

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

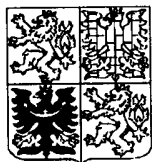
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

1039-90

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **02. 03. 90**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **03.03.89, 06.10.89**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **89/1054, 89/4941**

(33) Země priority: **DK, DK**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17. 03. 99**
(Věstník č. 3/99)

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N	15/81
C 12 N	1/16
C 12 N	15/62
C 07 K	1/00
C 07 K	19/00

(71) Přihlášovatel:

NOVO-NORDISK A/S, Bagsvaerd, DK;

(72) Původce:

Bjorn Soren, Lyngby, DK;

Norris Kjeld, Hellerup, DK;

Norris Fammy, Hellerup, DK;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS Praha a.s., Jívanská 1273,
Praha 4, 14021;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Polypeptid, konstrukce DNA,
rekombinantní expresní vektor a způsob
výroby heterologního polypeptidu a kmen
kvasinek k tomuto účelu**

(57) Anotace:

Polypeptid, obsahující signální peptid, vedoucí peptid a heterologní bílkovinu, přičemž na C-terminálním zakončení vedoucího peptidu a/nebo N-terminálním zakončení heterologní bílkoviny je polypeptid modifikován tak, že místo zpracování je přístupnější proteolytickému štěpení. Toho se dosahuje přidáním jedné nebo většího počtu aminokyselin, z nichž alespoň jedna nese negativní náboj do uvedených míst. Heterologní bílkovinou může být například aprotinin nebo prekursor nebo analog insulinu. Dále je popsána konstrukce DNA, rekombinantní expresní vektor a způsob výroby heterologního polypeptidu v kvasinkách.

CZ 1039-90 A3

Polypeptid, konstrukce DNA, rekombinantní expresní vektor a způsob výroby heterologního polypeptidu *a kmen kvasinky k fermentaci účelu.*

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu výroby heterologních bílkovin nebo polypeptidů expresí vektorů s obsahem řetězců DNA, které jsou kódem pro tyto bílkoviny nebo polypeptidy v buňkách kvasinek, které byly transformovány tímto vektorem.

Dosavadní stav techniky

Kvasinkové organismy produkují řadu bílkovin, které jsou syntetizovány uvnitř buňky, jejich funkce však probíhá mimo buňky. Tyto bílkoviny se obvykle nazývají vyměšované bílkoviny. K jejich expresi dochází uvnitř buňky ve formě prekursoru nebo preproteinu, které obsahují navíc řetězec, který zajišťuje účinný průchod produktu po expresi membránou endoplasmatického retikula (ER). Tento řetězec, obvykle nazývaný signálním peptidem, se obvykle odštěpí z produktu v průběhu jeho přemístění. Jakmile dochází k tomuto pochodu, je bílkovina transportována do Golgiho aparátu. Odtud se může dostat různými cestami do buněčných orgánů, například vakuol, nebo membrány, nebo může být vyloučena do vnějšího prostředí, jak bylo popsáno v publikaci Pfeffer S.R., a Rothman J.E., Ann.Rev.Biochem. 56 (1987), 829 až 852.

Byla navržena řada postupů pro expresi a vylučování heterologních bílkovin kvasinkami. V evropském patentovém spisu č. 88 632A se popisuje postup exprese bílkovin, heterologních, vzhledem ke kvasinkovým buňkám. Podle tohoto postupu dochází k expresi těchto bílkovin v kvasinkách, tyto bílkoviny jsou pak zpracovávány a vylučovány. Kvasinky se transformují vektorem pro expresi s obsahem DNA, která je

kódem pro požadovanou bílkovinu a pro signální peptid, transformovaný organismus se pěstuje a bílkovina se izoluje z živného prostředí. Signálním peptidem může být vlastní signální peptid požadované bílkoviny, heterologní signální peptid nebo hybrid přírodního a heterologního signálního peptidu.

Problém^x spojený s použitím signálních peptidů^x heterologních pro kvasinky^x může spočívat v tom, že tento heterologní peptid nezajišťuje dostatečné translokace a/nebo odštěpení signálního peptidu.

S.cerevisiae MF α 1 (α -faktor) se syntetizuje jako prepro-forma s obsahem 165 aminokyselin, a to 19 aminokyselin v signálním peptidu, nebo-li prepeptidu, 64 aminokyselin ve ^xvedoucím^x peptidu nebo propeptidu, v této části jsou tři glykosylační místa, vázaná na atom dusíku, ^{my}sledovaná řetězcem (LysArg(Asp/Glu, Ala)₂₋₃ α -faktor)₄ podle publikace Kurjan J. a Herskowitz I., Cell 30 (1982), 933 až 943. Uvedený signální a vedoucí peptid preproMF α 1 je často používán k získání heterologních bílkovin v *S.cerevisiae*.

Použití homologních signálních a vedoucích peptidů pro kvasinky je známo například z US patentového spisu č. 4 546 082, z evropských patentových spisů č. 116 201, 123 294, 123 544, 163 529 a 123 289 a z dánského patentového spisu č. 2484/84 a 3614/83.

V evropském patentovém spisu č. 123 289 se popisuje využití prekursoru α -faktoru *S.cerevisiae*, kdežto v dánském patentovém spisu 2484/84 se popisuje využití signálního peptidu invertázy *S.cerevisiae* a v dánském patentovém spisu č. 3614/83 využití signálního peptidu *S.cerevisiae* PH05 pro sekreci cizorodých bílkovin.

V US patentovém spisu č. 4 546 082 a v evropských patentových spisech č. 16 201, 123 294, 123 544 a 163 529 se popisuje postup, při němž se využívá signálního a vedoucího řetězce α -faktoru *S.cerevisiae* (MF α 1 nebo MG α 2) pro vylučování heterologních bílkovin z kvasinek po jejich expresi. Postupuje se tak, že se spojí řetězec DNA, který je kódem pro MF α 1 a signální a vedoucí řetězec *S.cerevisiae* na 5' zakončení genu pro požadovanou bílkovinu s následnou expresí této bílkoviny.

V evropském patentovém spisu 206 783 se popisuje systém pro sekreci polypeptidů u *S.cerevisiae*, V tomto případě byl vedoucí řetězec α -faktoru zkrácen k odstranění čtyř peptidů α -faktoru přírodního vedoucího řetězce, takže vedoucí peptid byl spojen s heterologním polypeptidem přes řetězec α -faktoru LysArgGluAlaGluAla. Tato konstrukce vedla k účinné výrobě malých peptidů s obsahem méně než 50 aminokyselin. Pro sekreci a získání větších polypeptidů byl nativní vedoucí řetězec α -faktoru zkrácen tak, aby byly pouze 1 nebo 2 peptidy α -faktoru mezi vedoucím peptidem a polypeptidem.

Celá řada vylučovaných bílkovin je vystavena proteolytickému systému, který může ^{rychle} odštěpit peptidovou vazbu na zakončení dvou za sebou zařazených aminokyselin, na němž se nachází karboxylová skupina. Tato enzymatická účinnost je v *S.cerevisiae* zakódována jako gen KEX 2, popsáný v publikaci D.A.Julius a další, Cell. 37, (1984), 1075. Gen KEX 2 je nutný pro sekreci aktivního faktoru α 1 *S.cerevisiae* (MF α 1 nebo α -faktor), avšak nikoliv pro sekreci aktivního faktoru α .

Sekrece a správné zpracování polypeptidu, který má být vyloučen, je dosaženo v některých případech při pěstování kvasinek, transformovaných vektorem, jehož konstrukce je uvedena ve svrchu uvedených publikacích. Avšak v řadě případů

v němž X^1 znamená peptidovou vazbu nebo 1-6 aminokyselin, které mohou být stejné nebo různé, X^2 a X^3 , jež mohou být stejné nebo rozdílné, znamenají bázeckou aminokyselinu ze skupiny Lys a Arg, ~~tedy~~ ^{podle toho} X^2 a X^3 definují společně kvasinkové procesní místo a X^4 znamená peptidovou vazbu nebo 1-6 aminokyselin, jež mohou být stejné nebo různé a pokud X^4 znamená jednu nebo více aminokyselin, je vsunuto přídatné procesní místo mezi X^4 a N-konec heterologního proteinu, a za ~~předpokladu~~ ^{podle toho}, že X^1 a/nebo X^4 znamená 1-6 aminokyselin a alespoň jedna z aminokyselin ve významu X^1 a/nebo X^4 znamená negativně nabitou aminokyselinu ze skupiny Glu a Asp a za ~~dalšího~~ ^{podle toho} ~~předpokladu~~, že pokud X^1 znamená peptidovou vazbu, X^4 má jiný význam než Glu-Ala-Glu-Ala, Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala, Glu-Ala-Glu-Ala-Ser-Leu-Asp-Lys-Arg nebo Glu-Ala-Glu-Ala-Ser-Leu-Asp a znamená-li X^4 peptidovou vazbu, X^1 má jiný význam než Ser-Leu-Asp a ještě za ~~dalšího~~ ^{podle toho} ~~předpokladu~~, že sestava signální peptid-vedoucí peptid- X^1 má jiný význam než signální peptid α -faktoru a vedoucí peptid α -faktoru (1-85)-Glu-Ala-Glu-Ala-Ser-Leu-Asp, signální peptid α -faktoru a vedoucí peptid α -faktoru (1-80)-Pro-Leu-Asp, signální peptid α -faktoru a vedoucí peptid α -faktoru (1-80)-Glu-Leu-Asp a Met-Lys-Trp-Val-Ser-Phe-Ile-Ser-Leu-Leu-Phe-Leu-Phe-Ser-Ser-Ala-Tyr-Ser-Arg-Ser-Leu-Asp.

x^2 a x^3 , stejné nebo různé znamenají basicickou aminokyselinu ze skupiny Lys a Arg a tvoří spolu místo pro zpracování kvasinkou,
 x^4 znamená peptidovou vazbu nebo jednu nebo větší počet stejných nebo různých aminokyselin, za předpokladu, že x^1 a/nebo x^4 znamenají jednu nebo větší počet aminokyselin, z nichž alespoň jedna nese negativní náboj a je volena ze skupiny Glu a Asp.

Pod pojmem "signální peptid" se v průběhu přihlášky rozumí řetězec, který se nachází před hlavním řetězcem, má převážně hydrofobní povahu a je zařazen jako N-terminální řetězec prekursorové formy extracelulární bílkoviny, k jejíž expresi dochází v kvasince. Funkcí signálního peptidu je umožnit sekreci heterologní bílkoviny do endoplasmatického retikula. V průběhu tohoto postupu obvykle dochází k odštěpení signálního peptidu. Signální peptid může být heterologní nebo homologní vzhledem k organismu kvasinky, který uvedenou bílkovinu produkuje, avšak, jak již bylo svrchu uvedeno, je možno dosáhnout účinnějšího odštěpení signálního peptidu v případě, že je homologní vzhledem k organismu kvasinky.

Pod pojmem "vedoucí peptid" se rozumí převážně hydrofilní peptid, jehož funkcí je umožnit sekreci heterologní bílkoviny z endoplasmatického retikula do Golgiho aparátu a dále do sekretorického vesicula

pro sekreci do okolního prostředí, tj. buněčnou stěnou nebo alespoň buněčnou membránou do periplasmatického prostoru buňky.

Pod pojmem "heterologní bílkovina" nebo polypeptid" se rozumí bílkovina nebo polypeptid, které nejsou přirozeným produktem hostitelské kvasinky. Pojmy "bílkovina" a "polypeptid" budou v průběhu přihlášky užívány také střídavě vzhledem k tomu, že jejich význam je v podstatě stejný.

K modifikaci polypeptidu dochází v místě zpracování, jde o místo, v němž vedoucí peptid je odstraňován z heterologní bílkoviny proteolytickým štěpením působením enzymů kvasinky. Tato modifikace je uskutečňována v oblasti X^1 a/nebo X^4 , přičemž může jít o extensi, substituci nebo delecí jedné nebo většího počtu aminokyselin na C-terminálním zakončení vedoucího peptidu a/nebo na N-terminálním zakončení heterologní bílkoviny.

Nyní bylo neočekávaně zjištěno, že účinnějšího a správnějšího zpracování heterologní bílkoviny je možno dosáhnout v případě, že alespoň jedna aminokyselina, užitá k prodloužení polypeptidového řetězce nebo k náhradě jedné nebo většího počtu přirozených aminokyselin v řetězci nese negativní náboj, může jít o některou se svrchu uvedených aminokyselin. Podobného výsledku je možno dosáhnout v případě, že se uloží aminokyselina, která nese

negativní náboj do blízkosti místa zpracování vypuštěním jedné nebo většího počtu aminokyselin na C-terminálním zakončení vedoucího řetězce nebo na N-terminálním zakončení řetězce bílkoviny tak, že se v těsné blízkosti místa zpracování pak nachází aminokyselina, nesoucí negativní náboj.

Aniž by měl být vynález omezen na určitou teorii, je tento účinek pravděpodobně možno připsat zvýšení hydrofilicity, k níž dojde uložení aminokyseliny s negativním nábojem do blízkosti místa zpracování, což má za následek větší dostupnost terciární struktury polypeptidu v místě zpracování v nitrobuněčném vodném prostředí, což současně znamená větší dostupnost pro proteolytické štěpení. Výhodný účinek negativně nabité aminokyseliny na rozdíl od kladně nabité nebo neutrální aminokyseliny je možno připsat negativně nabitým postranním řetězcům těchto aminokyselin, které přispívají k hydrofilnosti terciární struktury v místě zpracování, aniž by docházelo k potenciální inhibici štěpícího enzymu.

Je také možno, že negativně nabité aminokyseliny přispívají k tvorbě a udržování terciární struktury v místě zpracování (může jít o smyčky, ohyby nebo vlásenkové struktury) jiným způsobem, například interakcí s dalšími zbytky aminokyselin v polypeptidu. Mimoto by také mohlo docházet k přímé interakci mezi negativně nabitými aminokyselinami a příslušným enzymem. Je pravděpo-

dobné, že negativně nabité aminokyseliny, uložené v blízkosti dvou bazických aminokyselin v místě zpracování mohou zaměřit příslušný enzym tak, že dojde ke správnému a účinnému štěpení interakcí nábojů mezi bílkoviny a/nebo mezi bílkovinou a rozpouštědlem.

Vynález se rovněž týká konstrukce řetězce DNA, která je kódem pro svrchu uvedený polypeptid.

Vynález se rovněž týká rekombinantního vektoru pro expresi, který je schopen replikace v kvasinkových buňkách a který nese konstrukci DNA, která je kódem pro svrchu uvedený polypeptid, jakož i kmene kvasinek, který je schopen exprese heterologní bílkoviny nebo polypeptidu a který je transformován uvedeným vektorem.

Vynález se rovněž týká způsobu výroby heterologní bílkoviny nebo polypeptidu v kvasinkových buňkách, tento postup spočívá v tom, že se transformovaný kmen kvasinek pěstuje ve vhodném prostředí k dosažení exprese a sekrece heterologní bílkoviny nebo polypeptidu, načež se tato bílkovina nebo polypeptid izolují ze živného prostředí.

Dále bude vynález podrobněji popsán na základě jednotlivých provedení.

Jak již bylo svrchu uvedeno, v případě, že X^1 znamená jedinou aminokyselinu, jde o aminokyselinu Glu nebo Asp.

X^1 a/nebo X^4 znamenají s výhodou 1 až 6 zbytků aminokyselin.

V případě, že X^1 znamená dva spojené zbytky aminokyselin, může jít o strukturu BA, v níž A znamená Glu nebo Asp a B znamená Glu, Asp, Val, Gly nebo Leu, jde tedy například o LeuGlu.

V případě, že X^1 znamená tři spojené zbytky aminokyselin, může jít o strukturu CBA, v níž A a B mají svrchu uvedený význam a C znamená Glu, Asp, Pro, Gly, Val, Leu, Arg, nebo Lys, například AspLeuGlu.

V případě, že X^1 znamená řetězec s obsahem více než dvou zbytků aminokyselin, může být jednou z těchto aminokyselin Pro nebo Gly vzhledem k tomu, že je známo, že tyto aminokyseliny vyvolávají a/nebo tvoří část ohybů, vlásenkových nebo smyčkových struktur, které usnadňují dostupnost místa zpracování pro proteolytický enzym.

V případě, že X^1 znamená řetězec čtyř zbytků aminokyselin, může jít o strukturu DCBA, kde A, B a C mají svrchu uvedený význam a D má stejný význam jako C, například GluArgLeuGlu, LysGluLeuGlu nebo LeuAspLeuGlu.

V případě, že X^1 znamená řetězec pěti zbytků aminokyselin, může jít o strukturu EDCBA, v níž A, B, C a D mají svrchu uvedený význam a E má stejný význam jako C, například LeuGluArgLeuGlu.

V případě, že X^1 znamená řetězec šesti zbytků aminokyselin, může jít o strukturu FEDCBA, v níž A, B, C, D a E mají svrchu uvedený význam a F má stejný význam jako C, například ValLeuGluArgLeuGlu.

Je zřejmé, že jsou možné i jiné kombinace zbytků aminokyselin, aniž by přitom došlo k odchýlení od podstaty vynálezu za předpokladu, že alespoň jedna aminokyselina z řetězce uvedených zbytků nese negativní náboj, jak již bylo svrchu uvedeno.

X^4 může mít stejný význam jako X^1 , přestože pořadí aminokyselin bude obvykle obrácené, tj. ABC místo CBA a podobně.

V těch provedeních, kde heterologní bílkovina začíná jedním nebo větším počtem kladně nabitých nebo hydrofobních zbytků aminokyselin, znamená X^4 s výhodou jednu nebo větší počet aminokyselin a nikoliv peptidovou vazbu, protože v tomto případě dochází k větší dostupnosti místa zpracování pro proteolytický enzym.

V případě, že X^4 znamená N-terminální prodloužení s obsahem 1 až 6 zbytků aminokyselin, může

být vhodné zařadit další místo zpracování mezi aminokyselinu nebo aminokyselinu ve významu X^4 a N-terminální zakončení heterologní bílkoviny. To je zvláště důležité v případě, že bílkovina má být užita k účelům, u nichž je nežádoucí N-terminální prodloužení. Přidatné N-terminální aminokyseliny mohou být odstraněny in vitro proteolytickým štěpením při použití vhodného proteolytického enzymu, například proteázy typu trypsinu nebo působením chemických látek, například bromkyanu. Může být také účelné odštěpit přidatné místo zpracování přímo v hostitelském organismu tak, že se toto místo volí jako místo, specifické pro jiný proteolytický enzym z kvasinek.

Pro některé účely může být účelné volit N-terminální prodloužení tak, aby vyhovovalo určitému účelu. Může například být označením pro detekci bílkoviny, pomocným řetězcem, usnadňujícím čištění bílkoviny nebo prostředkem pro řízení farmaceutického účinku látky in vivo například prodloužením poločasu této látky nebo jejím cílením na specifické místo v těle.

Ve výhodném provedení znamenají X^1 a/nebo X^4 řetězce 1 až 4 zbytků aminokyselin. V tomto provedení je zbytkem aminokyseliny, bezprostředně sousedícím s X^2 s výhodou Glu nebo Asp, aminokyselinou, bezprostředně sousedící s X^3 je s výhodou Glu nebo Asp nebo jsou oběma uvedenými aminokyselinami Glu nebo Asp, protože tímto způsobem

sobem vzniká výhodné místo zpracování vzhledem k hydrofilní povaze těchto zbytků aminokyselin, jak již bylo vysvětleno. Řetězec zbytků aminokyselin X^1 nebo X^4 může obsahovat větší počet zbytků Glu nebo Asp.

V jiném zajímavém provedení znamenají X^1 i X^4 řetězec s obsahem jednoho nebo většího počtu zbytků aminokyselin, což znamená, že polypeptid je modifikován jak na C-terminálním zakončení vedoucího peptidu, tak na N-terminálním zakončení heterologní bílkoviny. V tomto provedení mohou být X^1 a X^4 symetricky totožné, to znamená, že řetězec zbytku aminokyseliny X^1 a X^4 je stejný a vychází z X^2 a X^3 .

Signálním peptidem uvedeného polypeptidu může být signální peptid, který zajišťuje účinné směrování polypeptidu po jeho expresi do sekretorické dráhy v buňce. Může jít o přírodně se vyskytující signální peptid nebo jeho funkční části, nebo může jít o syntetický peptid. Vhodným signálním peptidem je například signální peptid α -faktoru, signální peptid amylázy z myších slin nebo signální peptid modifikovaný karboxypeptidázou, nebo také signální peptid BAR1 z kvasinek. Signální řetězec amylázy z myších slinných žláz byl popsán v publikaci O. Hagenbüchle a další, Nature 289, 1981, str. 643 až 646. Signální řetězec pro karboxypeptidázu byl popsán v publikaci L. A. Valls a další, Cell. 48, 1987, str. 887 až 897. Signální peptid BAR1 byl uveden v WO 87/02670.

Řetězec vedoucího peptidu svrchu uvedeného polypeptidu může být vedoucí peptid, jehož funkcí je směřovat polypeptid po expresi do endoplasmatického retikula a dále po sekretorické dráze. Vhodnými řetězci pro toto použití jsou přírodní peptidy, odvozené od kvasinek nebo jiných organismů, například vedoucí peptid α -faktoru nebo jeho funkční analog. Může jít také o syntetický vedoucí peptid, například o jeden z řetězců, které byly uvedeny v WO 89/02463, a to

- A. Ala-Pro-Val-Thr-Gly-Asp-Glu-Ser-Ser-Val-Glu-Ile-
Pro-Glu-Glu-Ser-Leu-Ile-Gly-Phe-Leu-Asp-Leu-Ala-
Gly-Glu-Glu-Ile-Ala-Glu-Asn-Thr-Thr-Leu-Ala
- B. Ala-Pro-Val-Thr-Gly-Asp-Glu-Ser-Ser-Val-Glu-Ile-
Pro-Glu-Glu-Ser-Leu-Ile-Ile-Ala-Glu-Asn-Thr-Thr-
Leu-Ala
- C. Ala-Pro-Val-Thr-Gly-Asp-Glu-Ser-Ser-Val-Glu-Ile-
Pro-Ile-Ala-Glu-Asn-Thr-Thr-Leu-Ala
- D. Ala-Pro-Val-Thr-Gly-Asp-Glu-Ser-Ser-Val-Glu-Ile-
Pro-Glu-Glu-Ser-Leu-Ile-Ile-Ala-Glu-Asn-Thr-Thr-
Leu-Ala-Asn-Val-Ala-Met-Ala a
- E. Gln-Pro-Val-Thr-Gly-Asp-Glu-Ser-Ser-Val-Glu-Ile-
Pro-Glu-Glu-Ser-Leu-Ile-Ile-Ala-Glu-Asn-Thr-Thr-
Leu-Ala-Asn-Val-Ala-Met-Ala

nebo může jít také o derivát některého z řetězců, uvedených pod A až E.

Heterologní bílkovinou, získanou způsobem podle vynálezu může být jakákoliv bílkovina, kterou je možno výhodně získat z kvasinek. Příkladem těchto bílkovin může být aprotinin nebo jiné inhibitory proteázy, insulin včetně prekursorů insulínu, růstový hormon člověka nebo skotu, interleukin, glukagon, tkáňový aktivátor plasminogenu, faktor VII, faktor VIII, faktor XIII, růstový faktor, odvozený od krevních destiček, enzymy a podobně, nebo může jít o funkční analogy těchto látek. Pod pojmem "funkční analog" se rozumí polypeptid s podobnou funkcí jako přírodní bílkovina, jde spíše o povahu účinku než o biologickou účinnost. Polypeptid může být strukturou příbuzný přírodní bílkovině a může být od ní odvozen přidáním jedné nebo většího počtu aminokyselin na C-terminálním a/nebo N-terminálním zakončení přírodní bílkoviny, substitucí jedné nebo většího počtu aminokyselin v jednom nebo ve větším počtu různých míst v přírodním řetězci zbytků aminokyselin, vypuštěním jednoho nebo většího počtu zbytků aminokyselin na kterémkoliv nebo na obou zakončeních přírodní bílkoviny nebo na jednom nebo větším počtu různých míst řetězce aminokyselin. Tyto modifikace jsou dobře známe v případě několika svrchu uvedených bílkovin.

Nyní bylo neočekávaně zjištěno, že modifikací C-terminálního zakončení vedoucího peptidu nebo N-terminálního zakončení heterologní bílkoviny je možno získat vysoký výtěžek aprotininu nebo jeho funkčního analogu, jak již bylo uvedeno. Aprotinin je bílkovina, působící inhibicí proteáz, tato vlastnost ji uschopňuje pro použití pro různé účely v lékařství, například pro léčbu zánětu slinivky břišní, pro septický šok, u hyperfibrinolytického krvácení a u infarktu myokardu. Podání aprotininu ve vysokých dávkách podstatně snižuje ztrátu krve u chirurgických zákroků na srdci nebo jiných velkých chirurgických zákroků. Aprotinin je také užitečný jako přísada k živným prostředím, protože způsobuje inhibici proteáz buněk hostitele, které by mohly jinak způsobit nežádoucí proteolytické štěpení bílkovin, k jejichž expresi dochází. Získání vysokých výtěžků správně zpracovaného aprotininu v kvasinkách při použití známých přírodních vedoucích řetězců, například vedoucího řetězce α -faktoru působilo až dosud potíže. K iniciaci natývního aprotininu dochází na N-terminální zakončení bazickou aminokyselinou Arg, z tohoto důvodu může být předcházející místo zpracování méně dostupné pro proteolytické štěpení (jak bylo vysvětleno svrchu) v případě, že se užije některého ze známých vedoucích peptidů, například α -faktoru bez modifikace způsobem podle vynálezu, což má za následek malé výtěžky správně zpracovaného aprotininu nebo není možno aprotinin vůbec získat.

Způsobem podle vynálezu bylo možno dosáhnout zvláště dobrých výsledků při výrobě aprotininu v případě, že X^1 znamená GluArgLeuGlu nebo v případě, že X^4 znamená GluLeu nebo GluLeuAspLeu, jak bude také uvedeno v příkladech, přesto že by mělo být dosaženo dobrých výtěžků aprotininu i při jiných významech X^1 a X^4 za předpokladu, že alespoň jedna aminokyselina, zvláště ta, která je nejbližší k místu zpracování bude negativně nabitá, jak již bylo svrchu uvedeno.

Bylo také zjištěno, že modifikací C-terminálního zakončení vedoucího peptidu nebo N-terminálního zakončení heterologní bílkoviny svrchu uvedeným způsobem je možno získat ve vysokém výtěžku správně zpracovaný precursor insulinu nebo jeho funkční analog. Při tomto provedení může znamenat X^1 zejména Glu-Arg-Leu-Glu nebo Lys-Glu-Leu-Glu, přičemž X^4 obvykle znamená peptidovou vazbu. Podle jiného provedení může X^4 znamenat Glu, v tomto případě X^1 obvykle znamená peptidovou vazbu. Zvláště výhodných výsledků bylo možno dosáhnout při expresi precursoru insulinového analogu B(1-29)-AlaAlaLys-A(1-29), a to v případě, že X^1 znamená Lys-Glu-Leu-Glu nebo v případě X^4 znamená substituci Phe jako první aminokyseliny z precursoru insulinu za Glu, jak bude také uvedeno v příkladové části. Dobrých výtěžků bude také možno dosáhnout u precursoru insulinového analogu B(1-29)SerAspAspAlaLys-A(1-29) v případě, že X^1

znamená LysGluLeuGlu. Mimo to je možno očekávat, že vysokých výtěžků prekursoru insulinu bude možno dosáhnout i v případě jiných významů X^1 a X^4 za předpokladu, že alespoň jedna aminokyselina, a to s výhodou nejbližší místu zpracování bude negativně nabitá aminokyselina, jak již bylo uvedeno.

Konstrukce DNA podle vynálezu, která je kódem pro polypeptid, může být připravena synteticky standardním postupem, například metodou s použitím fosfoamiditu podle publikace S. L. Beaucage a M. H. Caruthers, Tetrahedron Letters 22, 1981, str. 1859 až 1869 nebo způsobem podle publikace Matthes a další, EMBO Journal 3, 1984, str. 801 až 805. Podle postupu s použitím fosfoamiditu je možno syntetizovat oligonukleotidy například v automatickém syntetizátoru DNA, pak je čistit, vázat za vzniku dvojitého řetězce a vytvářet syntetickou konstrukci DNA.

Konstrukce DNA podle vynálezu může mít také původ v genomu nebo cDNA, například je možno postupovat tak, že se připraví sestava genomu nebo cDNA a tato sestava se zkoumá na přítomnost řetězců DNA, které jsou kódem pro celý řetězec nebo část řetězce polypeptidu hybridizací při použití syntetických oligonukleotidových sond známým způsobem, který byl shrnut v publikaci T. Maniatis a další, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 1982. V tomto případě je možno spojit řetězec genomu nebo cDNA, který je kódem pro signální a vedoucí peptid s

řetězcem genomu nebo cDNA, který je kódem pro heterologní bílkovinu, načež je možno řetězec DNA modifikovat v místě, které odpovídá řetězci aminokyselin $X^1-X^2-X^3-X^4$ polypeptidu, například řízenou mutagenesí při použití syntetického oligonukleotidu, který je kódem pro požadovaný řetězec aminokyselin při homologní rekombinaci známými postupy.

Konstrukce DNA může být také směsí syntetického řetězce a řetězce genomu, synteti^cckého řetězce cDNA nebo smíšeného řetězce genomu a cDNA, takový řetězec je možno připravit spojením fragmentů syntetického původu a původu z genomu nebo cDNA, přičemž tyto fragmenty odpovídají různým částem úplné konstrukce DNA podle známých postupů. Je tedy zřejmé, že řetězec DNA, který je kódem pro heterologní bílkovinu může být genomového typu, kdežto řetězec, který je kódem pro vedoucí peptid, je možno připravit synteticky.

Výhodné konstrukce DNA, které jsou kódem pro aprotinin, jsou znázorněny na přiložených výkresech 4, 7, 9, 11 a 12, nebo může jít o vhodné modifikace těchto řetězců, které jsou kódem pro aprotinin nebo jeho funkční analog. Příkladem vhodných modifikací řetězce DNA mohou být substituce nukleotidů, při nichž nedojde k zařazení jiné aminokyseliny do bílkoviny, avšak které mohou odpovídat kodonům, obvyklým v organismu kvasinek, do nichž byla včleněna konstrukce DNA nebo může jít o substituce

nukleotidů, při nichž vzniká odlišný řetězec aminokyselin a tím i odlišná struktura bílkoviny, aniž by však došlo k ovlivnění antiproteázových vlastností nativního aprotininu. Dalším příkladem možných modifikací je včlenění jednoho nebo většího počtu nukleotidů do řetězce, přidání jednoho nebo většího počtu nukleotidů na kterémkoliv konci řetězce a vypuštění jednoho nebo většího počtu nukleotidů na kterémkoliv místě řetězce včetně jeho zakončení. Příklady specifických analogů aprotininu byly popsány v evropském patentovém spisu č. 339 942.

Výhodné konstrukce DNA, které jsou kódem pro prekursor insulínu jsou znázorněny na výkresech 16 a 17, může jít také o vhodné modifikace těchto řetězců.

Rekombinantní vektor pro expresi, v němž je uložen řetězec DNA, který je kódem pro polypeptid, vyráběný způsobem podle vynálezu může být jakýkoliv vektor, k jehož replikaci může dojít v organismu kvasínek. V tomto vektoru má být řetězec DNA, který je kódem pro uvedený polypeptid správně spojen s vhodným řetězcem promotoru. Promotorem může být jakýkoliv řetězec DNA, který má transkripční účinnost u kvasínek a může být odvozen od genů, které jsou kódem pro bílkoviny, homologní nebo heterologní pro kvasinky. Promotor se s výhodou odvodí od genu pro homologní bílkovinu. Příkladem vhodného promotoru mohou být promotory *Saccharomyces cerevisiae* M_{gal}, TPI, ADH nebo PGK.

Řetězec DNA, který je kódem pro polypeptid by měl být rovněž správně spojen s vhodným terminátorem, například TPI, který byl popsán v publikaci T. Alber a G. Kawasaki, J. Mol. Appl. Genet. 1, 1982, str. 419-434.

Rekombinantní vektor pro expresi podle vynálezu dále obsahuje řetězec DNA, který umožňuje replikaci vektoru v kvasince. Příkladem takového řetězce je plasmid kvasinek 2/u, replikační geny REP 1-3 a počátek replikace. Vektor může rovněž obsahovat označení, umožňující selekci, například gen TPI Schizosaccharocces pombe, popsáný v publikaci P. R. Russell, Gene 40, 1985, str. 125-130.

Postupy, užité k vazbě řetězců DNA, které jsou kódem pro polypeptid, promotory a terminátoru a pro uložení těchto řetězců do vektorů, vhodných pro kvasinky s obsahem informace, nutné pro replikaci v těchto kvasinkách jsou známy a byly popsány například ve svrhu uvedených publikaci Maniatis a dalších. Vektor je možno zkonstruovat tak, že se nejprve připraví konstrukce s obsahem celého řetězce DNA, který je kódem pro polypeptid a pak se tento fragment včlení do vhodného vektoru pro expresi, nebo se postupně včleňují fragmenty DNA, obsahující genetickou informaci pro jednotlivé prvky, jako signální a vedoucí řetězec nebo heterologní bílkovina s následnou vazbou.

Organismus kvasinek, užitý při provádění způsobu podle vynálezu může být jakýkoliv kvasinkový organismus, který při pěstování produkuje velká množství heterologní bílkoviny nebo požadovaného polypeptidu. Příkladem vhodných kvasinek mohou být čeledi *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri*, *Schizosaccharomyces pombe* nebo *Saccharomyces uvarum*. Transformace kvasinkových buněk může být uskutečněna například tvorbou protoplastů, jak bude popsáno v příkladu 1 s následnou transformací známým způsobem. K pěstování buněk je možno užít jakéhokoliv běžného prostředí, vhodného pro pěstování kvasinek. Vyloučená heterologní bílkovina, jejíž podstatná část bude přítomna v živném prostředí ve správně zpracované formě pak může být izolována z prostředí běžným způsobem včetně oddělení kvasinkových buněk z prostředí odstředěním nebo filtrací, vysrážením bílkovinných složek ze supernatantu nebo filtrátu působením soli, například síranu amonného s následným čištěním některým z chromatografických postupů, jako je chromatografie na iontoměniči, afinitní chromatografie a podobně.

Vynález se rovněž týká způsobu výroby nového analogu aprotininu obecného vzorce X^4 -aprotinin-(1-58), kde X^4 znamená N-terminální prodloužení jednou nebo větším počtem aminokyselin, z nichž alespoň jedna má negativní náboj a je volena ze skupiny Glu a Asp. X^4 může tvořit řetězec 1 až 6 aminokyselin, s výhodou 1 až 4 aminokyselin

ve svrchu uvedeném významu. Zvláště výhodnými významy X^4 jsou Glu-Leu a Glu-Leu-Asp-Leu.

Vynález bude podrobněji popsán v příkladové části v souvislosti s přiloženými výkresy.

Na obr. 1 je znázorněna DNA a řetězec aminokyselin pro aprotinin(1-58). Jsou označena místa v řetězci DNA, na něž došlo k vazbě duplexů, vytvořených ze syntetických oligonukleotidů.

Na obr. 2 je znázorněna konstrukce plasmidů pKFN-802 a pKFN-803.

Na obr. 3 je znázorněna konstrukce plasmidů pKFN-849 a pKFN-855.

Na obr. 4 je znázorněn řetězec DNA o 406 bp, jde o fragment EcoRI-XbaI z plasmidů pKFN-849 a pKFN-855. Šipky označují místa, v němž dochází k proteolytickému štěpení v průběhu sekrece.

Na obr. 5A a 5B je znázorněna inhibice trypsinu a plasmidu aprotininem. elipsou je označen pankreatický aprotinin skotu, X znamená Glu-Leu-aprotinin a delta znamená Glu-Leu-Asp-Leu-aprotinin.

Na obr. 6 je znázorněna konstrukce plasmidů pKFN-852 a pKFN-858.

Na obr. 7 je znázorněn řetězec DNA o 412 bp, jde o fragment EcoRI-XbaI z plasmidů pKFN-852 a

pKFN-858- Šipka označuje místo, v němž dochází v průběhu sekrece k proteolytickému štěpení.

Na obr. 8 je znázorněna konstrukce plasmidů pKFN-995 a pKFN-998.

Na obr. 9 je znázorněn řetězec DNA o 412 bp, jde o fragment EcoRI-XbaI z plasmidů pKFN-995 a pKFN-998. Šipka označuje místo proteolytického štěpení v průběhu sekrece.

Na obr. 10 je znázorněna konstrukce plasmidů pKFN-1000 a pKFN-1003.

Na obr. 11 je znázorněn řetězec DNA o 412 bp, jde o fragment EcoRI-XbaI z plasmidů pKFN-1000 a pKFN 1003. Šipkou je označeno místo, v němž dochází v průběhu sekrece k proteolytickému štěpení.

Na obr. 12 je znázorněn řetězec DNA genu pro syntetický aprotinin(3-58). Jsou označena místa vazby pěti duplexů, vytvořených z deseti syntetizovaných oligonukleotidů.

Na obr. 13 je znázorněna konstrukce plasmidů pKFN 305 a pKFN-374/375.

Na obr. 14 je znázorněna konstrukce plasmidu pMT-636.

Na obr. 15 je znázorněna konstrukce plasmidu pLaC-240.

Na obr. 16 je znázorněn řetězec DNA modifikovaného vedoucího řetězce genu pro prekursor insulínu z plasmidu pLaC-240.

Na obr. 17 je znázorněn řetězec DNA o 508 bp, jde o fragment Eco-RI-XbaI z plasmidu pKFN-458, který je kódem pro MfaI-signální řetězec-vedoucí řetězec-(1-85) a prekursor analogu insulínu B(1-29, 1Glu+27Glu)-AlaAlaLys-A(1-21)-

Praktické provedení způsobu podle vynálezu bude osvětleno následujícími příklady.

P ř í k l a d 1

Produkce Glu-Leu-aprotininu(1-58) z kvasinek KFN-837

a) Konstrukce plasmidu pKFN-802

Byl zkonstruován z 10 oligonukleotidů jejich navázáním syntetický gen, který je kódem pro aprotinin(1-58).

Oligonukleotidy byly syntetizovány na automatickém syntetizátoru DNA postupem s použitím fosforamiditu na skleněné podložce s póry podle publikace Beaucage S.L. a Caruthers M- H., Tetrahedron Letters 22, (1981) 1859-1869.

Bylo syntetizováno následujících

10 oligonukleotidů:

NOR-760: CATGGCCAAAAGAAGGCCTGATTTCTGTTTGGAACTCCATACACTGGTCC

NOR-754: TTACATGGACCAGTGTATGGAGGTTC~~C~~AAACAGAAATCAGGCCTTCTTTTGGC

NOR-354: ATGTAAAGCTAGAATCATCAGATACTTCTACAACG

NOR-355: CTTGGCGTTGTAGAAGTATCTGATGATTCTAGCT

NOR-356: CCAAGGCTGGTTTGTGTCAAAC~~T~~TCGTTTACGGTGGCT

NOR-357: CTCTGCAGCCACCGTAAACGAAAGTTTGACACAAACCAGC

NOR-358: GCAGAGCTAAGAGAAACAAC~~T~~TCAAGT

NOR-359: AGCAGACTTGAAGTTGTTTCTCTTAG

NOR-360: CTGCTGAGACTGATGAGAACTTGTGCTGGTGCCTAAT

NOR-361: CTAGATTAGGCACCACCACAAGTTCTC~~A~~TGCAGTCTTC

Ze svrchu uvedených deseti oligonukleotidů bylo vytvořeno pět duplexů A až E, tak jak jsou znázorněny na obr. 1.

20 pmolů každého z duplexů A až E bylo vytvořeno z odpovídajících párů 5'-fosforylovaných oligonukleotidů zahříváním na 5 minut na teplotu 90 °C s následným zchlazením na teplotu místnosti na 75 minut. Pět duplexů bylo smíšeno a na směs bylo působeno T_4 DNA ligázou. Syntetický gen byl izolován jako pás o 191 bp po elektro-

forézou směsi na 2% agarosovém gelu. Získaný syntetický gen je znázorněn na obr. 1.

Syntetický gen byl navázán na fragment EcoRI-NcoI o velikosti 209 bp z plasmidu pLaC212spx3 a na 2,7 kb fragment EcoRI-XbaI z plasmidu pUC19 podle publikace Yanisch-Perron C., Vieira, J. a Messing, J., *Gene* 33 (1985), 103 až 119. Plasmid pLaC212spx3 byl popsán v příkladu 3 patentového spisu č. WO 89/02463.

Fragment EcoRI-NcoI o 209 bp z plasmidu pLaC212spx3 je kódem pro syntetický vedoucí peptid z kvasinek.

Směs po vazbě byla užita k transformaci kompetentního kmene *E. coli* r^- , m^+ se selekcí na odolnost proti ampicilinu. Analýzou řetězce fragmentu ^{32}p -XbaI-EcoRI podle publikace Maxam A. a Gilbert W., *Methods Enzymol.* 65 (1980), 499 až 560 bylo prokázáno, že plasmidy z výsledných kolonií obsahovaly správný řetězec DNA pro aprotinin (1-58).

Jeden z plasmidů pKFN-802 byl vyčleněn pro další použití. Konstrukce tohoto plasmidu je znázorněna na obr. 2.

b) Konstrukce plasmidů pKFN-849, pKFN-855 a kmene KFN-837

Fragment o 3,0 kb po štěpení enzymy NcoI-StuI z plasmidu pKFN-802 byl navázán na syntetický fragment NOR-790/791 působením T_4 DNA ligázy.

M A K R E L R
CATGGCTAAGAGAGAATTGAGA
CGATTCTCTCTTAACCTCT

Směs byla rozštěpena restričními enzymy StuI tak, aby bylo sníženo jakékoliv pozadí pKFN-802 a výsledná směs pak byla použita k transformaci kompetentního kmene *E. coli* (r^- , m^+) k selekci na odolnost proti ampicilinu. Analýzou řetězce bylo prokázáno, že plasmid pKFN-849 z jedné z výsledných kolonií (Sanger F., Micklen S. a Coulson A. R., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 74 (1977), 5463 až 5467) obsahuje řetězec DNA pro Glu-Leu-aprotinin(1-58), správně navázaný na gen pro syntetický vedoucí sled kvasinek. Konstrukce plasmidu pKFN-849 je znázorněna na obr. 3.

Plasmid pKFN-849 byl rozštěpen působením enzymu EcoRI a XbaI a fragment o velikosti 406 bp byl navázán na fragment EcoI-XbaI o velikosti 9,5 kb z plasmidu pMT636 a fragment NcoI-NcoRI o velikosti 1,4 kb z plasmidu pMT636, čímž byl získán plasmid pKFN-855, jak je zřejmé z obr. 3. Plasmid pMT636 byl popsán v patentovém spisu č. PCT/DK88/00138.

Plasmid pMT636 je vektor, který obsahuje gen TPI ze *Schizosaccharomyces pombe* (POT) popsany v publikaci Russell F. R., *Gene* 40 (1985), 125 až 130 a promotor a terminátor triosofosfátisomerázy TPI_P a TPI_T ze *S. cerevisiae* podle publikace Alber T. a Kawasaki G., *J. Mol. Appl. Gen.*, 1, (1982), 419 až 434. Plasmid pKFN-855 obsahuje následující řetězec:

TPI_P -LaC212spx3-signální řetězec-vedoucí řetězec-Glu-Leu-aprotinin(1-58)- TPI_T

v němž LaC212spx3 signální řetězec-vedoucí řetězec je syntetický vedoucí řetězec plasmidu popsany v patentovém spisu č. WO 89/02463. Řetězec DNA fragmentu EcoRI-XbaI o velikosti 406 bp z plasmidu pKFN-849 a pKFN-855 je znázorněn na obr. 4.

S. cerevisiae kmen MT-663 (E2-7B XE11-36 a/ α , delta-tpi, delta-tpi, pep 4-3/pep 4-3) byl pěstován na prostředí YPGaL s obsahem 1 % extraktu z kvasnic (Bacto), 2 % peptonu (Bacto), 2 % galaktosy a 1 % laktátu až do optické hustoty 0,6 při 600 nm.

100 ml kultury bylo odstředěno, promyto 10 ml vody, znovu odstředěno a uvedeno do suspenze v 10 ml roztoku s obsahem 1,2 M sorbitolu, 25 mM Na_2EDTA o pH 8,0 a 6,7 mg/ml dithiothreitolu. Suspenze byla inkubována 15 minut při teplotě 30 °C, pak byla odstředěna a buňky byly

znovu uvedeny do suspenze v 10 ml roztoku s obsahem 1,2 M sorbitolu, 10 mM Na₂EDTA, 0,1 M citronanu sodného o pH 5,8 a 2 mg Novozym^R 234. Suspenze se inkubuje 30 minut při teplotě 30 °C, buňky se oddělí odstředěním, promyjí se 10 ml 1,2 M sorbitolu a 10 ml prostředí CAS, které obsahuje 1,2 M sorbitolu, 10 mM chloridu vápenatého a 10 mM tris HCl o pH 7,5, načež se buňky znovu uvedou do suspenze ve 2 ml CAS. Pro transformaci se smísí 0,1 ml CAS s buňkami a přibližně 1 µg plasmidu pKNF-855 a směs se nechá stát 15 minut při teplotě místnosti. Pak se přidá 1 ml směsi 20% polyethylenglykolu 4000, 20 mM chloridu vápenatého, 10 mM chloridu vápenatého a 10 mM tris HCl o pH 7,5 a směs se nechá ještě 30 minut stát při teplotě místnosti. Pak se směs odstředí a usazenina se znovu uvede do suspenze v 0,1 ml prostředí SOS, které obsahuje 1,2 M sorbitolu, 33 % objemových YPD, 6,7 mM chloridu vápenatého a 14 µg/ml leucinu, načež se suspenze inkubuje 2 hodiny při teplotě 30 °C. Pak se suspenze odstředí a usazenina se znovu uvede do suspenze v 0,5 ml 1,2 M sorbitolu. Pak se přidá 6 ml agaru, jde o prostředí SC podle publikace Sherman a další, *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory (1981) s obsahem 1,2 M sorbitolu a 2,5 % agaru při teplotě 52 °C a suspenze se vlije na horní část ploten, které již obsahují ztuhlé agarové prostředí s obsahem sorbitolu. Kolonie transformantů se po 3 dnech při teplotě 30 °C odeberou, reisolují a užijí k založení kultur v kapalném prostředí. Transformant KFN-837 byl užit k další charakterizaci.

Kmen KFN-837 byl pěstován na prostředí YPD, které obsahuje 1 % extraktu z kvasnic, 2 % peptonu (Difco Laboratories) a 6 % glukosy. 200 ml kultury bylo protřepáváno rychlostí 250 ot/min při teplotě 30 °C celkem 3 dny do optické hustoty 20 při 600 nm, suchá biomasa kvasinek 18,8 g/l. Po odstředění byl supernatant analyzován chromatografií na iontoměniči (FPLC). Supernatant byl pak zfiltrován přes filtr Millex GV s otvory pórů 0,22 µm, 1 ml filtrátu se nanese na sloupec iontoměniče MonoS s rozměrem 0,5 x x 5 cm v rovnovážném stavu ve 20 mM Bicinu o pH 8,7. Po promytí ekvilibračním pufrem byl sloupec vymýván lineárním gradientem chloridu sodného 0 až 1M v ekvilibračním pufru. V jednotlivých frakcích bylo stanoveno kvantitativně účinnost inhibitoru trypsinu spektrofotometricky podle publikace Kassel B., Methods Enzymol. 19, (1970), 844 až 852 a dále integrací absorpce při 280 nm podle rovnice

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

Výtěžek byl 120 g/l Glu-Leu-aprotininu(1-58).

Pro analýzu aminokyselin a stanovení N-terminálního řetězce a pro další čištění získaného produktu byl Glu-Leu-aprotinin (1-58) čištěn vysokotlakou kapalinovou chromatografií v reversní fázi na sloupci (Vydac C4,

4,6 x 250 mm). Eluce se provádí při použití gradientu methyl-
kyanidu v 0,1% TFA. Odebrané frakce se zahustí na 100 μ l od-
středěním ve vakuu a byly odebrány vzorky pro stanovení N-ter-
minálního řetězce a analýzu aminokyselin.

Při stanovení N-terminálního zakon-
čení bylo možno prokázat následující řetězec:

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

což znamená, že N-terminální zakončení je správné. Zbytky
poloviny cysteinu nebyly tímto způsobem stanoveny, což je
ve shodě se slepými zkouškami (X), získanými ze zbytků č. 7
a 16.

Analýza aminokyselin je znázorněna
v tabulce 1. Z tabulky je zřejmé, že produkt má očekávané
složení aminokyselin, tj. větší množství Glu a Leu. Mírně
snížený obsah Ile je pravděpodobně možno připsat neúplné
hydrolýze Ile(18)-Ile(19), což je v oboru dobře známo. Ta-
ké obsah Arg je o něco vyšší, než bylo očekáváno. To je však
možno pozorovat také u nativního aprotininu, jak je zřejmé
z tabulky 1, třetí sloupec.

V případě srovnání svrchu uvedeného
postupu Kasselova je možno prokázat, že specifická účinnost
Glu-Leu-aprotininu(1-58) je rovna specifické účinnosti na-

tivního aprotinunu v rámci experimentálních chyb. Inhibice trypsinu a plasminu působením Glu-Leu-aprotinin(1-58) pomocí titračních křivek byla neodlišitelná od inhibice pankreatickým aprotininem skotu (Aprotinin Novo). Po inkubaci enzymu s aprotininem nebo jeho analogy 30 minut bylo přidáno 0,6 mM S 2251 (KabiVitrum) a účinnost byla měřena jako rychlost tvorby nitroanilinu. Účinnost je jako funkce koncentrace aprotininu vyjádřena na obr. 5A a 5B. Bylo možno pozorovat úplnou inhibici obou enzymů všemi třemi inhibitory.

P ř í k l a d 2

Produkce Glu-Leu-Asp-Leu-aprotininu(1-58) kmenem kvasinek KFN-840

Syntetický gen, který je kódem pro Glu-Leu-Asp-Leu-aprotinin(1-58) byl zkonstruován způsobem podle příkladu 1. Syntetický fragment NOR-793/794 byl užit místo NOR-790/791:

M A K R E L D L R
CATGGCTAAGAGAGAATTGGACTTGAGA
CGATTCTCTCTTAACCTGAACTCT

Plasmid pKFN-852, odvozený od pUC19 byl zkonstruován podobně jako pKFN-849.

Způsobem podle příkladu 1 byl získán plasmid pKFN-858, který obsahuje následující konstrukci: TPI_P-LaG212spx3-signální řetězec-vedoucí řetězec-Glu-Leu-Asp-Leu-aprotinin(1-58)-TPI_T.

Konstrukce plasmidů pKFN-852 a pKFN-858 je znázorněna na obr. 6. Řetězec DNA fragmentu EcoRI-XbaI o 412 bp z plasmidů pKFN-852 a pKFN-858 je znázorněn na obr. 7.

Plasmid pKFN-858 byl transformován v kvasinkovém kmenu MT663 svrchu uvedeným způsobem za vzniku kmene KFN-840.

200 ml prostředí YPD s obsahem KFN-840 bylo protřepáváno 3 dny při teplotě 30 °C a 250 ot/min do optické hustoty 18 při 600 nm, což odpovídá suché biomase 16,7 mg/l. Chromatografií supernatantu na iontoměniči (FPLC) bylo získáno 90 mg/l Glu-Leu-Asp-Leu-aprotininu(1-58).

Analýza aminokyselin je uvedena v tabulce 1 a potvrzuje očekávané složení produktu.

Titrační křivky pro inhibici trypsinu a plasminu působením Glu-Leu-Asp-Leu-aprotininu(1-58) jsou neodlišitelné od křivek pro pankreatický aprotinin skotu (aprotinin Novo), jak je znázorněno na obr. 5A a 5B.

P ř í k l a d 3

Produkce aprotininu(1-58) z kmene KFN-1006 kvasinek

Plasmid pKFN-995 byl zkonstruován z plasmidu pKFN-802 navázáním fragmentu NcoI-StuI o 3,0 kb na syntetický fragment NOR-848/849:

M A K E L E K R R
CATGGCTAAGGAATTGGAGAAGAGAAGG
CGATPCGTTAACCTCTTCTCTTCC

Vezná směs se štěpí působením restriktčního enzymu BalI ke snížení jakéhokoli pozadí plasmidu kPFN-802.

Plasmid pKFN-998 pro expresi v kvasinkách byl zkonstruován podle příkladu 1, je znázorněn na obr. 8 a má následující konstrukci:

TPI_P-LaC212spx3-signální řetězec-vedoucí řetězec(1-47)-
Lys-Glu-Leu-Glu(Lys-Arg)-aprotinin(1-58)-TPI_T

Řetězec DNA fragmentu EcoRI-XbaI o 412 bp z plasmidů pKFN-995 a pKFN-998 je znázorněn na obr. 9.

Plasmid pKFN-998 byl užit pro transformaci kvasinkového kmene MT663 způsobem podle příkladu 1

za vzniku kvasinkového kmenu KFN-1006. Přesotávním transformovaného kmenu KFN-1006 v prostředí YPD byl získán aprotininu (1-58), jehož analýza v supernatantu byla provedena svrhu uvedeným způsobem.

Celkový výtěžek byl 30 mg/l aprotininu(1-58).

Analýza aminokyselin čištěného materiálu potvrdila jeho očekávané složení.

P ř í k l a d 4

Produkt aprotininu(1-58) z kvasinkového kmene KFN-1008

Plasmid pKFN-1000, odvozený od pUC- byl zkonstruován způsobem podle příkladu 1 navázáním fragmentu NcoI-StuI o 3,0 kb plasmidu pKFN-802 na syntetický fragment NOR-850/851:

M A E R L E K R R
CATGGCTGAGAGATTGGAGAAGAGAAGG
CGACTCTCTAACCTCTTCTCTTCC

Opakováním postupu z příkladů 1 a 3 byl získán plasmid pKFN-1003 pro expresi v kvasinkách, který obsahoval následující konstrukci:

TPI_P-LaC212spx3-signální řetězec-vedoucí řetězec(1-47)-
GluArgLeuGlu(Lys-Arg)-aprotinin(1-58)-TPI_T.

Konstrukce plasmidů pKFN-1000 a pKFN-1003 je znázorněn na obr. 10. Řetězec DNA fragmentu EcoRI-XbaI o 412 bp z plasmidů pKFN-1000 a pKFN-1003 je znázorněn na obr. 11.

Plasmid pKFN-1003 byl užit pro transformaci kvasinkového kmene MT663 svrchu uvedeným způsobem za vzniku kvasinkového kmene KFN-1008.

Transformovaný kmen KFN-1008 byl pěstován v prostředí YPD, analýza získaného aprotininu-(1-58) v supernatantu byla provedena svrchu uvedeným způsobem. Vý-
těžek byl 120 mg/l aprotininu(1-58).

Analýza aminokyselin čištěného materiálu potvrdila jeho očekávané složení. Mimoto bylo možno potvrdit úplnou primární strukturu analýzou redukovaného, pyridylethylovaného polypeptidu v plynné fázi.

Mimoto bylo možno prokázat, že specifická inhibiční účinnost rekombinantního aprotininu(1-58) proti trypsinu je neodlučitelná od specifické inhibiční účinnosti pankreatického aprotininu skotu.

P ř í k l a d 5

Produkce aprotininu(1-58) z kvasinkového kmene KFN-783

Plasmid pKFN-802 z příkladu 1 byl rozštěpen enzymy EcoRI a XbaI a fragment o 400 bp byl navázán na fragment NcoI-XbaI o 9,5 kb z plasmidu pMT636 a na fragment NcoI-EccRI o 1,4 kb z plasmidu pMT636, čímž byl získán plasmid pKFN-803, který je znázorněn na obr. 2 a je tvořen následující konstrukcí:

$\text{TPI}_p\text{-LaC212spx3-signalní řetězec-vedoucí řetězec-aprotinin(1-58)-TPI}_T$

Plasmid pKFN-803 byl užít k transformaci kmene MT663 kvasinek svrchu uvedeným způsobem. Transformovaný kmen KFN-783 byl pěstován na prostředí YPD, chromatografií supernatantu na iontoměniči (FPLC) byl získán aprotinin(1-58), který byl stanoven kvantitativně srovnáním s chromatografií standardisovaného roztoku autentického aprotinínu, získaného čištěním ze slinivky skotu. Výtěžek aprotininu(1-58) byl nižší než 1 mg/l.

T a b u l k a 1

Složení aminokyselin

amino- kyselina	aprotinin vypočteno	aprotinin nalezeno	KFN-837 nalezeno	KFN-840 nalezeno
Asp	5	5,00	4,95	5,93 (+1)
Thr	3	2,86	2,84	2,85
Ser	1	0,94	0,92	0,93
Glu	3	3,04	3,97 (+1)	3,99 (+1)
Pro	4	4,18	3,90	3,86
Gly	6	5,95	5,91	5,94
Ala	6	5,85	5,92	5,94
Cys	6	5,20	5,21	5,22
Val	1	0,99	1,00	1,01
Met	1	0,83	0,65	0,67
Ile	2	1,39	1,58	1,58
Leu	2	1,97	3,00 (+1)	4,00 (+2)
Tyr	4	3,84	3,74	3,71
Phe	4	3,98	3,94	3,92
Lys	4	3,92	3,99	3,99
Arg	6	6,39	6,35	6,34
celkem	58	56,33	57,87	59,88

P ř í k l a d 6

Produkce aprotininu-(3-58)

Syntetický gen pro aprotinin(3-58)
byl zkonstruován z řady oligonukleotidů.

Následujících 10 oligonukleotidů
bylo syntetizováno způsobem podle příkladu-1:

I: AAAGAGATTTCTGTTTGGAACTCCATACACTGGTCC

37-mer

II: TTACATGGACCAGTGTATGGAGGTCCAAACAGAACT

38-mer

III: ATGTAAAGCTAGAATCATCAGATACTTCTACAACG

35-mer

IV: CTTGCCGTTGTAGAAGTATCTGATGATTCTAGCT

34-mer

V: CCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACCTTCGTTTACGGTGGCT

39-mer

VI: CTCTGCAGCCACCGTAAACGAAAGTTTGACACAAACGAGG

40-mer

VII: GCAGAGCTAAGAGAAACAACTTCAAGT

27-mer

VIII: AGCAGACTTGAAGTTGTTTCTCTTAG

26-mer

IX: CTGCTGAAGACTGCATGAGAACTTGTGGTGGTGCCTAAT

39-mer

X: CTAGATTAGGCACCACCAGTTCTCATGCAGTCTTC

38-mer

Z těchto deseti oligonukleotidů byly vytvořeny duplexy A až E, celkem tedy pět duplexů, jak je znázorněno na obr. 12.

20 pmol každého z duplexů A až E bylo vytvořeno z odpovídajících párů 5'-fosforylovaných oligonukleotidů I až X zahříváním 5 minut na 90 °C s následným zchlazením na teplotu místnosti v průběhu 75 minut. Všechny duplexy byly smíseny a podrobeny působení T4 ligázy. Syntetický gen byl izolován jako pás o velikosti 176 bp po elektroforéze vazné směsi na 2% agarosovém gelu. Získaný syntetický gen je znázorněn na obr. 12.

Syntetický gen o velikosti 176 bp byl navázán na fragment EcoRI-HgaI o 330 bp z plasmidu pKFN-9, který je kódem pro řetězec α 1-signální řetězec-vedoucí řetězec (1-58) *S. cerevisiae* podle publikace Markussen J. a další, Protein-Engineering 1 (1987), 215 až 223 a na fragment EcoRI-XbaI o 2,7 kb z plasmidu pUC19 podle publikace

Yanish-Perron C., Vieira J. a Messing J., Gene 33 (1985), 103 až 119. Konstrukce plasmidu pKFN-9, obsahující místo působení HgaI bezprostředně za vedoucím řetězcem Mfal je znázorněna v evropském patentovém spisu č. 214 826.

Vazná směs byla užita k transformaci kompetentního kmene E. coli (R^- , m^+) s odolností proti ampicilinu, která byla užita pro selekci. Při analýze řetězce fragmentu ^{32}P -XbaI-EcoRI podle publikace Maxam A. a Gilbert W., Methods Enzymol. 65 (1980), 499 až 560, bylo možno prokázat, že plasmidy z výsledných kolonií obsahovaly správný řetězec DNA pro aprotinin-(3-58).

Jeden z plasmidů pKFN-305 byl vybrán pro další použití. Konstrukce tohoto plasmidu je znázorněna na obr. 13.

Plasmid pKFN305 byl rozštěpen enzymy EcoRI a XbaI a fragment o velikosti 0,5 kb byl navázán na fragment NcoI-XbaI o 9,5 kb z plasmidu pMT636 a fragment NcoI-EcoRI o 1,4 kb z plasmidu pMT636, čímž byl získán plasmid pKFN374, znázorněný na obr. 13. Plasmid pMT636 byl zkonstruován z plasmidu pMT608 po vypuštění genu LEU-2 a z plasmidu pMT479, jak je znázorněno na obr. 14. Plasmid pMT608 byl popsán v evropském patentovém spisu č. 195 691 a plasmid pMT479 byl popsán v evropském patentovém spisu č. 163 529. Tento plasmid obsahuje gen TPI (POT) ze Schizosaccharomyces

pombe a promotor a terminátor triofosfátisomerázy TPI_P a TPI_T ze *S. cerevisiae*, jak bylo uvedeno v publikaci Alber T. a Kawasaki G., J. Mol. Appl. Gen. 1 (1982), 419 až 434. Plasmid pKFN374 obsahuje následující konstrukci:

TPI_P -M α 1-signální řetězec-vedoucí řetězec(1-85)-aprotinin(3-58)- TPI_T ,

kde M α 1 je kódový řetězec pro α 1 z *S. cerevisiae* podle publikace Kurjan J. a Herskowitz I., Cell 30 (1982), 933 až 943, řetězec obsahuje prvních osmdesát pět zbytků aminokyselin signálního a vedoucího řetězce M α 1 a aprotinin(3-58) je syntetický řetězec, který je kódem pro aprotininový derivát, jemuž chybí první dva zbytky aminokyselin.

Kmen *S. cerevisiae* MT663 (E2-7B XE11-36 a/ α , delta-tpidelta-tpi, pep 4-3/pep 4-3) byl pěstován na prostředí YPGaL s obsahem 1 % extraktu z kvasnic (Bacto), 2 % peptonu (Bacto), 2 % galaktosy a 1 % laktátu až do optické hustoty 0,6 při 600 nm.

100 ml výsledné kultury bylo odstředěno, usazenina byla promyta 10 ml vody, znovu odstředěna a uvedena do suspenze v 10 ml roztoku s obsahem 1,2 M sorbitolu, 25 mM Na_2 EDTA o pH 8,0 a 6,7 mg/ml dithiothreitolu. Suspenze byla inkubována 15 minut při teplotě 30 °C, pak byla odstředěna a buňky byly znovu uvedeny do suspenze v 10 ml roztoku s obsahem 1,2 M sorbitolu, 10 mM Na_2 EDTA,

0,1 M citronanu sodného o pH 5,8 a 2 mg prostředku Novozym^R 234. Suspenze byla inkubována 30 minut při teplotě 30 °C, buňky byly odděleny odstředěním, promyty 10 ml 1,2 M sorbitolu a 10 ml CAS, což je prostředí s obsahem 1,2 M sorbitolu, 10 mM chloridu vápenatého, 10 mM tris HCL (tris = tris(hydroxymethyl)aminomethan) při pH 7,5, načež se znovu uvedou do suspenze ve 2 ml CAS. Pro transformaci se smísí 0,1 ml CAS se suspenzí buněk s přibližně 1/μg plasmidu pKFN374 a směs se nechá stát při teplotě místnosti 15 minut. Pak se přidá 1 ml směsi 20% polyethylenglykolu 4000, 10 mM chloridu vápenatého, 10 mM tris HCL o pH 7,5 a směs se nechá stát ještě 30 minut při teplotě místnosti. Pak se směs odstředí a usazenina se znovu uvede do suspenze v 0,1 ml prostředí SOS, které obsahuje 1,2 M sorbitolu, 33 % objemových YPD, 6,7 mM chloridu vápenatého a 14/μg/ml leucinu, načež se směs inkubuje 2 hodiny při teplotě 30 °C. Pak se suspenze odstředí a usazenina se znovu uvede do suspenze v 0,5 ml 1,2 M sorbitolu. Pak se přidá 6 ml agaru, jde o prostředí SC z publikace Sherman a další, Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981 s obsahem 1,2 M sorbitolu a 2,5 % agaru, při teplotě 52 °C a suspenze se pak vlije na povrch ploten, které již obsahují totéž ztuhlé agarové prostředí s obsahem sorbitolu. Kolonie transformantů se oddělí po 3 dnech při teplotě 30 °C, izolují a užijí k založení kultur v kapalném prostředí.

Jeden z takto získaných transformantů KFN322 se užije pro další charakterizaci.

Kmen KFN322 se pěstuje na prostředí YPD, které obsahuje 1 % extraktu z kvasnic, 2 % peptonu (Difco Laboratories) a 2 % glukózy. 10 ml kultury tohoto kmene bylo protřepáváno při teplotě 30 °C až do dosažení optické hustoty 32 při 600 nm. Po odstředění byl supernatant analyzován chromatografií na iontoměniči (FPLC). Supernatant byl zfiltrován přes filtr Millex^R GV s otvory o průměru 0,22 μm a 1 ml filtrátu byl nanesen na sloupec kationtoměniče MonoS s rozměrem 0,5 x 5 cm v rovnovážném stavu s 20 mM Bicinu o pH 8,7. Po promytí ekvilibračním pufrům byl sloupec promýván lineárním gradientem chloridu sodného 0-1 M v ekvilibračním pufru. Ve frakcích byla stanovena inhibiční účinnost pro trypsin spektrofotometricky a pak integrací absorpce při 280 nm podle výrazu

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

Celkový výtěžek byl přibližně 3 mg/l aprotininu(3-58).

P ř í k l a d 7

Produkce prekursoru insulínu B(1-29)-AlaAlaLys-A(1-21)-
z kvasinkového kmene LaC1667

Fragmenty SphI-NcoI o 589 bp a HpaI-
-XbaI o 172 bp byly izolovány z plasmidu pLaC212spx3, který
byl popsán ve WO 89/02463. Tyto fragmenty byly spojeny se
syntetickým adapterem

	M A K E L E K R F V
NOR-962	CATGGCTAAGGAATTGGAAAAGAGATTCGTT
NOR-964	CGATTCCTAACCTTTTCTCTAAGCAA

a se syntetickým fragmentem XbaI-SphI o 10 kb z plasmidu
pMT743, který byl popsán ve svrchu uvedeném patentovém
spisu, čímž vznikl plasmid pLaC240, znázorněný na obr. 15.
Řetězec DNA modifikovaného genu pro prekursor insulínu s
vedoucím řetězcem z plasmidu lPaC240 je znázorněn na obr. 16.

Transformací kvasinkového kmene MT663
plasmidem lPaC240 byl získán kmen LaC1667 (MT663/pLaC240),
který vylučuje insulin a jeho produktivita je 165 % ve
srovnání s produktivitou kmene LaC1414 (MT663/pLaC212spx3),
který obsahuje gen pro nemodifikovaný prekursor insulínu
s vedoucím řetězcem, tak jak byl popsán ve WO 89/02463.

P ř í k l a d 8

Produkce prekursoru analogu insulínu B(1-29, 1Glu+27Glu)-AlaAlaLys-A(1-21) z kvasinkového kmene KFN-470

Vazbou 10 oligonukleotidů bylo dosaženo konstrukce syntetického genu, který je kódem pro prekursor svrchu uvedeného analogu insulínu. B(1-29,1Glu+27Glu)- znamená polypeptid, který obsahuje prvních dvacetdevět zbytků aminokyselin řetězce B lidského insulínu, v němž byly zbytky Glu zavedeny místo B1Phe a B27Thr. A(1-21) je řetězec A lidského insulínu. Tripeptid AlaAlaLys spojuje zbytek B29Lys se zbytkem A1Gly.

Bylo syntetizováno následujících 10 oligonukleotidů:

- NOR-542: AAAGAGAAGTTAACCAACACTTGTGCGGTTCAC
- NOR-543: AACCAAGTGGGAACCGCACAAAGTGTGGTTAACTTC
- NOR-69: TTGGTTGAAGCTTTGTACTTGGTTTGCGGTGAAAGAGGTTTCT
- NOR-73: GTAGAAGAAACCTCTTTCACCGCAAACCAAGTACAAAGCTTC
- NOR-315: TCTACGAACCTAAGGCTGCTAAGGGTATTGCT
- NOR-316: ATTGTTGACAATACCCTTAGCAGCCTTACGTTC
- NOR-70: GAACAATGCTGTACCTCCATCTGCTCCTTGTTACCAAT
- NOR-71: TTTTCCAATTGGTACAAGGAGCAGATGGAGGTACAGC
- NOR-78: TGGAAAACCTACTGCAACTAGACGCAGCCCGCAGGCT
- NOR-72: CTAGAGCCTGCGGGCTGCGTCTAGTTGCAGTAG

Z uvedených 10 oligonukleotidů bylo vytvořeno 5 duplexů, které byly vzájemně návázány způsobem podle příkladu 1.

Syntetický gen o 178 bp byl navázán na fragment EcoRI-HgaI o 330 bp z plasmidu pKFN-9, tento fragment je kódem pro $\alpha 1$ signální řetězec a vedoucí řetězec (1-85) *S. cerevisiae*, jak bylo popsáno v publikaci Markussen J. a další, Protein Engineering 1 (1987), 215 až 223 a na fragment EcoRI-XbaI o 2,7 kb z plasmidu pUC19, který byl popsán v publikaci Aynisch-Perron, C., Vieira J. a Messing J., Gene 33 (1985), 103 až 119.

Vazná směs byla užita k transformaci kompetentního kmene *E. coli* (α^- , m^+), selekce byla prováděna podle odolnosti proti ampicilinu. Analýza řetězce fragmentu ^{32}P -XbaI-EcoRI podle publikace Maxam A. a Gilbert W., Methods Enzymol. 65 (1980), 499 až 540 prokázala, že plasmidy z výsledných kolonií obsahovaly správný řetězec DNA pro prekursor analogu insulinu.

Jeden z takto získaných plasmidů pKFN-456 byl vybrán pro další použití.

Způsobem podle příkladu 1 byl získán plasmid pKFN-458 pro expresi v kvasinkách, který obsahoval následující konstrukci:

T a b u l k a 2

Úroveň exprese prekursoru insulinu a analogů insulinu
v transformantech kvasinek

prekursor	úroveň exprese ^x
B(1-29)-AlaAlaLys-A(1-21)	100 %
B(1-29 ,27Glu)-AlaAlaLys-A(1-21)	148 %
B(1-29,1Glu+27Glu)-AlaAlaLys-A(1-21)	479 %

^x Úroveň exprese je uváděna v procentech exprese pro
prekursor insulinu B(1-29)-AlaAlaLys-A(1-21), která je
pokládána za 100 %.

TPI_P-M_Fal-signální řetězec-vedoucí řetězec(1-85)-B(1-29.-1Glu+27Glu)-AlaAlaLys-A(1-21)-TPI_T.

Řetězec DNA pro fragment EcoRI-XbaI o 508 bp z plasmidů pKFN-456 a pKFN-458 je znázorněn na obr. 17.

Plasmid pKFN-458 byl užit k transformaci kvasinkového kmene MT-663 svrchu uvedeným způsobem za vzniku kvasinkového kmene KFN-470.

Transformovaný kmen KFN-470 byl pěstován v prostředí YPD svrchu uvedeným způsobem. Výtěžek prekursoru insulinového analogu v supernatantu byl stanoven vysokotlakou kapalinovou chromatografií podle publikace L. Snel a další, *Chromatographia* 24 (1987), 329-332.

V tabulce 2 je uvedena pro srovnání úroveň exprese prekursorů insulinových analogů B(1-29,1Glu+27Glu)-AlaAlaLys-A(1-21) a B(1-29,27Glu)-AlaAlaLys-A(1-21) a prekursoru insulinu B(1-29)-AlaAlaLys-A(1-21). Expese všech tří prekursorů bylo dosaženo v totéž hostitelském kmeni MT-663, který byl transformován plasmidy S obsahem genu TPI ze *S. pombe*.

Všechny plasmidy obsahovaly následující konstrukci:

TPI_P-M_Fal-signální řetězec-vedoucí řetězec(1-85)-prekursor-TPI_T.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Polypeptid obsahující spojení signálního peptidu, který je hydrofóbní, vedoucího peptidu, který je ~~převážně~~ hydrofilní, a heterologního proteinu či polypeptidu, přičemž polypeptid je modifikován ve své aminokyselinové sekvenci sousedící s kvasinkovým procesním místem, umístěným mezi C-koncem ^{vedoucího} ~~hlavního~~ peptidu a N-koncem heterologního proteinu, přičemž polypeptid má strukturu signální peptid-vedoucí peptid-X¹-X²-X³-X⁴-heterologní protein v němž X¹ znamená peptidovou vazbu nebo 1-6 aminokyselin, které mohou být stejné nebo různé, X² a X³, jež mohou být stejné nebo rozdílné, znamenají báze aminokyselinu ze skupiny Lys a Arg, ~~když~~ X² a X³ definují společně kvasinkové procesní místo a X⁴ znamená peptidovou vazbu nebo 1-6 aminokyselin, jež mohou být stejné nebo různé, a pokud X⁴ znamená jednu nebo více aminokyselin, je vsunuto přídavné procesní místo mezi X⁴ a N-konec heterologního proteinu, a za ^{podmínky} ~~předpokladu~~, že X¹ a/nebo X⁴ znamená 1-6 aminokyselin a alespoň jedna z aminokyselin ve významu X¹ a/nebo X⁴ znamená negativně nabitou aminokyselinu ze skupiny Glu a Asp a za ^{podmínky} ~~dalšího předpokladu~~, že pokud X¹ znamená peptidovou vazbu, X⁴ má jiný význam než Glu-Ala-Glu-Ala, Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala, Glu-Ala-Glu-Ala-Ser-Leu-Asp-Lys-Arg nebo Glu-Ala-Glu-Ala-Ser-Leu-Asp a znamená-li X⁴ peptidovou vazbu, X¹ má jiný význam než Ser-Leu-Asp a ještě za ^{podmínky} ~~dalšího předpokladu~~, že sestava signální peptid-vedoucí peptid-X¹ má jiný význam než signální peptid α -faktoru a vedoucí peptid α -faktoru (1-85)-Glu-Ala-Glu-Ala-Ser-Leu-Asp, signální peptid α -faktoru a vedoucí peptid α -faktoru (1-80)-Pro-Leu-Asp, signální peptid α -faktoru a vedoucí peptid α -faktoru (1-80)-Glu-Leu-Asp a Met-Lys-Trp-Val-Ser-Phe-Ile-Ser-Leu-Leu-Phe-Leu-Phe-Ser-Ser-Ala-Tyr-Ser-Arg-Ser-Leu-Asp.

2. Polypeptid podle nároku 1, kde X^1 znamená Glu nebo Asp.
3. Polypeptid podle nároku 1, kde X^1 znamená sekvenci dvou aminokyselin se strukturou BA, kde A znamená Glu nebo Asp a B znamená Glu, Asp, Val, Gly nebo Leu.
4. Polypeptid podle nároku 1, kde X^1 znamená sekvenci tří aminokyselin se strukturou CBA a kde A a B mají výše uvedené významy a C znamená Glu, Asp, Pro, Gly, Val, Leu, Arg nebo Lys.
5. Polypeptid podle nároku 1, kde X^1 znamená sekvenci čtyř aminokyselin se strukturou DCBA, kde A, B a C mají výše uvedené významy a D má též význam jako C.
6. Polypeptid podle nároku 1, kde X^1 znamená sekvenci pěti aminokyselin se strukturou EDCBA, kde A, B, C a D mají výše uvedené významy a E má též význam jako C.
7. Polypeptid podle nároku 1, kde X^1 znamená sekvenci šesti aminokyselin se strukturou FEDCBA, kde A, B, C, D a E mají výše uvedené významy a F má též význam jako C.
8. Polypeptid podle nároku 1, kde X^4 znamená Glu nebo Asp.
9. Polypeptid podle nároku 1, kde X^4 znamená sekvenci dvou aminokyselin se strukturou AB, kde A znamená Glu nebo Asp a B znamená Glu, Asp, Val, Gly nebo Leu.
10. Polypeptid podle nároku 1, kde X^4 znamená sekvenci tří aminokyselin se strukturou ABC, kde A a B mají výše uvedené významy a C znamená Glu, Asp, Pro, Gly, Val, Leu, Arg nebo Lys.

11. Polypeptid podle nároku 1, kde X^4 znamená sekvenci čtyř aminokyselin se strukturou ABCD, kde A, B a C mají výše uvedené významy a D má stejný význam jako C.
12. Polypeptid podle nároku 1, kde X^4 znamená sekvenci pěti aminokyselin se strukturou ABCDE, kde A, B, C a D mají výše uvedené významy a E má též význam jako C.
13. Polypeptid podle nároku 1, kde X^4 znamená sekvenci šesti aminokyselin se strukturou ABCDEF, kde A, B, C, D a E mají výše uvedené významy a F má stejný význam jako C.
14. Polypeptid podle nároku 1, kde - pokud X^1 a/nebo X^4 znamená více než jednu aminokyselinu, pak aminokyselinou bezprostředně sousedící s X^2 je Glu nebo Asp, aminokyselinou bezprostředně sousedící s X^3 je Glu nebo Asp nebo v obou případech Glu nebo Asp.
15. Polypeptid podle nároku 1, kde - pokud X^1 a/nebo X^4 znamenají více než jednu aminokyselinu, buď X^1 nebo X^4 nebo oba tyto symboly znamenají více než jednu Glu či Asp.
16. Polypeptid podle nároku 1, kde X^1 a X^4 v obou případech znamenají jednu aminokyselinu nebo více než jednu aminokyselinu.
17. Polypeptid podle nároku 16, kde X^1 a X^4 jsou symetricky totožné.
18. Polypeptid podle nároku 1, kde - pokud X^4 znamená jednu nebo více aminokyselin, je vsunuto přídatné procesní místo mezi X^4 a N-konec heterologního peptidu.
19. Polypeptid podle nároku 1, kde signálním peptidem je signální peptid α -faktoru, signální peptid myšší slinné

amylasy, karboxypeptidasový signální peptid nebo kvasinkový BAR1 signální peptid.

20. Polypeptid podle nároku 1, kde vedoucím peptidem je některý z přírodních vedoucích peptidů, jako je vedoucí peptid α -faktoru.

21. Polypeptid podle nároku 1, kde vedoucím peptidem je syntetický vedoucí peptid, jako je

A. Ala-Pro-Val-Thr-Gly-Asp-Glu-Ser-Ser-Val-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Ser-Leu-Ile-Gly-Phe-Leu-Asp-Leu-Ala-Gly-Glu-Glu-Ile-Ala-Glu-Asn-Thr-Thr-Leu-Ala.

B. Ala-Pro-Val-Thr-Gly-Asp-Glu-Ser-Ser-Val-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Ser-Leu-Ile-Ile-Ala-Glu-Asn-Thr-Thr-Leu-Ala.

C. Ala-Pro-Val-Thr-Gly-Asp-Glu-Ser-Ser-Val-Glu-Ile-Pro-Ile-Ala-Glu-Asn-Thr-Thr-Leu-Ala.

D. Ala-Pro-Val-Thr-Gly-Asp-Glu-Ser-Ser-Val-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Ser-Leu-Ile-Ile-Ala-Glu-Asn-Thr-Thr-Leu-Ala-Asn-Val-Ala-Met-Ala a

E. Gln-Pro-Val-Thr-Gly-Asp-Glu-Ser-Ser-Val-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Ser-Leu-Ile-Ile-Ala-Glu-Asn-Thr-Thr-Leu-Ala-Asn-Val-Ala-Met-Ala.

22. Polypeptid podle nároku 1, kde heterologní protein nebo polypeptid je zvolen ze skupiny, zahrnující aprotinin či další inhibitory proteázy, inzulin a jeho prekurzory, lidské nebo hovězí růstové hormony, interleukin, aktivátor tkáňového plazminogenu, glukagon, faktor VII, faktor VIII, faktor XIII, destičkový růstový faktor, enzymy a funkční analog kteréhokoli z uvedených proteinů.

23. Polypeptid podle nároku 22, kde heterologním proteinem nebo polypeptidem je aprotinin nebo jeho funkční obdoba.
24. Polypeptid podle nároku 23, kde X^1 znamená Glu-Arg-Leu-Glu nebo Lys-Glu-Leu-Glu.
25. Polypeptid podle nároku 23, kde X^4 znamená Glu-Leu nebo Glu-Leu-Asp-Leu.
26. Polypeptid podle nároku 22, kde heterologním proteinem nebo polypeptidem je inzulin nebo jeho ~~je~~ prekuzory inzulinu nebo jejich funkční obdoba.
27. Polypeptid podle nároku 26, kde X^1 znamená Glu-Arg-Leu-Glu nebo Lys-Glu-Leu-Glu.
28. Polypeptid podle nároku 26, kde X^4 znamená Glu.
29. Polypeptid podle kteréhokoli z nároků 26-28, kde heterologním proteinem nebo polypeptidem je prekuzor inzulinového analogu B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-29), kde X^1 znamená Lys-Glu-Leu-Glu.
30. Polypeptid podle kteréhokoliv z nároků 26 až 28, v němž heterologním proteinem nebo polypeptidem je prekuzor inzulinového analogu B(1-29)-Ser-Asp-Asp-Ala-Lys-A(1-29), v níž X^1 znamená Lys-Glu-Leu-Glu.
31. Konstrukce DNA obsahující sekvenci DNA ^{kódující} ~~se zakódovaným~~ polypeptidem podle kteréhokoliv z nároků 1 až 30.
32. Konstrukce DNA podle nároku 31, obsahující sekvenci DNA podle obrázku 4, 7, 9 nebo 11.

33. Rekombinantní expresní vektor nesoucí konstrukci DNA podle nároku 31 nebo 32, vybraný ze skupiny zahrnující pKFN-802, pKFN-803, pKFN-849, pKFN-855, pKFN-852, pKFN-858, pKFN-995, pKFN-998, pKFN-1000, pKFN-1003, *definovaný* na obr. č. 2, 3, 6, 8 a 10.
34. Rekombinantní expresní vektor nesoucí konstrukci DNA podle nároku 31 nebo 32 vybraný ze skupiny zahrnující pKFN-305, pKFN-374, pMT-636 a pLaC-240, *definovaný* ~~jak uvedeno na obrázcích č. 13, 2 a 15.~~
35. Kmen kvasinek, schopný exprese heterologního proteinu nebo polypeptidu, který je transformován vektorem podle nároku 33.
36. Způsob výroby polypeptidu v ^{*kvasině*} ~~buňce~~, vyznačující se tím, že zahrnuje kultivování kmene kvasinek podle nároku 35 v živném prostředí za exprese a sekrece vznikajícího heterologního proteinu nebo polypeptidu, načež se protein nebo polypeptid izolují z prostředí.

1 5 10
MetAlaLysArgArgProAspPheCysLeuGluProProTyrThrGly
NcoI StuI
CATGGCCAAAAGAAGGCCTGATTCTGTTTGGAACTCCATACACTGGT
CGGTTTCTTCCGGACTAAAGACAAACCTTGGAGGTATGTGACCA

15 20 25
ProCysLysAlaArgIleIleArgTyrPheTyrAsnAlaLysAlaGly
CDATGTAAAGCTAGAATCATCAGATACTTCTACAACGCCAAGGCTGGT
GGTACATTTCGATCTTAGTAGTCTATGAAGATGTTGCGGTTCCGACCA

30 35 40
LeuCysGlnThrPheValTyrGlyGlyCysArgAlaLysArgAsnAsn
TTGTGTCAAACCTTTCGTTTACGGTGGCTGCAGAGCTAAGAGAAACAAC
AACACAGTTTGAAAGCAAATGCCACCGACGTCTCGATTCTCTTTGTTG

45 50 55 58
PheLysSerAlaGluAspCysMetArgThrCysGlyGlyAlaStop
TTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACTTGTGGTGGTGCCTAAT XbaI
AAGTTCAGACGACTTCTGACGTACTCTTGAACACCACCACGGATTAGATC

2/18

PV 1039-90

~~7949~~

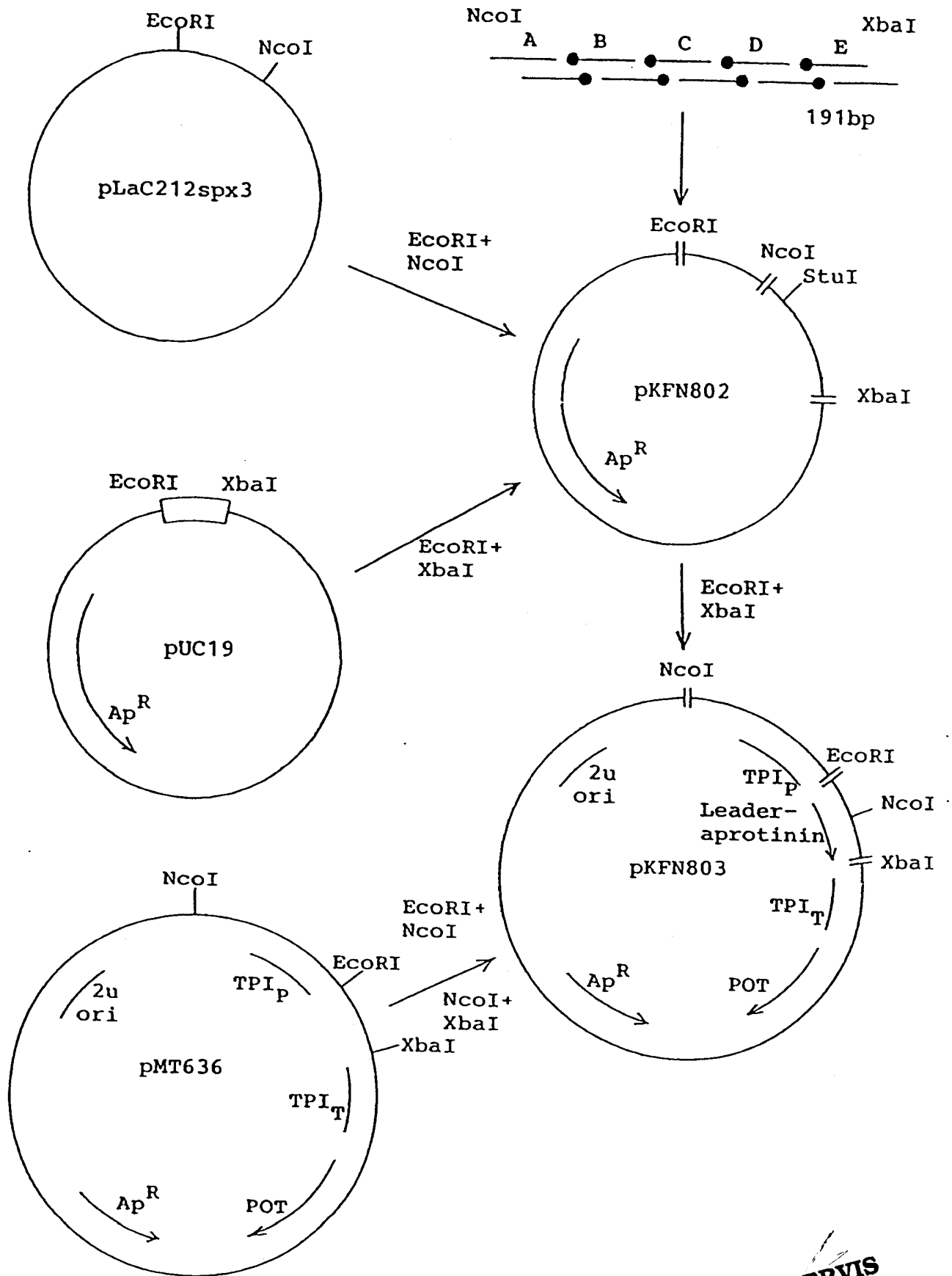


Fig. 2

TISK

3/18

7U 1039-90

~~71949~~

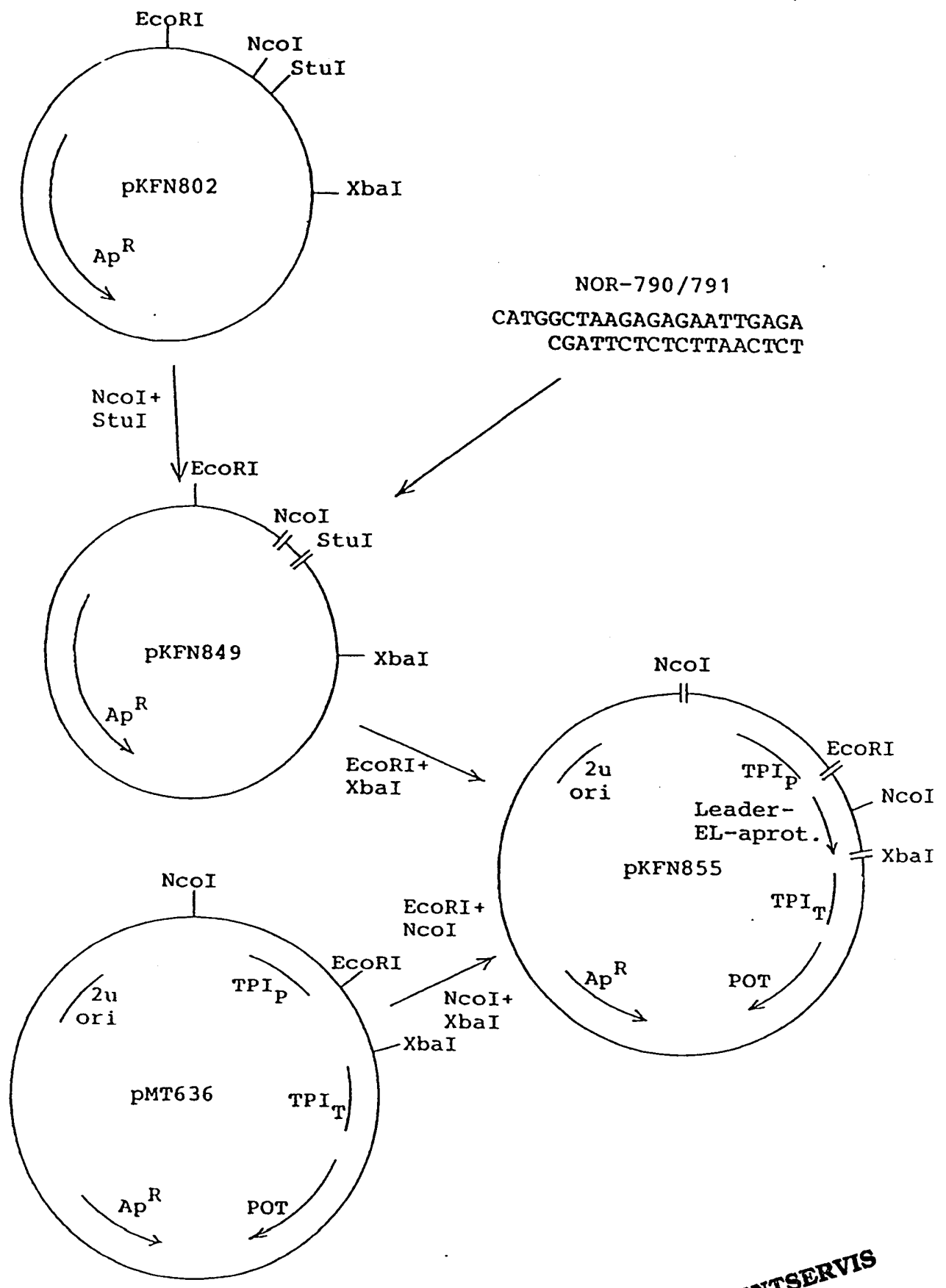


Fig. 3

PATENTSERVIS
 Praha a.s.
 -26-

4/18

PV 1039-90

~~71949~~

10 20 30 40 50 60
| | | | |
GAATTCCATTCAAGAATAGTTCAAACAAGAAGATTACAAACTATCAATTTTCATACACAAT

70 80 90 100 110 120
| | | | |
ATAAACGACCAAAAGAATGAAGGCTGTTTTCTTGGTTTTGTCCTTGATCGGATTCTGCTG

METLysAlaValPheLeuValLeuSerLeuIleGlyPheCysTrp

130 140 150 160 170 180
| | | | |
GGCCCAACCAGTCACTGGCGATGAATCATCTGTTGAGATTCCGGAAGAGTCTCTGATCAT

AlaGlnProValThrGlyAspGluSerSerValGluIleProGluGluSerLeuIleIle

190 200 210 220 230 240
| | | | |
CGCTGAAAACACCACTTTGGCTAACGTCGCCATGGCTAAGAGAGAATTGAGACCTGATTT

AlaGluAsnThrThrLeuAlaAsnValAlaMETAlaLysArgGluLeuArgProAspPhe
↑

250 260 270 280 290 300
| | | | |
CTGTTTGGAACTCCATACACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATCATCAGATACTTCTACAA

CysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIleIleArgTyrPheTyrAsn

310 320 330 340 350 360
| | | | |
CGCCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACCTTTCGTTTACGGTGGCTGCAGAGCTAAGAGAAACAA

AlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGlyGlyCysArgAlaLysArgAsnAsn

370 380 390 400 410
| | | | |
CTTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACTTGTGGTGGTGCCTAATCTAGA

PheLysSerAlaGluAspCysMETArgThrCysGlyGlyAla

Fig. 4

5/18

PV 1039-90

~~47949~~

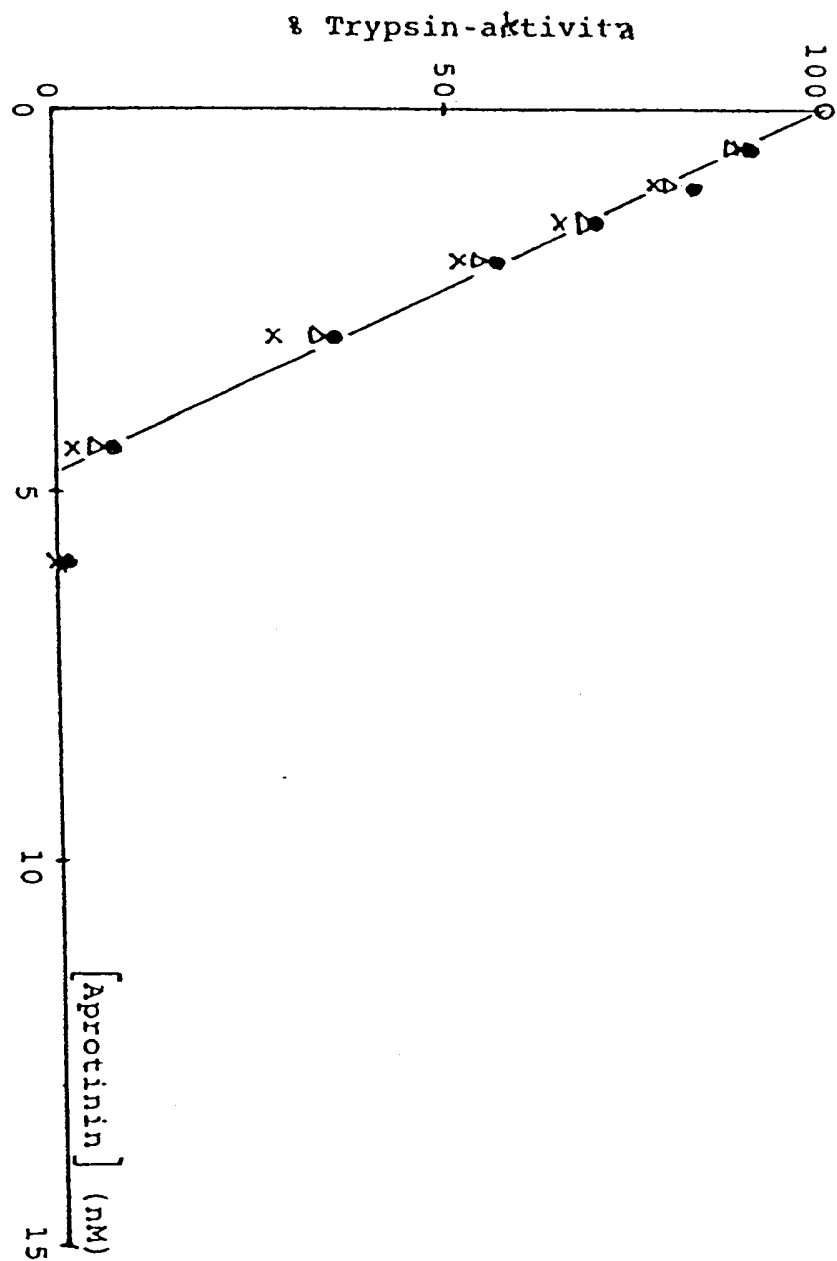


Fig. 5A

6/18

PV 1039-90

~~71949~~

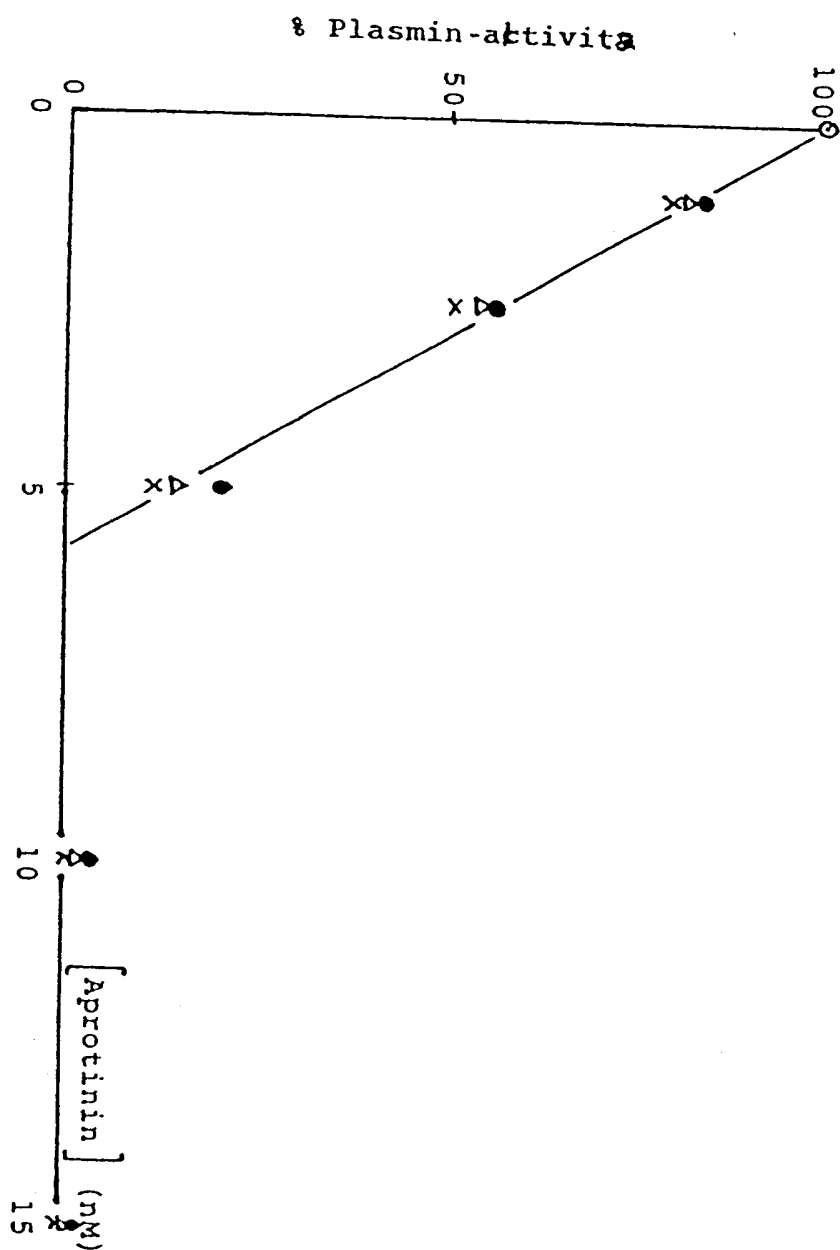


Fig. 5B

TSE

7/18

PU 1039-90

71929

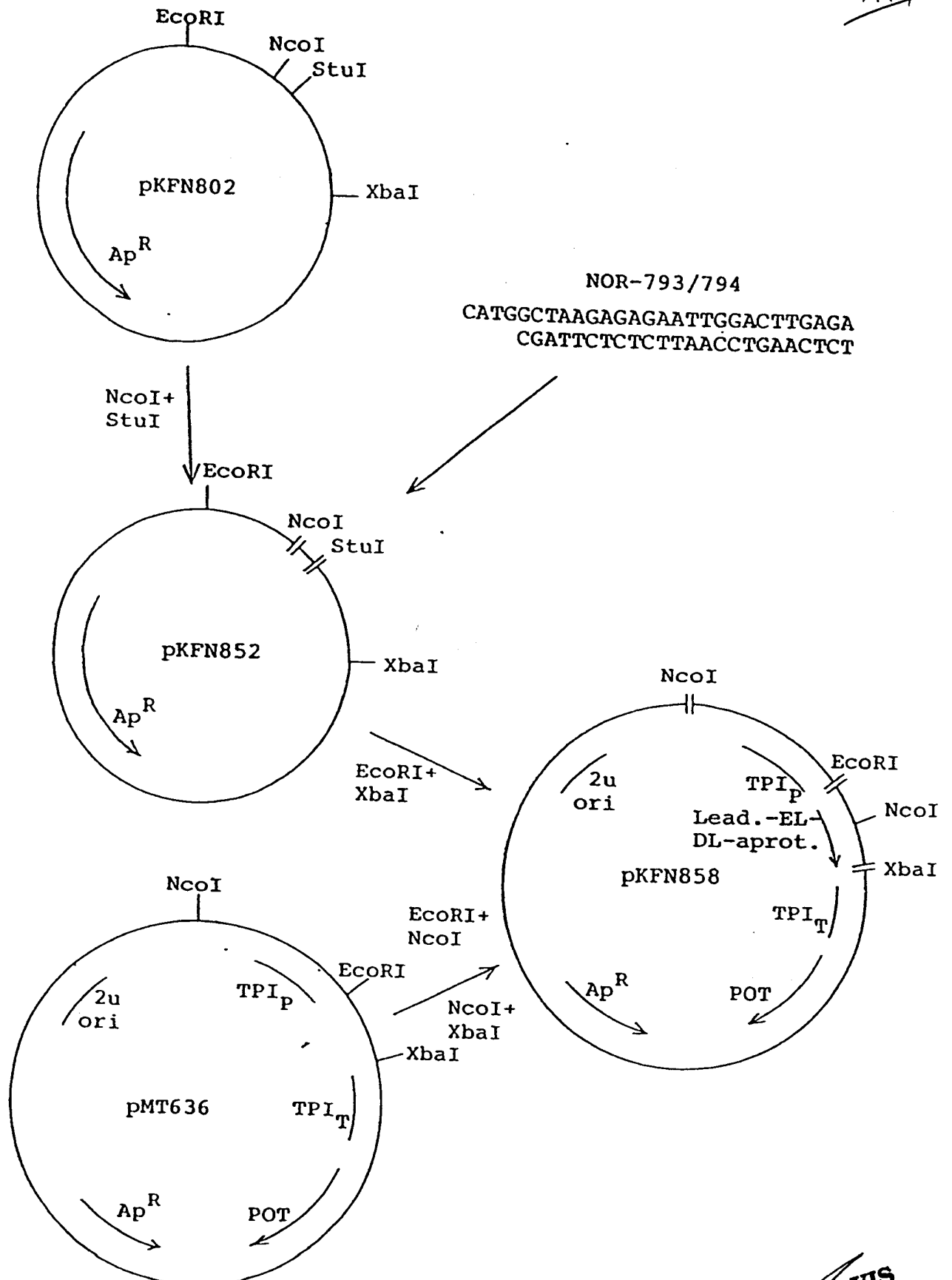


Fig. 6

PATENTSERVIS
 Praha a.s.
 26

8/18

7U 1039-90

7949

10 20 30 40 50 60
GAATTCCATTCAAGAATAGTTCAAACAAGAAGATTACAAACTATCAATTCATACACAAT

70 80 90 100 110 120
ATAAACGACCAAAAGAATGAAGGCTGTTTTCTTGGTTTTGTCCTTGATCGGATTCTGCTG

METLysAlaValPheLeuValLeuSerLeuIleGlyPheCysTrp

130 140 150 160 170 180
GGCCCAACCAGTCACTGGCGATGAATCATCTGTTGAGATTCCGGAAGAGTCTCTGATCAT

AlaGlnProValThrGlyAspGluSerSerValGluIleProGluGluSerLeuIleIle

190 200 210 220 230 240
CGCTGAAAACACCACTTTGGCTAACGTCGCCATGGCTAAGAGAGAATTGGACTTGAGACC

AlaGluAsnThrThrLeuAlaAsnValAlaMETAlaLysArgGluLeuAspLeuArgPro

250 260 270 280 290 300
TGATTTCTGTTTGGAACTCCATACACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATCATCAGATACTT

AspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIleIleArgTyrPhe

310 320 330 340 350 360
CTACAACGCCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACCTTCGTTTACGGTGGCTGCAGAGCTAAGAG

TyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGlyGlyCysArgAlaLysArg

370 380 390 400 410
AAACAACCTTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACTTGTGGTGGTGCCTAATCTAGA

AsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMETArgThrCysGlyGlyAla

Fig. 7

PATENTSERVIS
Pratt & Sons
-26-

T156

9/18

PU 1035-90

71949

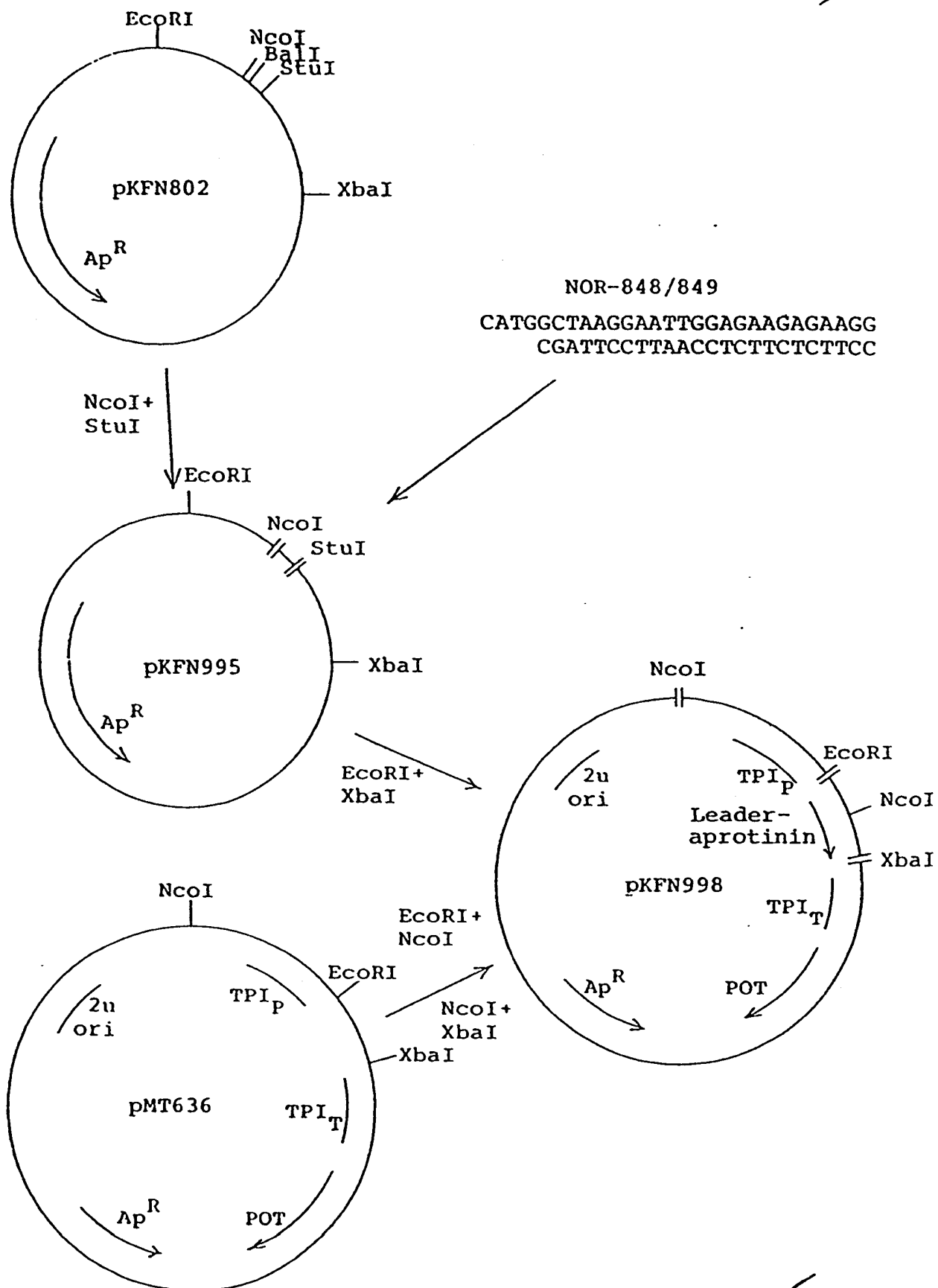


Fig. 8

TSC

10/18

PU1039-90

~~71949~~

10 20 30 40 50 60
 | | | | |
 GAATTCCATTCAAGAATAGTTCAAACAAGAAGATTACAAACTATCAATTCATACACAAT

 70 80 90 100 110 120
 | | | | |
 ATAAACGACCAAAGAATGAAGGCTGTTTTCTTGTTTTGTCCTTGATCGGATTCTGCTG
 METLysAlaValPheLeuValLeuSerLeuIleGlyPheCysTrp

 130 140 150 160 170 180
 | | | | |
 GGCCCAACCAGTCACTGGCGATGAATCATCTGTTGAGATTCCGGAAGAGTCTCTGATCAT
 AlaGlnProValThrGlyAspGluSerSerValGluIleProGluGluSerLeuIleIle

 190 200 210 220 230 240
 | | | | |
 CGCTGAAAACACCACTTTGGCTAACGTCGCCATGGCTAAGGAATTGGAGAAGAGAAGGCC
 AlaGluAsnThrThrLeuAlaAsnValAlaMETAlaLysGluLeuGluLysArgArgPro
 ↑
 250 260 270 280 290 300
 | | | | |
 TGATTTCTGTTTGGAACCTCCATACACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATCATCAGATACTT
 AspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIleIleArgTyrPhe

 310 320 330 340 350 360
 | | | | |
 CTACAACGCCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACCTTTCGTTTACGGTGGCTGCAGAGCTAAGAG
 TyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGlyGlyCysArgAlaLysArg

 370 380 390 400 410
 | | | | |
 AAACAACCTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACTTGTGGTGGTGCCTAATCTAGA
 AsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMETArgThrCysGlyGlyAla

Fig. 9

PATENTSERVIS
 Praha a.s.
 -26-

75K

11/18

PV1039-90

7/9/99

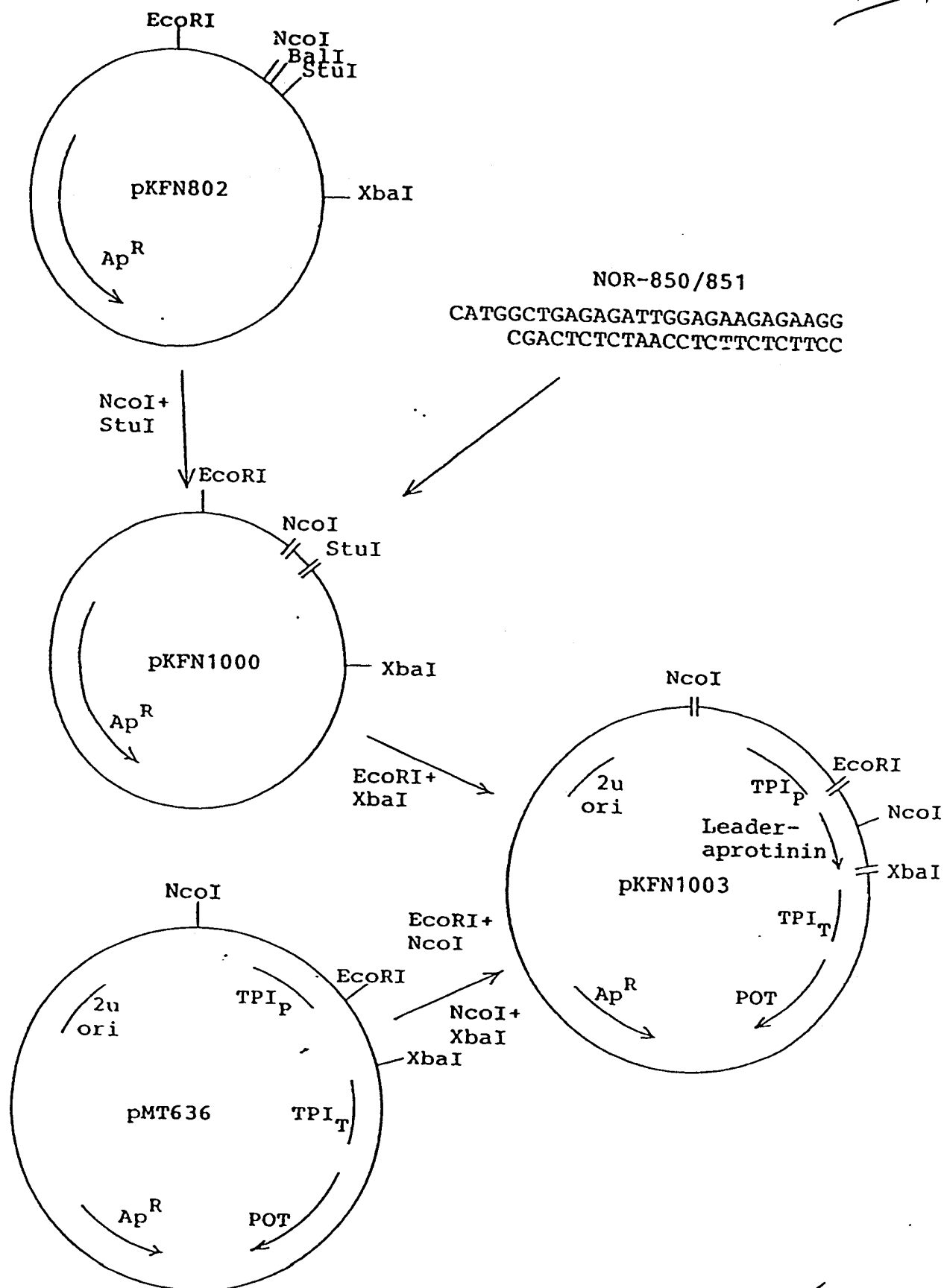


Fig. 10

PATENTSERVIS
Praha a.s.
-26-

12/18

PU 1039-90

1999

10 20 30 40 50 60
GAATTCCATTCAAGAATAGTTCAAACAAGAAGATTACAACTATCAATTTTCATACACAAT

70 80 90 100 110 120
ATAAACGACCAAAGAATGAAGGCTGTTTTCTTGGTTTTGTCTTGATCGGATTCTGCTG

METLysAlaValPheLeuValLeuSerLeuIleGlyPheCysTrp

130 140 150 160 170 180
GGCCCAACCAGTCACTGGCGATGAATCATCTGTTGAGATTCCGGAAGAGTCTCTGATCAT

AlaGlnProValThrGlyAspGluSerSerValGluIleProGluGluSerLeuIleIle

190 200 210 220 230 240
CGCTGAAAACACCACTTTGGCTAACGTCGCCATGGCTGAGAGATTGGAGAAGAGAAGGCC

AlaGluAsnThrThrLeuAlaAsnValAlaMETAlaGluArgLeuGluLysArgArgPro

250 260 270 280 290 300
TGATTTCTGTTTGGAACCTCCATACACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATCATCAGATACTT

AspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIleIleArgTyrPhe

310 320 330 340 350 360
CTACAACGCCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACCTTCGTTTACGGTGGCTGCAGAGCTAAGAG

TyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGlyGlyCysArgAlaLysArg

370 380 390 400 410
AAACAACCTTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACTTGTGGTGGTGCCTAATCTAGA

AsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMETArgThrCysGlyGlyAla

Fig. 11

PATENTSERVIS
Prana-a.s.
-26-

TSC

PV1039-90

7749

13/18

3 5 10 15
 AspPheCysLeuGluProProTyrThrGlyProCysLysAlaArgIle
 AAAGAGATTCTGTTTGGAACCTCCATACACTGGTCCATGTAAAGCTAGAATC
 CTAAAGACAAACCTTGGAGGTATGTGACCAGGTACATTTCGATCTTAG

20 25 30 35
 IleArgTyrPheTyrAsnAlaLysAlaGlyLeuCysGlnThrPheValTyrGly
 ATCAGATACTTCTACAACGCAAGGCTGGTTTGTGTCAAACCTTCGTTTACGGT
 TAGTCTATGAAGATGTTGCGGTTCCGACCAAACACAGTTTGAAAGCAAATGCCA

40 45 50
 GlyCysArgAlaLysArgAsnAsnPheLysSerAlaGluAspCysMetArgThr
 GGCTGCAGAGCTAAGAGAAACAACCTCAAGTCTGCTGAAGACTGCATGAGAACT
 CCGACGTCTCGATTCTCTTTGTTGAAGTTCAGACGACTTCTGACGTACTCTTGA

55 58
 CysGlyGlyAlaStopXbaI
 TGTGGTGGTGCCTAAT
 ACACCACCACGGATTAGATC

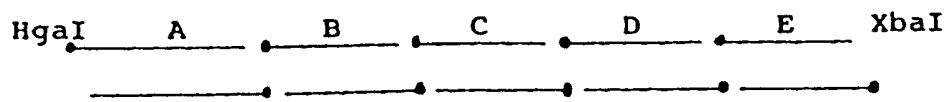


Fig. 12

PATENTSERVIS
 Praha a.s.
 28

14/18

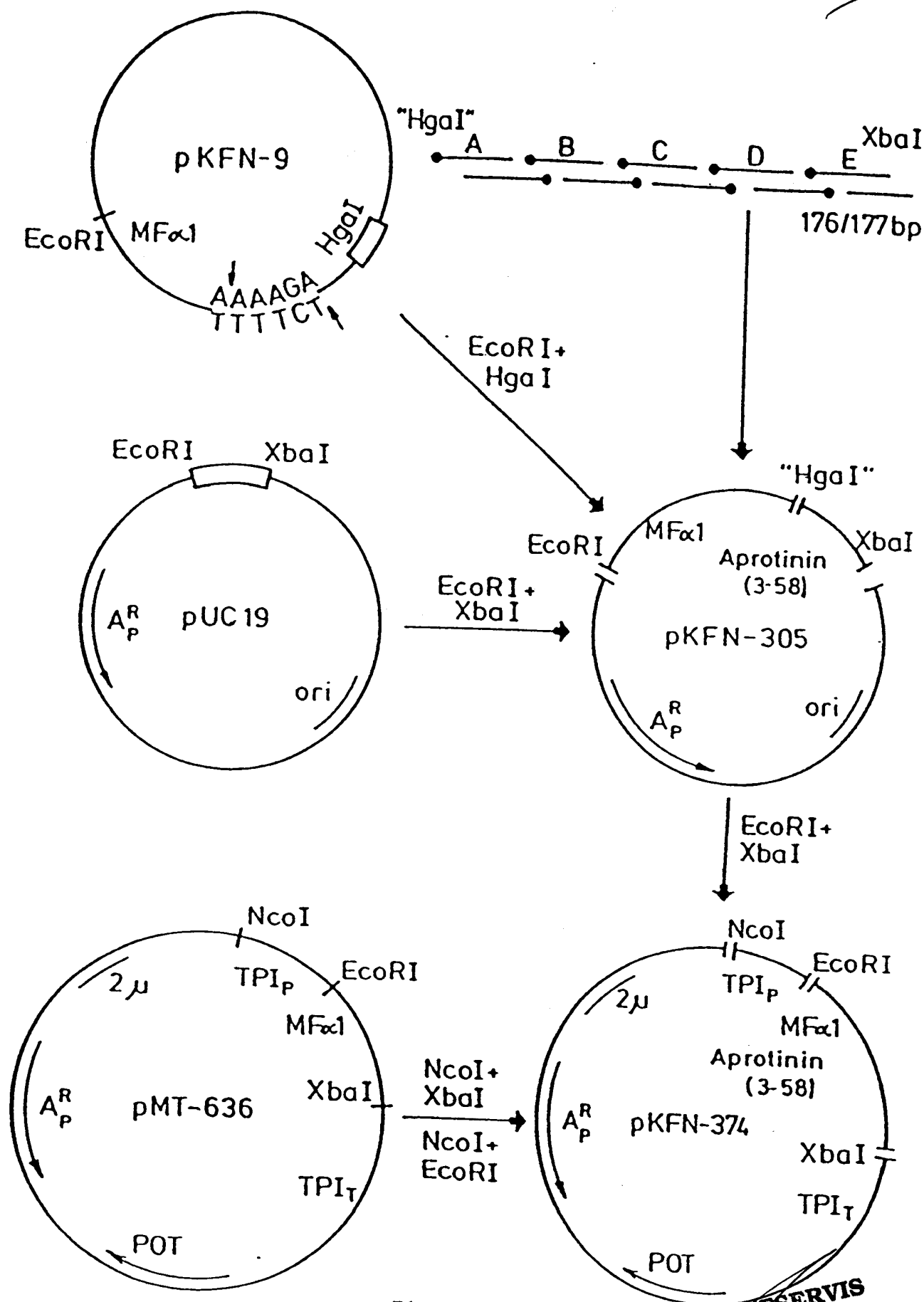


Fig. 13

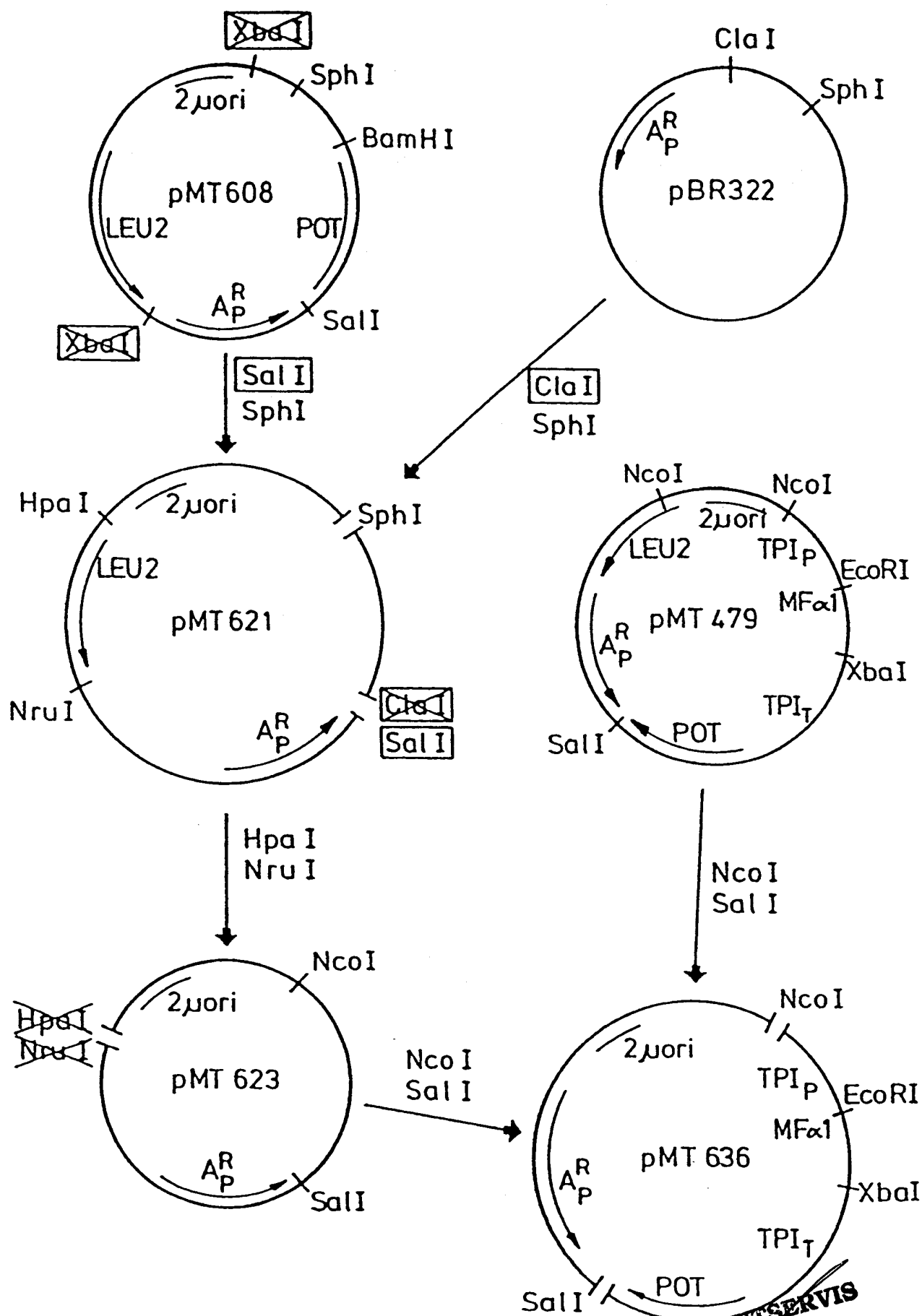


Fig. 14

TSK

16/18

PV1039-90

7949

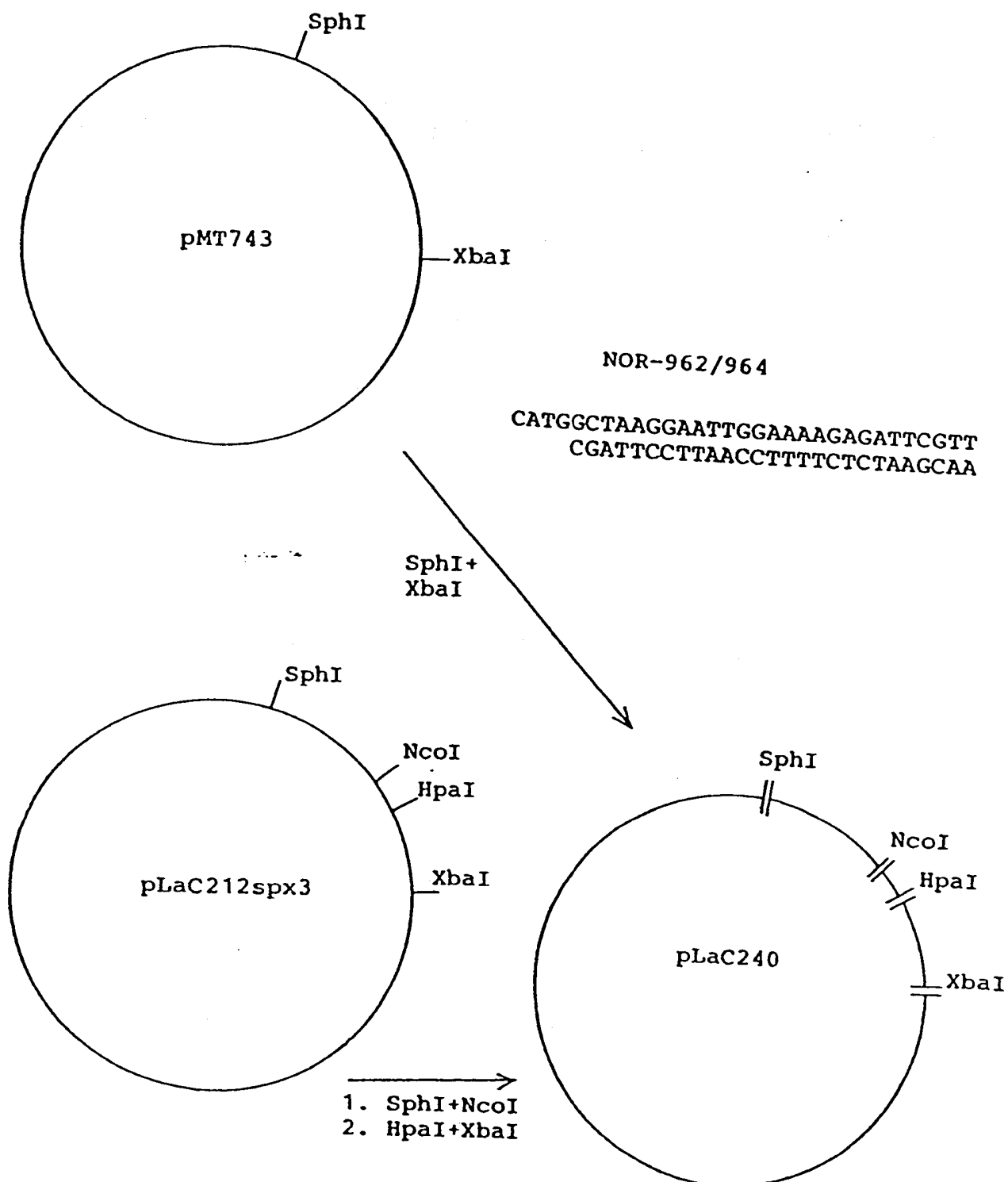


Fig. 15

PATENTSERVIS
Praha a.s.
26

10 20 30 40 50 60
GAATTCCATTCAAGAATAGTTCAAACAAGAAGATTACAACTATCAATTCATACACAAT

70 80 90 100 110 120
ATAAACGACCAAAAGAATGAAGGCTGTTTCTTGTTTGTCTTGATCGGATTCTGCTG

METLysAlaValPheLeuValLeuSerLeuIleGlyPheCysTrp

130 140 150 160 170 180
GGCCCAACCAGTCACTGGCGATGAATCATCTGTTGAGATTCCGGAAGAGTCTCTGATCAT

AlaGlnProValThrGlyAspGluSerSerValGluIleProGluGluSerLeuIleIle

190 200 210 220 230 240
CGCTGAAAACACCACTTTGGCTAACGTCGCCATGGCTAAGGAATTGGAAAAGAGATTTCGT

AlaGluAsnThrThrLeuAlaAsnValAlaMETAlaLysGluLeuGluLysArgPheVal

250 260 270 280 290 300
TAACCAACACTTGTGCGGTTCCCACTTGGTTGAAGCTTTGTACTTGGTTTGCGGTGAAAG

AsnGlnHisLeuCysGlySerHisLeuValGluAlaLeuTyrLeuValCysGlyGluArg

310 320 330 340 350 360
AGGTTTCTTCTACACTCCTAAGGCTGCTAAGGGTATTGTGCAACAATGCTGTACCTCCAT

GlyPhePheTyrThrProLysAlaAlaLysGlyIleValGluGlnCysCysThrSerIle

370 380 390 400 410
CTGCTCCTTGTACCAATTGGA AAACTACTGCAACTAGACGCAGCCCGCAGGCTCTAGA

CysSerLeuTyrGlnLeuGluAsnTyrCysAsn

TISK

PV 1039-90

4949

18/18

10 20 30 40 50 60
GAATTCCATTCAAGAATAGTTCAAACAAGAAGATTACAACTATCAATTCATACACAAT
70 80 90 100 110 120
ATAAACGATTAAAAGAATGAGATTCCTTCAATTTTACTGCAGTTTATTTCGCAGCATC
METArgPheProSerIlePheThrAlaValLeuPheAlaAlaSer
130 140 150 160 170 180
CTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGC
SerAlaLeuAlaAlaProValAsnThrThrThrGluAspGluThrAlaGlnIleProAla
190 200 210 220 230 240
TGAAGCTGTCATCGGTTACTTAGATTTAGAAGGGGATTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATT
GluAlaValIleGlyTyrLeuAspLeuGluGlyAspPheAspValAlaValLeuProPhe
250 260 270 280 290 300
TTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGC
SerAsnSerThrAsnAsnGlyLeuLeuPheIleAsnThrThrIleAlaSerIleAlaAla
310 320 330 340 350 360
TAAAGAAGAAGGGGTATCTTTGGATAAAAGAGAAGTTAACCAACACTTGTGCGGTTCCCA
LysGluGluGlyValSerLeuAspLysArgGluValAsnGlnHisLeuCysGlySerHis
370 380 390 400 410 420
CTTGTTGAAGCTTTGTACTTGGTTTGGGTGAAAGAGGTTTCTTCTACGAACCTAAGGC
LeuValGluAlaLeuTyrLeuValCysGlyGluArgGlyPhePheTyrGluProLysAla
430 440 450 460 470 480
TGCTAAGGGTATTGTGCAACAATGCTGTACCTCCATCTGCTCCTTGTAACCAATTGGAAAA
AlaLysGlyIleValGluGlnCysCysThrSerIleCysSerLeuTyrGlnLeuGluAsn
490 500 510
CTACTGCAACTAGACGCAGCCCGCAGGCTCTAGA
TyrCysAsn

Fig. 17

PATENTSERVIS
Prana a.s.
-26-