied Biosystems, Inc, a Beckman cég, stb. gyártanak. Szintetizátorokat használva, a természetesen előforduló aminosavak nem természetes aminosavakkal, főként D-izomerekkel (vagy D-formákkal), például D-alanin és D-izoleucin, diasztereoizomerekkel, különböző hosszúságú és funkciócsoportokkal rendelkező oldalláncokkal rendelkező aminosavakkal, és más hasonló aminosavakkal helyettesíthetők. Az adott szekvenciát és az előállítás módját a megvalósíthatóság, a gazdasági szempontok, a kívánt tisztaság és más hasonló tényezők határozzák meg.

Kémiai kötés biztosítható a kötéshez való megfelelő funkciócsoportokat tartalmazó különböző peptidhez vagy proteinekhez, például aminosavak az amid vagy helyettesített aminosavak előállításához, például redukáló aminosavakhoz, tiolcsoportok a tioéter vagy diszulfid létrehozásához, karboxilcsoportok az amid létrehozásához, és más hasonlóak.

Szükség esetén, különböző csoportok juttathatók be a peptidbe a szintézis során, vagy az expresszió alatt, ami lehetővé teszi az egyéb molekulákhoz vagy egy felülethez való kötődést. Így ciszteinek

használhatók tioéterek létrehozásához, hisztidinek egy fémion komplexhez való kötéséhez, karboxilcsoportok az amidok vagy észterek létrehozásához, aminosocsoportok amidok létrehozásához, és más hasonlóak.

A polipeptidek izolálhatók és tisztíthatók a rekombináns szintézis megfelelő módszerei szerint is. Az expressziós gazda lizátuma is előállítható, és a lizátum tisztítható HPLC-vel, exklúziós kromatográfiával, gélelektroforézissel, affinitás kromatográfiával vagy egyéb tisztítási technikával. A legtöbbször, a használt készítmények legalább 20 tömeg%-ban tartalmazzák a kívánt terméket, még gyakrabban legalább 75%-ban, előnyösen legalább 95%-ban, és terápiás célokból általában legalább körülbelül 99,5%-ban, az előállítási és tisztítási eljárással kapcsolatos szennyeződésekhez képest. Általában a százalék a teljes protein mennyiségen alapul.

Állati takarmány

A jelen találmány az antimikrobiális aktivitással rendelkező polipeptidek állati takarmányban való használatával is kapcsolatos, valamint a jelen találmány antimikrobiális polipeptidjeit tartalmazó takarmány készítményekkel és takarmány adalékokkal.

Az állat kifejezés minden állatot magába foglal, beleértve az embereket is. Az állatokra példák, a nem kérődző és a kérődző állatok, például a szarvasmarha, a birka, és a ló. Egy különös kiviteli alakban az állat nem kérődző állatot jelent. A nem kérődző állatok egy-egyomrú állatot jelentenek, például malacokat és sertéseket (ideértve az ezekre való korlátozás nélkül a kismalacokat, a südő malacokat és a kocákat), a szárnyasokat, például a pulykát és a csirkét (ideértve az ezekre való korlátozás nélkül a broiler csirkét és a tojótyúkokat), a fiatal borjakat és a halat (ideértve, de nem egyedül erre korlátozódva, a lazacot).

A takarmány, vagy takarmány készítmény kifejezés bármilyen vegyületet, készítményt, keveréket magába foglal, ami alkalmas az állatok etetésére, vagy amit erre szántak.

A jelen találmány használatában az antimikrobiális polipeptid feleltethető az állattal az etetés előtt, után vagy azzal egy időben. Ez utóbbit részesítjük előnyben.

Egy különös kiviteli alakban az antimikrobiális polipeptid, abban a formában, amiben a takarmányhoz adjuk, vagy amiben a takarmány adalékban felhasználjuk, jól definiált. A jól definiált kifejezés azt jelenti, hogy az antimikrobiális polipeptid készítmény legalább 50%-os tisztaságú, amint azt méret exklúziós kromatográfiával meghatároztuk (lásd a WO 01/58275 szabadalom 12. példáját). Egy másik különös kiviteli alakban az antimikrobiális polipeptid készítmény legalább 60, 70, 80, 85, 88, 90, 92, 94 vagy legalább 95%-ban tiszta, ahogy azt a jelen módszerrel meghatároztuk.

Egy jól definiált antimikrobiális polipeptid készítmény előnyös. Például, sokkal könnyebb a takarmányhoz helyesen dozírozni az antimikrobiális polipeptidet, ha az lényegében interferáló vagy szennyező egyéb antimikrobiális polipeptidektől mentes. A dózis kifejezés helyesen utal, különösen a konzisztens és állandó eredmények kinyerésének céljára, és a kívánt hatásokra alapuló dózis optimalizálás képességére.

Az állati takarmányban való alkalmazáshoz az antimikrobiális polipeptid nem kell olyan tiszta legyen, tartalmazhat például egyéb enzimeket, ez esetben antimikrobiális polipeptid készítménynek nevezhető.

Az antimikrobiális polipeptid készítmény (a) közvetlenül a takarmányhoz adható (vagy zöldség proteinek kezelési eljárásában közvetlenül alkalmazható), vagy (b) használható egy vagy több köztes készítmény előállításában, például adalékok vagy premixek előállításában, amelyeket ezt követően adunk a takarmányhoz (vagy

használunk a kezelési eljárásban). A fent említett tisztaság mértéke az eredeti antimikrobiális polipeptid készítmény tisztaságára utal, akár a fenti (a) vagy (b) szerint használjuk.

Az ilyen mértékű tisztasággal jellemzett antimikrobiális polipeptid készítmények kinyerhetők rekombináns termelési eljárásokkal, holott nem nyerhetők ki olyan könnyen, és adagonként sokkal nagyobb eltérések jellemzőek rájuk, ha az antimikrobiális polipeptidet hagyományos fermentációs eljárásokkal állítjuk elő.

Az ilyen antimikrobiális polipeptid készítmények természetesen összekeverhetők egyéb enzimekkel.

A zöldség protein kifejezés a találmány szerinti használatban bármilyen vegyületre, készítményre vagy keverékre utal, ami legalább egy olyan proteint magába foglal, ami zöldségből származik, ideértve a módosított proteineket és a protein származékokat. Speciális kiviteli alakokban a zöldség proteinek protein tartalma legalább 10, 20, 30, 40, 50 vagy 60 tömeg/tömeg%.

A zöldség proteinek származhatnak zöldség protein forrásból, például pillangósokból és gabonákból, például a *Fabaceae* (*Leguminosae*), *Cruciferaeae*, *Chenopodiaceae* és *Poaceae* családba tartozó növények anyagaiból, például lehet szójabab liszt, csillagfürt liszt és repcemag liszt.

Egy speciális kiviteli alakban a zöldség protein forrás a *Fabaceae* családba tartozó egy vagy több növényt jelenti, például szóját, csillagfürtöt, borsót vagy babot.

Egy másik speciális kiviteli alakban a zöldség protein forrás a *Chenopodiaceae* családba tartozó egy vagy több növény anyagát jelenti, például répát, curkorrépat, spenótot vagy kvinoát.

Az egyéb zöldség protein forrásokra példák a repcemag és a káposzta.

A szójabab előnyös zöldség protein forrás.

A zöldség proteín forrásra további példák a gabonák, például az árpa, a búza, a rozs, a zab, a kukorica, a rizs és a cirok.

Az antimikrobiális polipeptid bármilyen formában hozzáadható a takarmányhoz, legyen az egy viszonylag tiszta antimikrobiális polipeptid, vagy az állati takarmányhoz hozzáadandó egyéb alkotórészek keveréke, azaz lehet állati takarmány adalék formájában, például az állati takarmányhoz való úgynevezett premixek formájában.

Egy további aspektusban a jelen találmány az állati takarmányokban használandó készítményekkel is kapcsolatos, például állati takarmánnyal, állati takarmány adalékokkal, például premixekkel.

A jelen találmány antimikrobiális polipeptidjétől eltekintve a jelen találmány állati takarmány adalékai legalább egy zsírban oldódó vitamint és/vagy legalább egy vízoldható vitamint és/vagy legalább egy nyomelemet és/vagy legalább egy makroelemet tartalmaznak.

Ezenkívül, adott esetben, takarmány adalék alkotórészek a színezőanyagok, az aroma vegyületek, a stabilizátorok, és/vagy legalább egy enzim, ami lehet EC 3.1.3.8 vagy 3.1.3.26 fitáz; EC 3.2.1.8 xilanáz, EC 3.2.1.89 galaktanáz; és/vagy EC 3.2.1.4. béta-glükanáz.

Egy különös kiviteli alakban ezek az egyéb enzimek jól definiáltak (mint azt fent definiáltuk az antimikrobiális polipeptid készítmények esetében).

Az egyéb antimikrobiális peptidekre (AMP-kre) példák a CAP18, a Leucocin A, a Tritrpticin, Protegrin-1, Thanatin, Defensin, Ovispirin, például a Novispirin (Robert Lehrer, 2000) és ezek antimikrobiális aktivitást megtartó variánsai vagy fragmentjei.

Az egyéb gombaellenes polipeptidekre (AFP-kre) példák az *Aspergillus giganteus* és az *Aspergillus niger* peptidek, valamint ezek gombaellenes aktivitást megtartó variánsai és fragmentjei, ahogy a WO 94/01459 és PCT/DK02/00289 (ha közzéteszik a WO számmal helyettesítendő) szabadalmakban leírásra kerültek.

Általában a zsír- és vízoldható vitaminok, valamint a nyomelemek a takarmány adaléknak szánt, úgynevezett premixek részét alkotják, míg a makroelemeket általában külön adják a takarmányhoz. Ezen készítmények bármelyik típusáról is legyen szó, ha a jelen találmány szerinti antimikrobiális polipeptiddel dúsítjuk, az a jelen találmány szerinti állati takarmány adalékot jelent.

Egy különös kiviteli alakban a jelen találmány állati takarmány adalékát úgy tervezzük (vagy úgy írjuk elő), hogy az állati étrendnek vagy takarmánynak 0,01 – 10,0%-a, még specifikusabban 0,05-5,0%-a, vagy 0,2-1,0%-a legyen (a % gramm adalékot jelent 100 g takarmányra nézve). Ez különösen a premixek esetében igaz.

A következők az ilyen alkotórészek nem kizáró jellegű példáit jelentik:

A zsíroldható vitaminokra példák az A vitamin, a D3 vitamin, az E vitamin és a K vitamin, például a K3 vitamin.

A vízoldható vitaminokra példák a B12 vitamin, a biotin és a kolín, a B1 vitamin, a B2 vitamin, a B6 vitamin, a niacin, a folsav és a pantotenát, például a Ca-D-pantotenát.

A nyomelemekre példák a mangán, a cink, a vas, a réz, a jód, a szelén és a kobalt.

A makro ásványi anyagokra példák a kalcium, a foszfor és a nátrium.

Ezen alkotórészek táplálkozási szükséglete (szárnyasok és malacok esetében bemutatott példákkal) a WO 01/58275 szabadalom A táblázatában található. A táplálkozási szükséglet azt jelenti, hogy ezeket az alkotórészeket a jelölt koncentrációkban kell biztosítani az étrendben.

Másik lehetőségként, a jelen találmány állati takarmány adaléka a WO 01/58275 szabadalom A táblázatában felsorolt egyes alkotórészekből legalább egyet tartalmaz. A legalább egy kifejezés egy vagy több, egy, vagy kettő, vagy három, vagy négy, stb., akár mind a

tizenhárom, vagy akár mind a tizenöt egyedi alkotórészt jelent. Még specifikusabban, ez a legalább egy egyedi alkotórész olyan mennyiségben szerepel a jelen találmány adalékában, hogy az A táblázat 4-es, vagy 5-ös vagy 6-os oszlopában jelölt határértékek közé tartozó takarmányon belüli koncentrációt biztosítsa.

A jelen találmány állati takarmány készítményekkel is kapcsolatos. Az állati takarmány készítmények vagy étrend viszonylag magas protein tartalmú. A szárnyas és malactápok a WO 01/58275 szabadalom B táblázatának 2-3-as oszlopában jelöltek szerint jellemezhetők. A haltápok ugyanezen B táblázat 4-es oszlopában jelöltek szerint jellemezhetők. Ezenkívül, az ilyen haltápok általában 200-310 g/kg nyers zsírt tartalmaznak.

A jelen találmány állati takarmány készítményeinek nyers protein tartalma 50-800 g/kg, ezenkívül tartalmaz még legalább egy antimikrobiális polipeptidet, amint azt leírtuk.

Ezenkívül, vagy másik lehetőségként (a fenti nyers protein tartalomtól) a jelen találmány állati takarmány készítményeinek metabolizálható energia tartalma 10-30 MJ/kg; és/vagy kalcium tartalma 0,1-200 g/kg; és/vagy hasznosítható foszfor tartalma 0,1-200 g/kg; és/vagy metionin tartalma 0,1-100 g/kg; és/vagy metionin+cisztein tartalma 0,1-150 g/kg; és/vagy lizin tartalma 0,5-50 g/kg.

Speciális kiviteli alakokban a metabolizálható energia, a nyers fehérje, a kalcium, a foszfor, a metionin, a metionin+cisztein és/vagy lizin tartalom a WO 01/58275 szabadalom B táblázatának 2, 3, 4 vagy 5 (R. 2-5) határértékeinek bármelyikébe esik.

A nyers fehérjét nitrogénként (N) számítjuk ki 6,25-ös szorzófaktorral, azaz Nyers fehérje (g/kg)=N(g/kg) x 6,25. A nitrogén tartalmat Kjeldahl módszerrel határozzuk meg (A.O.A.C. 1984, Official Methods of Analysis 14. kiadás, Association of Official Analytical Chemists, Washington DC).

A metabolizálható energia az NRC publikáció „Tápanyag szükséglet sorozatokban” része alapján számítható ki, (9. átdolgozott kiadás, 1988, Sertés Takarmányozási Albizottság, Állati Takarmányozási Bizottság, Mezőgazdasági Tanács, Nemzeti Kutatási Tanács, National Academy Press, Washington, D.C., pp2-6, és a European Table of Energy Values for Poultry Feed-stuffs, Spelderholt centre for poultry research and extension, 7361 DA, Beekberge, The Netherlands. Grafisch Bedrijf Ponsen & Iooijen bv Wageningen, ISBN 90-71463-12-5).

Az étrend kalcium, hasznosítható foszfor és aminosav tartalmát a teljes állati takarmányban takarmány táblázatok alapján számoljuk ki (Veevoedertabel 1997, gegevens over chemische samenstelling, verteerbaarheid en voederwaarde van voedermiddelen, Central Veevoederbureau, Rundeweg 6, 8219 pk Lelystad, ISBN 90-72839-13-7).

Egy specifikus kiviteli alakban a jelen találmány állati takarmány készítménye legalább egy zöldség proteint vagy protein forrást tartalmaz, ahogy korábban meghatároztuk.

Egy megint más, specifikus kiviteli alakban a jelen találmány állati takarmány készítménye 0-80-% kukoricát, és/vagy 0-80% cirkot, és/vagy 0-70% búzát, és/vagy 0-70% árpát, és/vagy 0-30% zabot, és/vagy 0-40% szója lisztet, és/vagy 0-10% hallisztet, és/vagy 0-20% tejsavót tartalmaz. Az állati takarmányok például előállíthatók őrölt takarmányként (nem pelletizált) vagy pelletizált takarmányként. Tipikusan az őrölt takarmányt összekeverjük és megfelelő mennyiségű esszenciális vitamint és ásványi anyagot adunk hozzá a kérdéses fajra vonatkozó specifikációnak megfelelően. Az enzimek szilárd vagy folyékony enzim készítmények formájában adhatók hozzá. Például, egy szilárd enzim készítményt tipikusan a keverési lépés előtt vagy alatt adunk hozzá, és a folyékony enzim készítményt tipikusan a pelletizáló lépés után adjuk hozzá. Az enzim beépíthető a takarmány adalékba vagy a premixbe is.

A takarmányban a végső enzim koncentráció 0,01-200 mg enzim proteínt jelent takarmány kg-onként, például 5-30 mg enzim proteínt állati takarmány kg-onként.

Az antimikrobiális polipeptid az alábbi mennyiségekben adható (ezek közül egy vagy több)(dózis határok): 0,01-200, vagy 0,01-100, vagy 0,05-100, vagy 0,05-50, vagy 0,10-10 – az összes határérték mg antimikrobiális polipeptid proteínt jelent takarmány kg-onként (ppm).

A takarmány kg-onkénti antimikrobiális polipeptid proteín mg mennyiségek meghatározásához az antimikrobiális polipeptidet kitisztítjuk a takarmány készítményből, és a tisztított antimikrobiális polipeptid specifikus aktivitását releváns vizsgálati módszereket használva határozzuk meg (lásd az „Antimikrobiális aktivitás, szubsztrátok és vizsgálatok” részeket). A takarmány készítmény antimikrobiális aktivitása meghatározható ugyanazon vizsgálatot használva, és ezen két meghatározás alapján, a dózis kiszámítható mg antimikrobiális polipeptid proteinként kg takarmányra vonatkoztatva.

Ugyanazok az elvek vonatkoznak a mg antimikrobiális polipeptid protein takarmány adalékokban való meghatározására. Természetesen, ha a takarmányhoz vagy az adalékhoz használt antimikrobiális polipeptid mintája rendelkezésre áll, a specifikus aktivitás meghatározható ebből a mintából (nincs szükség arra, hogy az antimikrobiális polipeptidet kitisztítsuk a takarmány készítményből vagy az adalékból).

Detergens készítmény

A jelen találmány antimikrobiális polipeptidjei hozzáadhatók, és így egy detergens készítmény komponenseivé válhatnak.

A jelen találmány detergens készítménye például formulázható kézi, mosodai detergens készítményként, ideértve a mosodai adalék készítményeket, melyek alkalmasak a festett szövetek előkezelésére, a hozzáadott textil lágyító készítmények kiöblítésére, vagy formulázhatók

az általános háztartási kemény felszíni tisztításban használható detergens készítményként. Vagy formulázható kézi vagy gépi mosogatószerként.

Egy specifikus aspektusban a jelen találmány olyan detergens adalékot biztosít, amely tartalmazza a jelen találmány antimikrobiális polipeptidjeit valamint egy felületaktív anyagot. A detergens adalék, valamint a detergens készítmény tartalmazhat egy vagy több enzimet, például proteázt, lipázt, kutinázt, amilázt, karbohidrázt, cellulázt, pektinázt, mannánázt, arabinázt, galaktanázt, xilanázt vagy oxidázt (például lakkázt) és/vagy egy peroxidázt (például haloperoxidázt).

Általánosságban, a választott enzim(ek) tulajdonságai kompatibilisek kell legyenek a kiválasztott detergenssel (azaz pH-optimum, kompatibilitás egyéb enzimátikus és nem enzimátikus alkotórészekkel, stb.), és az enzim(ek) hatékony mennyiségben kell jelen legyen(ek).

Proteázok: a megfelelő proteázok közé tartoznak az állati, zöltség vagy mikrobiális eredetű proteázok. A mikrobiális eredetűeket részesítjük előnyben. Ide tartoznak a kémiaileg módosított vagy protein sebészetileg módosított mutánsok. A proteázok lehetnek szerin proteázok, vagy fém-proteázok (metallo-proteázok), előnyösen alkalikus mikrobiális proteázok, vagy egy tripszin-szerű proteáz. Az alkalikus proteázokra példák a subtilisinek, különösen a *Bacillus*-ból származók, például subtilisin Novo, subtilisin Carlsberg, subtilisin 309, subtilisin 147 és a subtilisin 168 (a WO 89/06279-ben írták le). A tripszin-szerű proteázokra példák a tripszin (például a sertés vagy szarvasmarha eredetű) és a *Fusarium* proteáz (amit a WO 89/06270 és WO 94/25583 szabadalmakban írtak le).

A hasznos proteázokra példák a WO 92/19729, a WO 98/20115, a WO 98/20116 és a WO 98/34946 szabadalmakban leírt variánsok, különösen az alábbi pozíciók egyikében vagy többjében szubsztitúcióval

rendelkező variánsok: 27, 36, 57, 76, 87, 97, 101, 104, 120, 123, 167, 170, 194, 206, 218, 222, 224, 235 és 274.

Lipázok: A megfelelő lipázok közé tartoznak a bakteriális és gomba eredetű lipázok. Idetartoznak a kémiaillag módosított vagy fehérje sebészetiileg módosított mutánsok. A hasznos lipázokra példák a *Humicola*-ból (szinoním a *Thermomyces*), például a *H. lanuginosa*-ból (*T. lanuginosus*) származó lipázok, amint az EP 258 068 és EP 305 216 szabadalmakban leírták, vagy a *H. insolens*-ből származó lipáz ahogy a WO 96/13580 szabadalomban leírták, egy *Pseudomonas* lipáz, például a *P. alcaligenes*-ből vagy a *P. pseudoalcaligenes*-ből (EP218 272) származó, a *P. cepacia*-ból (EP 331 376) a *P. stutzeri*-ből (GB 1.372.034), a *P. fluorescens*-ből, *Pseudomonas* sp SD 705 törzsből (WO 95/06720 és WO 96/27002), a *P. wisconsinensis*-ből (WO 96/12012), a *Bacillus* lipáz, például a *B. subtilis*-ből (Dartois et al., 1993, Biochemica et Biophysica Acta, 1131, 253-360), a *B. stearothermophilus*-ból (JP 64/744992) vagy a *B. pumilis*-ből (WO 91/16422) származó lipázok.

A lipáz variánsok egyéb példái a WO 92/05249, a WO 94/01541, az EP 407 225, az EP 260 105, a WO 95/35381, a WO 96/00292, a WO 95/30744, a WO 94/25578, a WO 95/14783, a WO 95/22615, a WO 97/04079 és a WO 97/07202 szabadalmakban írtak le.

Amilázok: A megfelelő amilázok (alfa és/vagy béta) közé tartoznak a baktérium vagy gomba eredetű amilázok. Idetartoznak a kémiaillag vagy protein sebészetiileg módosított mutánsok. Az amilázok közé tartoznak például a *Bacillus*-ból származó alfa-amilázok, például a *B. licheniformis* speciális törzsből származó, amit részletesen a GB 1.296.839 szabadalomban írtak le.

Hasznos amilázokra példák a WO 94/02597, a WO 94/18314, a WO 96/23873 és a WO 97/43424 szabadalmakban leírt variánsok, különösen az alábbi pozíciók közül egyben vagy több pozícióban szubsztitúcióit tartalmazó variánsok: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154,

156, 181, 188, 190, 197, 202, 208, 209, 243, 264, 304, 305, 391, 408 és 444.

Cellulázok: A megfelelő cellulázok közé tartoznak a bakteriális és gomba eredetű cellulázok. Kémiaileg vagy protein sebészetiileg módosított mutánsok is ide tartoznak. Megfelelő cellulázok közé tartoznak a *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium* nemzetségekből származó cellulázok, például az US 4.435.307 US 5.648.263, az US 5.691.178, az US 5.776.757 és a WO 89/09259 szabadalmakban leírt *Humicola insolens*, a *Myceliophthora thermophila* és a *Fusarium oxysporum* által termelt gomba cellulázok.

Különösen alkalmas cellulázok az alkalikus vagy semleges cellulázok, amelyek színvédő előnyökkel is rendelkeznek. Az ilyen cellulázokra példák az EP 0 495 257, az EP 0 531 372, a WO 96/11262, a WO 96/29397, a WO 98/08940 szabadalmakban leírt cellulázok. A celluláz variánsok egyéb példáit a WO 94/07998, az EP 0 531 315, az US 5.457.046, az US 5.686.593, az US 5.763.254, a WO 95/24471, a WO 98/12307 és a PCT/DK98/00299 szabadalmakban írták le.

Peroxidázok/Oxidázok: Megfelelő peroxidázok/oxidázok közé tartoznak a növényi, bakteriális vagy gomba eredetű enzimek. A kémiaileg vagy protein sebészetiileg módosított mutánsok is ezek közé tartoznak. A hasznos peroxidázok példái közé tartoznak a *Coprinus*-ból, például a *C. cinereus*-ból származó peroxidázok és ezek variánsai, ahogy azt a WO 93/24618, a WO 95/10602 és a WO 98/15257 szabadalmakban leírták.

A detergens enzim(ek) szerepelhetnek a detergens készítményben úgy, hogy egy vagy több enzimet tartalmazó külön adalékot adunk hozzá(juk), vagy úgy, hogy ezen enzimek mindegyikét tartalmazó kombinált adalékot adunk hozzá(juk). A jelen találmány egy detergens adaléka, azaz egy szeparált adalék vagy egy kombinált adalék, formulázható például granulátumként, folyadékként, vagy sűrű

szuszpenzióként stb.. Előnyös detergens adalék készítmények a granulátumok, különösen a nem porlódó granulátumok, a folyadékok, különösen a stabilizált folyadékok vagy a sűrű szuszpenziók.

Nem-porlódó granulátumok hozhatók létre, például az US 4.106.991 és 4.661.452 szabadalmakban leírtak szerint, és adott esetben ezek a tudomány e területén ismert eljárásokkal burkolhatók. A viaszos burkoló anyagokra példák a poli(etilén-oxid) termékek (polietilén-glikol, PEG), amelyek átlagos molekulatömege 1000-20000; az etoxilált nonifenolok, amelyek 16-50 etilén-oxid egységet tartalmaznak, az etoxilált zsíralkoholok, amelyek 12-20 szénatomos alkoholok és amelyekben 15-80 etilén-oxid egység van; a zsíralkoholok, a zsírsavak és a zsírsavak mono-, di- és trigliceridjei. A filmet képző, folyadékágyas technikával való használathoz megfelelő burkoló anyagokra példák a GB 1483591 szabadalomban kerültek leírásra. A folyékony enzim készítmények például stabilizálhatók egy poliol, például propilén glikol, egy cukor, vagy cukor alkohol, tejsav vagy bórsav hozzáadásával megalapozott eljárásokat használva. A védett enzimek előállíthatók az EP 238.216 szabadalomban leírt eljárásoknak megfelelően.

A jelen találmány detergens készítmény bármilyen tetszőleges formátumú lehet, például lehet rúd, tablettá, por, granulátum, pép vagy folyadék. A folyékony detergens lehet vizes, tipikusan akár 70% vizet is tartalmazhat, és 0-30% szerves oldószert, vagy lehet nem vizes detergens is.

A detergens készítmény egy vagy több felületaktív anyagot tartalmaz, amely lehet nem-ionos, ideértve a szemi-poláris és/vagy anionos és/vagy kationos zwitterionos felületaktív anyagot. A felületaktív anyagok tipikusan 0,1-60 tömeg% mennyiségben vannak jelen.

Ha szerepel a készítményben, a detergens tipikusan körülbelül 1% - 40% anionos felületaktív anyagot tartalmaz, például lineáris alkil-benzén-szulfonátot, alfa-olefin-szulfonátot, alkil-szulfátot (zsíralkohol-

szulfátot), alkohol etoxi-szulfátot, szekunder alkán-szulfonátot, alfa-szulfoszírsav-metil-észtert, alkil- vagy alkenil-borostyánkősavat vagy szappant.

Ha szerepel a készítményben, a detergens tipikusan körülbelül 0,2 – 40% nem-íonos felületaktív anyagot tartalmaz, például alkohol-etoxilátot, nonifenol-etoxilátot, alkil-poliglikozidot, alkil-dimetil-amin-oxidot, etoxilált zsírsav-monoetanol-amidot, zsírsav-monoetanol-amidot, polihidroxi-alkil-zsírsav-amidot, vagy glükózamin N-acil-N-alkil származékait („glükamidok”).

A detergens tartalmazhat 0-65% detergens alapozó vagy komplexképző anyagot is, például zeolitot, difoszfátot, triózfoszfátot, foszfonátot, karbonátot, citrátot, nitril-triecetsavat, etilén-diamin-tetraecetsavat, dietilén-triamin-pentaecetsavat, alkil- vagy alkenil-borostyánkősavat, oldható szilikátokat vagy rétegezett szilikátokat (például SKS-6-ot a Hoechst-től).

A detergens tartalmazhat egy vagy több polimert. Példák a karboximetilcellulóz, a poli(vinilpirrolidon), a poli(etilén-glikol), a poli(vinil-alkohol), a poli(vinil-piridin-N-oxid), a poli(vinil-imidazol), a polikarboxilátok, például a poliakrilátok, az almasav/akrilsav kopolimerek és lauril-metakrilát/akrilsav kopolimerek.

A detergens tartalmazhat fehérítő rendszert, amely tartalmazhat H_2O_2 forrást, például perborátot vagy perkarbonátot, ami kombinálható a persavat képző fehérítő aktivátorral, például tetraacetyl-etilén-diaminnal vagy nonanoil-oxi-benzén-szulfonáttal. Másik lehetőségként, a fehérítő rendszer tartalmazhat peroxisavakat, például amid, imid, vagy szulfon típusú peroxisavakat.

A jelen találmány detergens készítményének enzimje(i) stabilizálhatók hagyományos stabilizáló anyagok, például poliol, például propilén-glikol vagy glicerín, egy cukor vagy egy cukoralkohol, tejsav, bórsav, vagy bórsav származék, például aromás borát-észter vagy egy fenil-bórsav származék, például 4-formil-fenil-bórsav használatával, és a

készítmény formulázható a WO 92/19709 és a WO 92/19708 bejelentésekben leírtak szerint.

A detergens tartalmazhat egyéb hagyományos detergens alkotórészeket is, például gyári kondicionálószeret, például agyagot, habzás erősítőt, szappanhab gátlókat, korróziógátló anyagokat, szennyeződést szuszpendáló anyagokat, szennyeződést gátló újraülepítő anyagokat, festékeket, baktericideket, optikai fényesítőszeret, hidrotrop anyagokat, fakulásgátlókat vagy parfümőket.

Jelenleg úgy véljük, hogy a detergens készítményhez bármilyen enzim, és a jelen találmány antimikrobiális polipeptidjei hozzáadhatók olyan mennyiségben, ami megfelel 0,01-100 mg enzim proteinnek mosó folyadék literenként, előnyösen 0,05-10 mg enzim proteinnek mosó folyadék literenként, még előnyösebben 0,1-5 mg enzim proteinnek mosó folyadék literenként, és legelőnyösebben 0,1-1 mg enzim proteinnek mosó folyadék literenként.

A jelen találmány antimikrobiális polipeptidjai ezenkívül beépíthetők a WO 97/07202 (mely a hivatkozás révén részét képezi a jelen találmánynak) bejelentésben leírt detergens készítményekbe is.

A jelen találmányt a továbbiakban az alábbi példákkal szemléltetjük, melyeket nem szabad a jelen találmány körének korlátozásaként tekinteni.

A pufferként és szubsztrátként használt vegyszerek legalább reagens tisztaságú kereskedelmi termékek.

1. példa

A *Pseudoplectania nigrella*-ből származó antimikrobiális polipeptid
azonosítása

Az alábbi módszereket és anyagokat használjuk.

cDNS könyvtárat állítunk elő 5 napig Mex-1 tápközegen indukált *P. nigrella*-ből (a WO 98/38288 nemzetközi szabadalmi bejelentés példájában talált eljárást használva). A PoliA-val dúsított RNS-t tisztítjuk, a cDNS-t szintetizáljuk és a könyvtárat standard molekuláris biológiai eljárásokkal állítjuk elő. Az általános eljárás részletes leírása megtalálható a WO 01/12794 nemzetközi szabadalmi bejelentés példájában. A klónozáshoz használt vektor a pMhas5, melyet a 4. számú szekvenciában mutatunk be, és amely az alábbi tulajdonságokkal rendelkezik:

Tulajdonság	Elhelyezkedés	Leírás
CDS	365-1156	Kanamycin reziszt.
CDS	2232-2387	B-galaktozidáz α -peptid
-10 jel	2189-2192	Shine Dalgarno
Promóter	2101-2189	Lac promóter
Vegyes jellemzők	626-650	KanP1 primer a BACE rendszerhez

1. táblázat. A pMhas5 vektor jellemzői.

Ezen plazmid figyelemreméltó jellegzetessége az, hogy az EcoRI-NotI restriktációs helyek szomszédosak a Lac promóter Shine Dalgarno régiójával. Ez lehetővé teszi, hogy az EcoRI-NotI-hez illesztett cDNS-eket a vektorba klónozzuk, és a kapott szerkezeteket aktívan írjuk át és transzláljuk az *E. coli* gazdába.

A *Pseudoplectania nigrella* könyvtár megszerkesztése és a plazmid készletet eredményező cDNS jel befogása

Egy cDNS plazmid készletet állítunk elő az eredeti cDNS-pMhas5 vektor ligálás összesen 20.000 transzformánsából. A plazmid DNS-t közvetlenül a szilárd LB szelektív tápközegről kinyert telepek készletéből állítjuk elő, a plazmid DNS izolálásához való Qiagen (Qiagen Inc.) protokoll szerint. A plazmid készletet SigA2 transzpozonnal és MuA transzpozázzal kezeljük a transzpozáz gyártójának (Finnzyme, Finland) javaslata szerint. A transzpozon által elősegített jel befogásról szóló általános információ található a WO 01/77315 szabadalmi bejelentésben. A kapott elegyet etanollal kicsapatjuk, hogy eltávolítsuk a feleslegben levő sót, és 1,5 µl-t elektroporáltatunk 20 µl DH10B ultra-kompetens sejtekbe a sejtekkel (Gibco-BRL) adott standard protokollnak megfelelően. Az elektroporáltatott sejteket SOC tápközegben inkubáljuk rázatás mellett (28°C, 2 óra, 250 rpm fordulatszám) a szelektív tápközegre való szélesztés előtt. Három agar tápközeget használunk:

LB + 50 µg/ml kanamycin

LB + kanamycin + 15 µg/ml kloramphenicol vagy

LB + kanamycin + kloramphenicol + 12,5 µg/ml ampicillin.

Az elektroporáció LB + kanamycin+kloramphenicol tápközegre való hígítási szélesztéséből azt határoztuk meg, hogy körülbelül 119.000 telep van jelen, amelyek SigA2 transzpozícióval rendelkező cDNS könyvtár plazmidot tartalmaznak. Összesen 363 telepet nyertünk a kísérletből hármasszelekció alatt. Az összes 363 telepet replika lemezekre tesszük 50 µg/ml ampicillinnel végzett hármasszelekcióra, a valódi jel befogott telepek szelektálása céljából. Összesen 336 telep képes szaporodni a fokozott mennyiségű ampicillin koncentráció mellett, és ezeket minipreppel vizsgáljuk a Qiagen QiaTurbo96 protokoll szerint (Qiagen Inc.). A plazmidokat a transzpozon előre irányuló és fordított primerekkel

(A és B primerek) szekvenáljuk, a WO 01/77315 nemzetközi szabadalmi bejelentés példáiban leírt eljárásnak megfelelően.

A primer: agcgt ttgcg gccgc gatcc (16. számú szekvencia)

B primer: ttatt cggtc gaaaa ggatc c (17. számú szekvencia)

A reakcióhoz a DNS szekvenciát egy AB3700 kapilláris szekvenátoron kapjuk meg. A szekvenciákat hasítjuk, hogy eltávolítsuk a vektor és a transzpozon szekvenciát, valamint az A és B primer leolvasásokat minden egyes összeállított plazmid esetében. Ez 225 összeállított szekvenciát eredményez, amelyeket szekvencia homológia alapján 145 contig-ba (átfedő DNS szakaszok) soroltunk. Az összes 145 contig-ot egymástól függetlenül összerendezés-keresés programmal vizsgáljuk (blasting), és az eredményeket analizáljuk. Egy plazmid (Plectasin_6_B12) némi aminosav homológiát mutat ismert antimikrobiális polipeptidekkel (defenzin-szerű polipeptidekkel).

Az alábbi példákban a jelen találmány antimikrobiális polipeptidjeire „Plectasinként” hivatkozunk.

2. példa

Az Aspergillus expressziós vektor megszerkesztése a Plectasinhoz

A Plectasint kódoló szekvenciát az alábbiak szerint amplifikáljuk a fenti cDNS könyvtárból (lásd a fenti 1. példát): 1 µl cDNS-t (megközelítőleg 10 nanogramm DNS) használunk templátként a PCR reakcióban, a 178-as és 179-es két primerrel.

178-as Primer: tctgg atcca ccatg caatt tacca ccatc ctctc (7. sz. szekvencia)

179-es Primer: tctct cgagc tagta acact tgcaa acaaa gc (8.sz. szekvencia)

Az egyes primerek 10 pmol mennyiségeit használjuk 100 µl reakciótérfogatban. Az anneálási hőmérséklet 55°C, és az extenzió 72°C, 1 percig. Összesen 35 ciklust futtatunk. Expand High Fidelity PCR System-et (Roche) használunk.

A PCR reakció aliquot mennyiségeit 4%-os agaróz gélen szeparáljuk. Két különböző sáv látható: a legszembetűnőbb sáv a körülbelül 300 bp.-nál található és a valamivel gyengébb sáv körülbelül 350 bázispárnál.

Mindkét fragmentet BamH1-gyel és Xho1-gyel emésztetjük, amelyek a PCR primerek által bejuttatott túllógó szakaszokban hasítanak. Az emésztett fragmenteket izoláljuk és a pMT2188 plazmidba klónozzuk, amely egy a pCaHj527 plazmidra alapozott *Aspergillus* expressziós plazmid, (lásd a WO 00/70064 nemzetközi szabadalmi bejelentés példáit), amelyet a PA 2001 00088 Dán szabadalmi bejelentés 7. példájában leírtak szerint szerkesztettük meg. Azt találtuk, hogy a rövidebb fragment tartalmazza a Plectasint kódoló szekvenciát, ahogy azt a jel befogó kísérletben (lásd a fenti 1. példát) meghatároztuk. Ezen rövid PCR fragment szekvenciáját az 5. számú szekvenciában mutatjuk be.

Hasonlóképpen, a hosszabb PCR fragment szekvenciájával kapcsolatban azt állapítottuk meg, hogy tartalmazza a Plectasin kódoló szekvenciát, valamint egy további 58 bp hosszúságú inszertet. Megfigyeltük, hogy az 58 bázispár hosszúságú inszert tartalmazza egy gomba intron konszenzus tulajdonságait, és ezen termék amplifikációját a nem tökéletes intron eltávolítás bizonyítékának tekintjük az mRNS készletben és a származtatott cDNS könyvtárban. A hosszabb PCR fragment szekvenciáját a 6. számú szekvenciában mutatjuk be. A rövidebb PCR termékhez való *Aspergillus* expressziós plazmidot (5. számú szekvencia) pMT2548 plazmidnak nevezzük.

3. példa

A Plectasin expressziója *Aspergillus*ban

A pMT2548 plazmidot a BECh2 *Aspergillus oryzae* törzsbe (a WO 00/39322 nemzetközi szabadalmi bejelentésben írták le) és az MBin118 *Aspergillus niger* törzsbe transzformáljuk. Az egyes törzsekből 30 transzformánst kétszer újra izolálunk szelektív és nem-indukáló körülmények között szacharózt és acetamidot tartalmazó Cove minimál lemezen. A Plectasin expressziójának teszteléséhez, a transzformánsokat 6 napig 30°C hőmérsékleten szaporítjuk 10 ml YPM (2% pepton, 1% élesztőkivonat, 2% maltóz) tápközeget tartalmazó kémcsövekben. A felülúszókat NuPage 10% Bis-Tris SDS géleken (Invitrogen) futtatjuk a gyártó útmutatásának megfelelően, MES futtató pufferben, hogy lehetővé tegyük a szeparálást az alacsony molekulatömegű tartományban. Mindkét *Aspergillus* törzs jól szaporodik, még akkor is, ha a Plectasin expressziójára indukáljuk őket. A Plectasinhoz várt méretű elkülönült sávot a legtöbb transzformánsban láthatjuk, miközben ezt a sávot nem látjuk a nem transzformált BECh2 *A. oryzae* és MBin118 *A. niger* gazda törzsekben. Úgy tűnik, a Plectasin sáv erősebb a BECh2 transzformánsokban, mint az MBin118 transzformánsokban. Úgy becsültük, nagyon durván, és csak a festés mértéke alapján, hogy az ilyen szaporítási körülmények közötti hozam 10-50 mg nagyságrendű szaporító tápközeg literenként.

4. példa

A Plectasin klónozása Öngyilkos Expressziós Rendszerbe (SES-be)

A Plectasin fragmentet PCR-ral amplifikáljuk templátként a teljes hosszúságú Plectasin cDNS-t (Plectasin_6_B12) és a DR34F és DR34R NcoI és XbaI kötő primereket használva.

DR34F: ccggccatgg gatttggatg caatggtcct tggg (9.sz. szekvencia)

DR34R: gccgtctaga gccatctagt aacacttgca aacaaagccc cccttagc
(10.sz.szekvencia)

A PCR amplifikációt PWO DNS polimerázt használva végezzük el a gyártó (Roche Bioscience, CA) útmutatásának megfelelően. A PCR terméket NcoI és XbaI enzimekkel emésztetjük és irányítva inszertáljuk a PHHA és pHH plazmidokba (a WO 00/73433 nemzetközi szabadalmi bejelentés példáiban kerültek leírásra). A kapott plazmidokat pDR-18-plectasinnak nevezzük a peptid citoplazmás expressziójához és pDRS-18-plectasinnak a periplazmás expresszióhoz.

Mindkét plazmid tartalmazza a Plectasin fragment következő aminosav szekvenciáját:

mGFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGGYCAKGGFVCKCY

(11. sz. szekvencia)

ahol m (metionin) nincs jelen a nativ Plectasinban, azonban bejuttatjuk a klónozási eljárás eredményeként.

Az *E. coli* szaporodásának gátlása a Plectasin expresszió során

Annak értékeléséhez, hogy az *E. coli* szaporodása gátolt-e folyadék tápközegben az endogén Plectasin expresszió indukciója során, a következő kísérletet végezzük el, a WO 00/73433 nemzetközi szabadalmi bejelentés példáiban leírtak szerint. Röviden, friss, egy éjszakás sejt tenyészetet – melyek pDRS-18-plectasint, pDR-18-plectasint, pHH-t vagy PHHA-t tartalmaznak - 300-szorosára hígítunk 150 µl LB vagy 0,1% arabinózt tartalmazó LB tápközegbe mikrotiter lemezen, és 37°C hőmérsékleten inkubáljuk erőteljes rázatás mellett. A szaporodási görbét az OD₄₅₀ érték szabályos időközönkénti mérésével követjük nyomon ELISA leolvasót használva. Az eredmények azt mutatják, hogy a Plectasin a sejtszaporodás 41%-át gátolja, ha

közvetlenül a periplazmára irányult, azonban nem befolyásolta a sejtek szaporodását, ha a citoplazmában expresszáldott (lásd az alábbi táblázatot).

Szerkezet	% gátlás
pHH	16
pHH-plectasin (pDRS-18-plectasin)	41
pHHA	12
pHHA-plectasin (pDR-18-plectasin)	13

2. táblázat: A sejt szaporodás gátlása

5. példa

A P. nigrella Plectasin *E. coli*-ba való klónozása, expressziója és aktivitásának becslése

A *P. nigrella*-ból származó Plectasin klónozása pET31b+ plazmidba

A Plectasin antimikrobiális aktivitási vizsgálathoz való előállításához a Plectasint kódoló cDNS-t a pET31b+ expressziós vektorba (Novagen Inc. WI) inszertáljuk. Specifikusan tervezett oligonukleotidokkal (1-es és 2-es Primerek) a Plectasin gént polimeráz láncreakcióval amplifikáljuk PWO DNS polimerázt használva a gyártók (Roche Bioscience, CA) útmutatásának megfelelően.

1-es Primer:

attattcagatgctggatcc gaaaaacctgcgctgcatta tccgcaaaggcatccatc

(12.sz. szekvencia)

2-es Primer

aalaatctcgagttattagc catatttttaatatgatgg atgcccttgcggataatgcg ac

(13. sz. szekvencia)

A szomszédos restrikciós endonukleáz helyek (AlwNI/AvaI) enzimatis emésztése lehetővé teszi, hogy ezt a gént fúziós szerkezetként a pET31b+ plazmidba klónozzuk (a gyártók (New England Biolabs Inc., MA) útmutatásának megfelelő, standard eljárásokkal). Az összes standard protokollt máshol írták le (Sambrook, Fritsch and maniatís, 1989).

A *P. nigrella* Plectasín transzfomálása és expressziója *E. coli*-ban.

A rekombináns pET31b+ plazmidot *E. coli* Novablue-ba transzfomáljuk a gyártók (Novagen) útmutatásának megfelelően. Plazmidot állítunk elő QIAprep Mini Oszlopokat (QIAGEN Inc. CA) használva, és automatizált szekvenálással szekvenáljuk plazmid specifikus primereket (3-as és 4-es primerek) használva.

3-as Primer: tgctagttat tgctcagcgg (14. sz. szekvencia)

4-es Primer: accgtagttg cgcccatcg (15. sz. szekvencia)

Plazmidot transzfomálunk az *E. coli* BLR-DE3 törzsbe a gyártók útmutatásának megfelelően (Novagen). A baktériumokat LB tápközegben szaporítjuk körülbelül 0,8 OD₆₀₀ értékig, és a rekombináns protein szintézist 1 mM IPTG-vel (izopropil beta-D-tiogalaktopiranoziddal) indítjuk. Három órás indukció után a baktériumokat begyűjtjük, 1/10 térfogatú A pufferben (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8) reszuszpendáljuk, majd nyomásos roncsolással (1500 mBar) lizáljuk. A kapott pelletet kétszer mossuk B pufferben (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0,5% TritonX-100, 100 mM NaCl, pH 8). Az összes standard protokollt máshol írták le (Sambrook, Fritsch and Maniatís, 1989).

A *P. nigrella* Plectasín tisztítása *E. coli* inklúziós testekből.

A fenti tisztítási eljárásból kapott pellet tisztított inklúziós testeket tartalmaz. A peptid KSI fúziós partnerből való kiszabadításához savas hidrolízist végzünk egy a Plactasint kódoló génbe N-terminálisan bejuttatott manipulált Asp-Pro helyen. Az inklúziós testeket reszuszpendáljuk 100 mM nátrium-foszfátban (pH 2,3) és egy éjszakán át inkubáljuk 85°C hőmérsékleten. A kapott felülúszó Prolin-Plectasint tartalmaz, és a mintát 100 mM nátrium-foszfáttal (pH 12,3) semlegesítjük. A Prolin-Plectasin azonosságát tömeg-spektrometriával megerősítjük. Az összes standard protokollt máshol írták le (Sambrook, Fritsch and Maniatis, 1989).

Antimikrobiális aktivitás Radiális Diffúziós Vizsgálattal

A korábban leírt protokoll módosított verzióját alkalmazzuk az antimikrobiális aktivitás detektálásához (Lehrer et al., 1991, *Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides*, *J. Immunol. Methods*, 137:167-173). A cél baktériumot (10^6 telepképző egység (cfu)) adunk a 10 ml-nyi alulrétegezett agarózhoz (1% alacsony elektro-endosmosis agaróz, 0,03% Tripticase szója tápleves, 10 mM nátrium-foszfát, pH 7,4, 37°C hőmérséklet). A szuszpenziót INTEGRID petricsészén (Becton Dickinson Labware, NJ) megszilárdítjuk. Három mm-es gél lyukasztót használunk az alulrétegezett agarózon (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) lyukak készítéséhez. A lyukakba mintákat helyezünk, majd a petricsészéket 37°C hőmérsékleten inkubáljuk 3 órán keresztül. Egy takaró réteget öntünk a lemezek tetejére, és a lemezeket (LB tápközeg, 7,5% agar) egy éjszakán keresztül inkubáljuk. Az antimikrobiális aktivitás az üregek körüli bakteriális feltisztulási zónaként látható. Az élő sejteket megfestjük 10 ml 0,2 mM MTT (3-(4,5-Dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium bromid Tiazol-kék) hozzáadásával. Az összes standard protokollt máshol került leírásra (Sambrook, Fritsch and Maniatis, 1989).

A Plectasin *Bacillus subtilis* elleni antimikrobiális aktivitása.

A Plectasin antimikrobiális aktivitásának értékeléséhez rekombináns *Aspergillus oryzae* fermentációs tápleveseit alkalmazzuk kétszeres sorozatos hígításban egy radiális diffúziós vizsgálatban (fent írtuk le). A tesztelés során nagy feltisztulási zónákat láttunk a *Bacillus subtilis* mintáival szemben, a fenti eljárás után. A legnagyobb feltisztulási zónát (15 mm) a nem hígított fermentációs táplevessel kaptuk, míg a nem rekombináns *Aspergillus oryzae*-ből vett minta nem mutatott antimikrobiális aktivitást a *Bacillus subtilis*-sel szemben.

Egy alternatív *E. coli* gazdában inklúziós testekben expresszált Plectasin

Az antimikrobiális aktivitással rendelkező, kinyert Plectasin mennyiségének növeléséhez a Plectasint az *E. coli* Origami-DE3 (Novagen Inc.) törzsben expresszáljuk. Ez a törzs mutációt hordoz a tioredoxin-reduktázt (*trxB*) és a glutation-reduktázt (*gor*) kódoló génekben. A Plectasint kódoló rekombináns pET31B+plazmidot az *E. coli* Origami-DE3 törzsbe transzformáljuk a gyártók (Novagen) útmutatásának megfelelően. A Plectasint tartalmazó inklúziós testek szaporítását, expresszióját és izolálását a fentiekben leírtak szerint (A *P. nigrella* Plectazin transzformálása és expressziója *E. coli*-ban) végeztük. A Plectasin kinyerését a fentiek szerint (A *P. nigrella* Plectasin tisztítása *E. coli* inklúziótestekből) végezzük. Ezt követően, radiális diffúziós vizsgálatot használunk az antimikrobiális aktivitás értékeléséhez (lásd fent: Antimikrobiális aktivitás radiális diffúziós vizsgálattal).

Az eredmények azt mutatják, hogy a Plectasin peptidek termelése az *E. coli* Origami-DE3 törzsben 5-10-szeres növekedést mutat a peptid antimikrobiális aktivitásában. A Plectasin megnövekedett biológiai aktivitását tovább erősítette az a tény, hogy hasonló eredményeket nyertünk egy másik defensin, a humán beta-defensin 3, expressziójával. Arra a következtetésre jutottunk, hogy azok az *E. coli* törzsek, amelyek

lehetővé teszik a diszulfid kötések kialakulását a citoplazmában, általában felhasználhatók a biológiailag aktív defensinek és egyéb diszulfid kötésű antimikrobiális peptidek bioszintézisében.

6. példa

A Plectasinhoz való *Saccharomyces cerevisiae* expressziós vektor megszerkesztése

A Plectasin *S. cerevisiae*-ben való expressziójának értékeléséhez, két különböző plazmid szerkezetet, a pHH3875-öt és pHH3876-ot, hozunk létre. A pHH3875 az *S. cerevisiae*-ből származó alfa-vezetőt kódolja az érett Plectasinhoz fuzionálva. A Plectasin az alfa-vezetőtől leválasztható és érlelhető a KEX2 hasítási szekvencián keresztül. A pHH3876 az alfa-vezetőt a Plectasin pro-régióhoz fuzionáltatva kódolja, amit az érett Plectasin követ. Ebben a szerkezetben egy KEX2 hely van jelen az alfa-vezető és a Plectasin pro-régiója között, míg egy másik KEX2 hely elkülöníti egymástól a Plectasin pro-régióját magától a Plectasintól.

A pHH3875 – alfa vezető/KEX2/Plectasin - megszerkesztése

A Plectasin gént standard PCR reakcióban amplifikáljuk az alábbiakban leírt pHH3875-Forw és pHH3875-Rev primereket használva. A 2. példából származó *Aspergillus* pMT2548 plazmidot használjuk DNS templátként a PCR reakcióban. A kapott DNS fragmentet Qiaquick tisztító kitet (Qiagen) használva tisztítjuk, és XbaI és ClaI restrikciós enzimekkel emésztetjük, amelyek a primerek által bejuttatott túllógó részeket hasítják. A fragmentet tovább tisztítjuk 2% agaróz gélről, és egy *S. cerevisiae* expressziós vektorba ligáljuk, majd XbaI és ClaI enzimekkel emésztetjük. Ez a 2 μ alapú *E. coli* élesztő hordozó vektor a konstitutív tpi promótert használja az alfa-vezető/plectasin fúzió expressziójának irányítására,

beta-laktamázt használ az *E. coli*-ban való fenotípusos szelekcióhoz, és hordozza a Δtpi élesztőben (MT663, a/α , $\Delta tpi/\Delta tpi$, $pep4-3/pep4-3$) való plazmid szelekcióhoz a POT gént.

pHH3875-Forw primer:

gaagg ggtat cgaat gctaa gagag gattt ggaatg caatg gtcct tggga tgagg
(18. sz. szekvencia)

pHH3875-Rev primer:

cttag ttct agact agtaa cactt gcaaa caaag ccccc c
(19. sz. szekvencia)

A pHH3876 – alfa-vezető/KEX2/pro-régió/KEX2 /Plectasin -
megszerkesztése

A pHH3876 plazmid megszerkesztéséhez való protokoll azonos a pHH3875-ével, azzal az eltéréssel, hogy DNS primereket használunk. A pHH3876-hoz az alábbi primereket használjuk:

pHH3876-Forw primer:

gaagg ggtat cgaatg gctaa gagag ccccc cagcc tgttc ccgag gctta cgc
(20. sz. szekvencia)

pHH3876-REV primer (azonos a pHH3875-Rev primerrel):

cttag ttct agact agtaa cactt gcaaa caaag ccccc c
(21. sz. szekvencia)

A Plectasin expressziója *S. cerevisiae*-ben

A pHH3902 (kontroll), a pHH3875 és pHH3876 plazmidokat az *S. cerevisiae* MT633 törzsbe transzformáljuk lítium-acetátos eljárást használva. A pHH3902, pHH3875 és pHH3876 számos transzformánsát

szelektáljuk, SC alap/agar lemezekre (SC alap agart, 2% D-glükózt, 0,02% threonint tartalmaz) szélesztjük, és 30°C hőmérsékleten inkubáljuk a telepek kifejlődéséig.

Az expresszió teszteléséhez az egyes telepeket 10 ml folyékony SC alapba (SC alapot, 2% D-glükózt, 0,02% threonint tartalmaz) inokuláljuk, erős rázatás mellett inkubáljuk 30°C hőmérsékleten, 3 napon át. A felülúszókat 16% Tricin géleken (Novex) futtatjuk, hogy optimális szeparálást kapjunk alacsony molekulatömegű területen. A felülúszókat párhuzamosan koncentrálnak 500 µl-ről 20 µl mennyiségre, mikrocon spin oszlopot alkalmazva 3 kDa molekulatömegű elválasztási méretet használva. A pHH3875 és pHH3876 plazmidokból származó összes minta a várt méretű peptid sávokat mutatja. A koncentrált minták mutatták a legszembetűnőbb sávokat.

A sokkal részletesebb információkhoz, a felülúszókat egy MALDI-típusú tömegspektrométerrel analizáljuk (Voyager DE-Pro a Perseptive Biosystems-től).

A pHH3875 plazmidhoz a fő megfigyelt csúcs a 4410-4411 tömegeknél jelent meg. Ez nagyon közel van a helyesen létrehozott és feldolgozott Plectasin 4402 várt tömegéhez.

A pHH3876 plazmid esetében számos csúcsot megfigyeltünk. A két legszembetűnőbb csúcsot a 4411-4413 és 7870-7871 tömegeknél figyeltük meg. A 4411 csúcs megint csak egyezik a helyesen feldolgozott plectasinnal. A 7870-nél levő csúcs legjobban a félig feldolgozott Plectasinnak felel meg, ahol a Pro-régió nem hasadt le a Plectasinnal. Számos bomlási termék feltehetően a 7870 csúcsnál volt megfigyelhető.

A pHH3875 és pHH3876 plazmidokból származó Plectasin aktivitása

A fent leírt felülúszókat radiális diffúziós vizsgálatban analizáljuk az 5. példában leírt módon.

Plazmid	Normál	Koncentrált
pHH3902	0	0
pHH3875	5	12
pHH3876	8	14

3. táblázat A gátlás körülbelüli zónája (mm).

Meglepő módon, a pHH3876 eredményezte a legnagyobb gátlási zónát, ami több terméket, vagy nagyobb aktivitással rendelkező terméket jelez a pHH3875-höz képest.

A Plectasin variánsok HTP szkrínélése

A Plectasin antimikrobiális aktivitásának további optimalizálásához az aktivitás nagy teljesítményű vizsgálatát végeztük el. Egy ilyen rendszer felállításához a kontroll pHH3902 plazmidot vagy a két Plectasin expressziós plazmidot, a pHH3875-öt és pHH3876-ot, tartalmazó élesztőgomba sejteket 96 üregű mikrotiter lemezekben szaporítjuk. Ésszerű sejtsűrűségnél az élesztőgomba tenyészet 5 vagy 20 μ l mennyiségeit eltávolítjuk a mikrotiter lemezről, és a radiális diffúziós vizsgálatban használjuk fel az 5. példában leírtak szerint. A radiális diffúziós teszt lemezen a feltisztulási zónák egyértelműek voltak a két Plectasin-t termelő (a pHH3875-öt és a pHH3876-ot tartalmazó) törzsből származó felülúszók esetében. Amint fent is megfigyeltük, a feltisztulási zónák nagyobbak a pHH3876-ból származó felülúszók esetében. Nem figyeltünk meg feltisztulási zónákat a kontroll plazmidból. Ez azt jelzi, hogy ez az egyszerű HTP vizsgálat különbséget tud tenni az antimikrobiális aktivitás különböző szintjeit expresszáló élesztőgomba sejtek között, és alkalmas a kívánt aktivitással rendelkező Plectasin variánsok szkrínelésére.

7. példa

Plectasinhoz való indukálható élesztőgomba termelési és a HTP szkrinelő rendszer létrehozása – a pYES2-3902, a pHH3886 (Plectasin) és a pHH3887 (Pro-plectasin) megszerkesztése

Az indukálható expressziós rendszerek értékeléséhez, és a jobb biológiai aktivitással rendelkező Plectasin variánsok azonosításához való HTP szkrinelő rendszer potenciális felállításához, a pYES2 plazmidot használva Plectasint és pro-plectasint kódoló indukálható expressziós vektorokat szerkesztünk meg.

A pYES2 (Invitrogen) plazmid egy 5,9 kb vektor, amelyet rekombináns proteinek és peptidok *Saccharomyces cerevisiae*-ben való indukálható expressziójához terveztünk. A vektor a következőkkel jellemezhető: tartalmaz élesztőgomba GAL1 promótert a galaktóz általi magas szintű indukálható expresszióhoz és glükóz általi represszióhoz. Uracil prototrófiát és ampicillin rezisztenciát használunk a transzformánsok sorrendben élesztőgomba és *E. coli* sejtekben való szelektálásához.

Három plazmidot szerkesztünk meg, egy kontroll plazmidot, a pYES-3902-öt, és két Plectasint kódoló plazmidot, a pHH3886-ot és a pHH3887-et.

Mivel a pYES2 egy nem fúziós vektor, a pHH3902-ből, pHH3875-ből és a pHH3876-ból származó teljes alfa-vezető régiókat PCR amplifikáljuk standard PCR reakcióban. A fragmenteket 2% agaróz gélen futtatjuk, Qiagen tisztító kitet használva tisztítjuk, és HindIII-mal és XbaI-gyel emésztetjük, és a pYES2 plazmid megfelelő helyeire ligáljuk. Ez az alfa-vezetőt a GAL1 promóter elő helyezi. A ligálási keveréket kompetens *E. coli*-ba transzformáljuk. A transzformánsokat újra szélesztjük, és számos egyedi klónt analizálunk a megfelelő méretű inszertet tartalmazó plazmidokra. A végső ellenőrzést DNS szekvenálással végezzük az

AOP107 és AOP446 primereket használva. A plazmidokat pYES-3902 (kontroll), pHH3886 (Plectasin) és pHH3887 (Pro-plectasin) plazmidoknak jelöljük.

AOP107 primer:

caata taaaa aagct agctt tccg

(22. sz. szekvencia)

AOP446 primer:

Ccggc tgaag ctgct atcgg

(23. sz. szekvencia)

A három plazmidot (pYES-3902, pHH3886 és pHH3887) a JG169 élesztőgomba törzsbe transzformáljuk, majd 0,5% glükózt és 1,5% galaktózt tartalmazó lemezekre szélesztjük. A glükóz biztosítja a megfelelő méretű telepek kialakulását, és a glükóz elfogyása után a galaktóz biztosítja a további szaporodást és a Plectasin transzkripciójának és megfelelő termelésének indukcióját. Miután a telepek kialakultak, az indikátor törzs (*B. subtilis*) rétegét (körülbelül 10^6 cfu) rétegezzük a telepekre, és a lemezeket tovább inkubáljuk egy éjszakán át. Ahogy az egyéb, fent leírt élesztőgomba plazmidok esetében látható, a kontroll plazmidot tartalmazó élesztőgomba törzs nem eredményez feltisztulási zónát, míg a pHH3886 és pHH3887 plazmidokat tartalmazó igen. A legnagyobb feltisztulási zónát a Pro-plectasint kódoló pHH3887 esetében figyeltük meg.

8. példa

Plectasinhoz való indukálható élesztőgomba termelési és a HTP
szkrinelési rendszer megszerkesztése – a mutáltatott Plectasin
könyvtárak megszerkesztése

Mutáltatott Plectasin könyvtárakat szerkesztünk meg „error prone” (hibára hajlamos) PCR-rel. A random mutáltatott DNS fragmenteket a pYES-mut és pHH3885-Rev primereket és vagy a pHH3875 (Pro-plectasin) vagy a pHH3876 (Plectasin) templátot használva hozzuk létre 0,5 mM MnCl₂-öt tartalmazó PCR reakcióban.

Primer pYES-mut:

taaatactac tattgccagc attgctgcta aagaagaagg ggtatcgaag gccaaagaga

(24. szekvencia)

Primer pHH3885-Rev:

Tgtaagcgtg acataactaa ttacaatgatg cggccctcta ga

(25. szekvencia)

A fragmenteket 2%-os agaróz gélen futtatjuk, Qiagen tisztító kitért használva tisztítjuk, és a pYES2-3902 plazmidba inszertáljuk. A plazmidokat kompetens JG169 élesztőgomba sejtekbe elektroporáltatjuk.

A két különböző könyvtárat 0,5% glükózt és 1,5% galaktózt tartalmazó nagy agar lemezekre (23cm x 23cm) szélesztjük. 30°C hőmérsékleten 2 napig tartó inkubálás után a könyvtár lemezeket körülbelül 10⁷ cfu *B. subtilis*-t tartalmazó vékony agaróz réteggel felülrétegezzük. A lemezeket tovább inkubáljuk 24 órán keresztül, 30°C hőmérsékleten. Megközelítően 10.000 telepet tesztelünk. A jelentős fellisztulási zónát mutató élesztőgomba telepeket további jellemzés céljából izoláljuk.

A biológiai anyag deponálása

A következő biológiai anyagot deponáljuk a Budapesti Szerződés rendelkezései értelmében a Centraalbureau Voor Schimmelcultures törzsgyűjteménynél ((CBS), Uppsalalaan 8, 3584 CT Utrecht, The Netherlands vagy P.O. Box 85167 3508 AD, Utrecht, The Netherlands), ahol a következő katalógusszámon található:

<u>Deponált anyag</u>	<u>Katalógusszám</u>	<u>Deponálás dátuma</u>
<i>Pseudoplectania nigrella</i>	CBS 444.97	1997. január 28.

A deponálást a Novo Nordisk A/S tette, melyet később a Novozímes A/S lett a jogutóda.

A Pseudoplectania nigrella rendszertani besorolása:

Eukarióta, Gomba, Ascomycota, Pezizomycotina, Pezizomycetes, Pezizales, Sarcosomataceae, Pseudoplectania.

WO 03/044049

PCT/DK02/00781

SEQUENCE LISTING

<110> Novozymes A/S
 <120> Antimikrobiális polipeptidek
 <130> 10212-WO
 <160> 25
 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1
 <211> 288
 <212> DNS
 <213> Pseudoplectania nigrella

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(285)
 <223>

<220>
 <221> sig_peptid
 <222> (1)..(69)
 <223>

<220>
 <221> mat_peptid
 <222> (166)..()
 <223>

<400> 1
 atg caa ttt acc acc atc ctc tcc atc ggt atc acc gtc ttc gga ctt 48
 Met Gln Phe Thr Thr Ile Leu Ser Ile Gly Ile Thr Val Phe Gly Leu
 -55 -50 -45 -40
 ctc aac acc gga gcc ttt gca gca ccc cag cct gtt ccc gag gct tac 96
 Leu Asn Thr Gly Ala Phe Ala Ala Pro Gln Pro Val Pro Glu Ala Tyr
 -35 -30 -25
 gct gtt tct gat ccc gag gct cat cct gac gat ttt gct ggt atg gat 144
 Ala Val Ser Asp Pro Glu Ala His Pro Asp Asp Phe Ala Gly Met Asp
 -20 -15 -10
 gcg aac caa ctt cag aaa cgt gga ttt gga tgc aat ggt cct tgg gat 192

2105

WO 03/044049

PCT/DK02/00781

Ala Asn Gln Leu Gln Lys Arg Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp

-5

-1 1

5

gag gat gat atg cag tgc cac aat cac tgc aag tct att aag ggt tac 240

Glu Asp Asp Met Gln Cys His Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr

10

15

20

25

aag gga ggt tat tgt gct aag ggg ggc ttt gtt tgc aag tgt tac tag 288

Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr

30

35

40

<210> 2

<211> 95

<212> PRT

<213> Pseudoplectania nigrella

<400> 2

Met Gln Phe Thr Thr Ile Leu Ser Ile Gly Ile Thr Val Phe Gly Leu

-55

-50

-45

-40

Leu Asn Thr Gly Ala Phe Ala Ala Pro Gln Pro Val Pro Glu Ala Tyr

-35

-30

-25

Ala Val Ser Asp Pro Glu Ala His Pro Asp Asp Phe Ala Gly Met Asp

-20

-15

-10

Ala Asn Gln Leu Gln Lys Arg Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp

-5

-1 1

5

Glu Asp Asp Met Gln Cys His Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr

10

15

20

25

Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr

30

35

40

<210> 3

<211> 95

<212> PRT

<213> Pseudoplectania nigrella

WO 03/044049

PCT/DK02/00781

<220>

<221> SIGNAL (JEL)

<222> (1) .. (23)

<223>

<220>

<221> PROPEP

<222> (24) .. (55)

<223>

<220>

<221> PEPTIC

<222> (56) .. (95)

<223>

<400> 3

Met	Gln	Phe	Thr	Thr	Ile	Leu	Ser	Ile	Gly	Ile	Thr	Val	Phe	Gly	Leu
1				5					10					15	

Leu	Asn	Thr	Gly	Ala	Phe	Ala	Ala	Pro	Gln	Pro	Val	Pro	Glu	Ala	Tyr
			20					25					30		

Ala	Val	Ser	Asp	Pro	Glu	Ala	His	Pro	Asp	Asp	Phe	Ala	Gly	Met	Asp
		35					40					45			

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

Glu	Asp	Asp	Met	Gln	Cys	His	Asn	His	Cys	Lys	Ser	Ile	Lys	Gly	Tyr
65					70					75				80	

Lys	Gly	Gly	Tyr	Cys	Ala	Lys	Gly	Gly	Phe	Val	Cys	Lys	Cys	Tyr	
				85					90					95	

<210> 4

<211> 2403

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

WO 03/044049

PCT/DK02/00781

<220>

<223> pMHas5 vektor

<400> 4

cgataagcta gcttcacgct gccgcaagca ctcagggcgc aagggctgct aaaggaagcg	50
gaacacgtag aaagccagtc cgcagaaaacg gtgctgaccc cggatgaatg tcagctactg	120
ggctatctgg acaagggaaa acgcaagcgc aaagagaaag caggtagctt gcagtgggct	180
tacatggcga tagctagact gggcggtttt atggacagca agcgaaccgg aattgccagc	240
tggggcgccc tctggtaagg ttgggaagcc ctgcaaaagta aactggatgg ctttcttgcc	300
gccaaaggatc tgatggcgca ggggatcaag atctgatcaa gagacaggat gaggatcgtt	360
tgcgatgatt gaacaagatg gattgcaagc aggttctccg gccgcttggg tggagaggct	420
attcggctat gactgggcac aacagacaat cggctgctct gatgcgcgcg tgttcgggct	480
gtcagcgacg gggcgcccg ttctttttgt caagaccgac ctgtccggtg ccttgaatga	540
actccaagac gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccacg acgggcgctc cttgcgcagc	600
tgtgctcgac gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg ctartgggag aagtgcgcgg	660
gcaggatctc ctgtcactc accttgctcc tgcagagaaa gtatccatca tggctgatgc	720
aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc tacctgcccc ttgcaccacc aagcgaaaca	780
tgcgatcgag cgagcacgta ctgggatgga agccggctct gtgatcagg atgatctgga	840
cgaagagcat caggggctcg cgcagcgga actgttcgac aggtcaagg cgcggatgcc	900
cgacggcgag gatctcgtcg tgacccatgg cgatgcctgc ttgccgaata tcatggtgga	960
aaatggcgcg tttcttgat tcatcgactg tggcgggctg ggtgtggcgg accgctatca	1020
ggacatagcg ttggctaccc gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat gggctgaccc	1080
cttctcgtg ctttaacgta tgcgcgctcc cgattcgag cgcctcgctt tctatcgctt	1140

WO 03/044049

PCT/DK02/00781

tcttgacgag ttctttctgag cgggactctg gggttcgcga tgataagctg tcaaacatga 1200
 gaattacaac ttatatcgta tggggctgac ttragggtgt acatttgaag agataaattg 1250
 cactgaaatc tagaaatatt ttatctgatt aataagatga tctttcttgag atcgttttgg 1320
 tctgcgcgta atctcttgtc ctgaaaaaga aaaaaccgcc ttgcagggcg gtttttcgaa 1380
 ggttctctga gtaccaact ctttgaaccg aggttaactgg cttggaggag cgcagtcacc 1440
 aaaacttgtc ctctcagttt agccttaacc ggcgcctgac ttcaagacta actcctctaa 1500
 atcaattacc agtggctgct gccagtggty cttttgcctg tctttccggg ttggactcaa 1560
 gacgatagtt accggataag gcgcagcggt cggactgaac gggggggttcg tgcatacagt 1620
 ccagcttggg gcgaactgcc tacccggaac tgagtgtcag gcgtgggaatg agacaaacgc 1680
 ggccataaca gcggaatgac accggtaaac cgaaaggcag gaacaggaga gcgcacgagg 1740
 gagccgccag gggaaacgcc tggatatctt atagtcctgt cgggtttcgc caccactgat 1800
 ttgagcgtca gatttcgtga tgcttgcag gggggcggag cctatggaaa aacggctttg 1860
 ccttctttcc tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagttag 1920
 ctgataccgc tgcgcgcagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgage gaggaagcgg 1980
 aagagcgccc aatacycaaa ccgcctctcc ccgcgcgttg gccgattcat taatycagct 2040
 ggcacgacag gtttcccgac tggaaagcgg gcagtgagcg caacgcaatt aatgtgagtt 2100
 agctcactca ttaggcaccc caggctttac actttatgct tcgggctcgt atgttgtgtg 2160
 gaattgtgag cggataacaa ttccacacag gaattcacag ctatgctaga gcggccgctc 2220
 gacctgcagg catgcaagct tggcaactggc cgtcgtttta caacgtcgtg actgggaaaa 2280
 ccttggcgtt acccaactta atcgctttgc agcacatccc cctttcgcca gctggcgtaa 2340
 tagcgaagag gcccgacccg atcgcccttc ccaacagttg cgcagcctga atggcgaattg 2400

WO 03/044049

PCT/DK02/00781

gag

2403

<210> 5

<211> 303

<212> DNS

<213> Pseudoplectania nigrella

<400> 5

```

ggatccacca tgcaatttac caccatcctc tccatcggtg tcacggtctt cggacttctc      60
aacacccggag cctttgcagc accccagcct gttcccgagg cttacgctgt ttctgatccc      120
gaggctcacc ctgacgattt tgctgggatg gatgcgaacc aacttcagaa acgtggattt      180
ggatgcaatg gtcccttggga tgaggatgat atgcagtgcc acaatcactg caagtctatt      240
aagggttaca agggagggtt ttgtgctaag gggggccttg ttgcaagtg ttaactagctc      300
gag                                                                                   303

```

<210> 6

<211> 361

<212> DNS

<213> Pseudoplectania nigrella

<400> 6

```

ggatccacca tgcaatttac caccatcctc tccatcggtg tcacggtctt cggacttctc      60
aacacccggag cctttgcagc accccagcct gttcccgagg cttacgctgt ttctgatccc      120
gaggctcacc ctgacgattt tgctgggatg gatgcgaacc aacttcagaa acgtggattt      180
ggatgcaatg gtcccttggga tgaggatgat atgcagtgcc acaagtaaga atcacttata      240
actatagatt aagccaagag tatttgaact gatgataaat agtcaactgca agtctattaa      300
gggttacaag ggagggttatt gtgctaaggg gggccttggg tgcaagtgtt actagctcga      360

```

9

361

WO 03/044049

PCT/DK02/00781

<210> 7

<211> 35

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> 178-as Primer

<400> 7

tctggatcca ccatgcaatt taccaccatc ctctc

35

<210> 8

<211> 32

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> 179-es Primer

<400> 8

tctctcggagc tagtaacact tgcaaacaaa gc

32

<210> 9

<211> 34

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> DR34F Primer

<400> 9

ccggccatgg gatctggatg caatggctct tggg

34

<210> 10

<211> 48

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

WO 03/044049

PCT/DK02/00781

<220>

<223> DR34R Primer

<400> 10

ggcgcttaga gccatctagt aacacttgca aacaaagcct ccccttagc

48

<210> 11

<211> 41

<212> PRT

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> met-Plectasin

<400> 11

Met Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys

1

5

10

15

His Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala

20

25

30

Lys Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr

35

40

<210> 12

<211> 60

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> 1-es Primer

<400> 12

attattcaga tgcctggatcc gaataaacctg cgtcgacatta tccgcaaagg catccatctc

60

<210> 13

<211> 62

<212> DNS

WO 03/044049

PCT/DK02/00781

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> 2-es Primer

<400> 13

aataatctcg agttattagc catatttttt aatgatatgg atgcctttgc ggataatgcg 60

ac 62

<210> 14

<211> 20

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> 3-as Primer

<400> 14

tgctagttat tgctcagcgg 20

<210> 15

<211> 19

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> 4-es Primer

<400> 15

accgtagttg cgcccatcg 19

<210> 16

<211> 20

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A Primer

WO 03/044049

PCT/DK02/00781

<400> 16

agcggtttgag gccggcgatcc

20

<210> 17

<211> 21

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> B Primer

<400> 17

ttattcggtc gaaaaggatc c

21

<210> 18

<211> 55

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> pHH3875-Forw Primer

<400> 18

gaaggggtat cgatggcraa gagaggattt ggatgcaang gtccttgga tgagg

55

<210> 19

<211> 41

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> pHH3875-Rev Primer

<400> 19

cttagttttt agactagtaa cacttgcaaa caaagccccc c

41

<210> 20

WO 03/044049

PCT/DK02/00781

<211> 53

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> pHH3876-Forw Primer

<400> 20

gaaggggtat cgatggctaa gagagcacc cagcctgttc ccgaggctta cgc

53

<210> 21

<211> 41

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> pHH3876-Rev Primer

<400> 21

cttagtttct agactagtaa cacttgcaaa caaagccccc c

41

<210> 22

<211> 24

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> AOP107-es Primer

<400> 22

caatataaaa aagctagctt tccg

24

<210> 23

<211> 20

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> AOP446-os Primer

WO 03/044049

PCT/DK02/00781

<400> 23

cgggctgaag ctgctatcgg

20

<210> 24

<211> 59

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> pYES-mut Primer

<400> 24

taaatactac tattgccagc attgctgcta aagaagaagg ggtatcgatg gccaaagaga

59

<210> 25

<211> 43

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> pHH3885-Rev Primer

<400> 25

tgtaagcgtg acataactaa ttacatgatg cggccctcta ga

42



SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Polipeptid, amely antimikrobiális aktivitással rendelkezik, azzal jellemezve, hogy a polipeptid lehet:

(a) egy polipeptid, amely olyan aminosav szekvenciát tartalmaz, ami legalább 65%-os azonosságot mutat a 2. számú szekvencia 1-40. aminosavaival,

(b) egy polipeptid, amelyet egy olyan nukleotid szekvencia kódol, ami közepes szigorúsági körülmények között, 0,2 x SSC-vel 42 °C-on történő mosás mellett, hibridizálódik egy olyan polinukleotid próbával, ami:

(i) az 1. számú szekvencia 166-285 nukleotidjainak komplementer szálát;

(ii) az 1. számú szekvencia 70-285 nukleotidjainak komplementer szálát; vagy

(iii) az 1. számú szekvencia 1-285 nukleotidjainak komplementer szálát jelenti; ~~és~~ ^{*} *vagy*

* (c) ~~(d)~~ az (a) vagy (b) pontok egy fragmentje, amely antimikrobiális aktivitással rendelkezik.

2. Az 1. igénypont szerinti polipeptid azzal jellemezve, hogy olyan aminosav szekvenciával rendelkezik, amely legalább 70%-os azonosságot mutat a 2. számú szekvencia 1-40. aminosavaival, előnyösen legalább 80%-os azonosságot, legalább 85%-os azonosságot, legalább 90%-os azonosságot, legalább 95%-os azonosságot, vagy legalább 99%-os azonosságot mutat a 2. számú szekvencia 1-40. aminosavaival.

3. A 2. igénypont szerinti polipeptid azzal jellemezve, hogy a 2. számú szekvencia 1-40. aminosavait tartalmazza.

* *Érvényes, 2010. 11. 03 - a képforgatás alapján, Szendrői László*

2010. 11. 03. Dm's László

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid azzal jellemezve, hogy a 2. számú szekvencia 1-40 aminosavaiból áll.

5. Az 1. igénypont szerinti polipeptid, amelyet egy olyan nukleotid szekvencia kódol, ami közepes-nagy szigorúsági körülmények között, 0,2 x SSC-vel 55 °C-on történő mosás mellett, előnyösen nagy szigorúsági körülmények között, 0,1 x SSC-vel 60 °C-on történő mosás mellett hibridizálódik egy olyan polinukleotid próbával, ami:

(i) az 1. számú szekvencia 166-285 nukleotidjainak komplementer szálát;

(ii) az 1. számú szekvencia 70-285 nukleotidjainak komplementer szálát; vagy

(iii) az 1. számú szekvencia 1-285 nukleotidjainak komplementer szálát jelenti; és

6. Az 5. igénypont szerinti polipeptid, amelyet egy olyan nukleotid szekvencia kódol, ami közepes-nagy szigorúsági körülmények között, 0,2 x SSC-vel 55 °C-on történő mosás mellett, előnyösen nagy szigorúsági körülmények között, 0,1 x SSC-vel 60 °C-on történő mosás mellett hibridizálódik egy olyan polinukleotid próbával, ami az 1. számú szekvencia 166-285 nukleotidjainak komplementer szálát jelenti. ;

7. Polinukleotid azzal jellemezve, hogy olyan nukleotid szekvenciával rendelkezik, ami az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti polipeptidet kódolja.

8. Nukleinsav szerkezet azzal jellemezve, hogy a 7. igénypont szerinti nukleotid szekvenciát tartalmazza, amely működőképesen

kapcsolódik egy vagy több olyan szabályzó szekvenciához, ami a polipeptid megfelelő gazdában való termelését irányítja.

9. Rekombináns expressziós vektor azzal jellemezve, hogy a 8. igénypont szerinti nukleinsav szerkezetet tartalmazza.

10. Rekombináns gazdasejt azzal jellemezve, hogy a 8. igénypont szerinti nukleinsav szerkezetet tartalmaz.

11. Eljárás az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid előállítására azzal jellemezve, hogy

(a) egy a vad formájában a polipeptidet előállítani képes törzset tenyésztünk, a polipeptid előállítása céljából; és

(b) a polipeptidet kinyerjük.

12. Eljárás az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid előállítására azzal jellemezve, hogy

(a) egy a 10. igénypont szerinti rekombináns gazdasejtet tenyésztünk olyan körülmények között, ami a polipeptid termeléséhez vezet; és

(b) a polipeptidet kinyerjük.

13. Eljárás mikrobiális sejtek elpusztítására vagy szaporodásának gátlására, amely nem az emberi vagy állati test kezelését célzó eljárás, azzal jellemezve, hogy a mikrobiális sejteket az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti antimikrobiális polipeptiddel kapcsolatba hozzuk.

14. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti antimikrobiális polipeptid gyógyszerként történő alkalmazásra.

15. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti antimikrobiális polipeptid alkalmazása mikrobiális fertőzés kezelésére vagy profilaktikus felhasználásra szolgáló állatorvosi vagy humán terápiás szer előállítására.

16. Az 1-6. igénypontok legalább egyike szerinti antimikrobiális polipeptid állati takarmányban történő alkalmazása.

A meghatalmazott



Dr. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Szabadalmi Ügyvivői Iroda
tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 461-1000 Fax: 461-1099