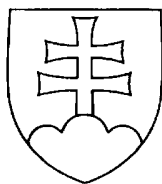


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA**

- (22) Dátum podania prihlášky: **7. 11. 2001**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **0027779.8**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **14. 11. 2000**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **GB**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **8. 1. 2004**
Vestník ÚPV SR č.: **1/2004**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky
v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: **PCT/EP01/12857**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: **WO02/40650**

(11), (21) Číslo dokumentu:

579-2003

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :

**C12N 15/62,
C12N 9/72,
C12N 15/58,
C12N 5/10**

(71) Prihlasovateľ: **BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH, Ingelheim am Rhein, DE;**

(72) Pôvodca: **Werner Rolf-Günther, Biberach an der Riss, DE;
Goetz Friedrich, Tübingen, DE;
Tayapiwatana Chatchai, Bangkok, TH;
Manosroi Jiradej, Muang Chiang Mai, TH;
Manosroi Aranya, Muang Chiang Mai, TH;**

(74) Zástupca: **Majlingová Marta, Ing., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Spôsob produkcie tPA, jeho variantu alebo K2S molekuly a jej variantu odvodených z rekombinantnej DNA, DNA molekula, fúzovaný proteín, vektor, prokaryotická bunka, hostiteľská bunka obsahujúce DNA a ich použitie**

(57) Anotácia:
Je opísaný spôsob produkcie tPA odvodeného z rekombinantnej DNA, jeho variant alebo (Kringle 2 serín) K2S molekuly alebo jej variant, v prokaryotických bunkách, pričom uvedený tPA alebo K2S alebo variant sa vylučuje extracelulárne ako aktívny a správne poskladaný proteín, a prokaryotická bunka obsahuje a exprimuje vektor obsahujúci DNA kódujúcu tPA alebo K2S alebo variant, operatívne spojenú s DNA kódujúcou signálny peptid OmpA. Tiež sú opísané špecifické K2S deriváty získateľné uvedeným spôsobom.

Spôsob produkcie tPA, jeho variantu alebo K2S molekuly a jej variantu odvodených z rekombinantnej DNA, DNA molekula, fúzovaný proteín, vektor, prokaryotická bunka, hostiteľská bunka obsahujúce DNA a ich použitie

Oblasť techniky

Vynález spadá do oblasti trombolýzy a produkcie derivátu tkanivového plazminogénového aktivátora (tPA) v prokaryotických bunkách.

Vynález sa týka spôsobov produkcie tPA odvodeného z rekombinantnej DNA, jeho variantu alebo (Kringle 2 serín) K2S molekuly alebo jej variantu, v prokaryotických bunkách, pričom uvedený tPA alebo K2S alebo variant sa vylučuje extracelulárne ako aktívny a správne poskladaný proteín, a prokaryotická bunka obsahuje a exprimuje vektor obsahujúci DNA kódujúcu tPA alebo K2S alebo variant, operatívne spojenú s DNA kódujúcou signálny peptid OmpA. Vynález sa ďalej týka špecifických K2S derivátov získateľných uvedeným spôsobom. Vynález sa ďalej týka DNA molekúl a použitia týchto DNA molekúl v uvedených spôsoboch.

Doterajší stav techniky

Tkanivový plazminogénový aktivátor (tPA) je polypeptid obsahujúci 527 aminokyselinových zvyškov (27) s molekulovou hmotnosťou 72 kDa. Molekula je rozdelená na päť štrukturálnych domén. V blízkosti N-koncovej oblasti sa nachádza slučková finger doména, za ktorou nasleduje doména rastového faktora. Nasledujú dve podobné domény, kringle 1 a kringle 2. Tak finger, ako aj kringle 2 doména, sa špecificky viažu na fibrínové zrazeniny, a tým urýchľujú tPA proteínovú aktiváciu naviazaného plazminogénu. Po prúde, za kringle 2 sa nachádza serínová proteáza s katalytickým miestom lokalizovaným na C-konci. Serínová proteáza je zodpovedná za konvertovanie plazminogénu na plazmín, čo je reakcia dôležitá pre homeostázu vytvárania fibrínu rozpúšťania zrazenín. Správne poskladanie tPA vyžaduje správne spárovanie 17 disulfidových mostíkov v molekule (1).

Klinicky je tPA trombolytické činidlo zvolené na liečenie akútneho infarktu myokardu, pľúcnej embólie, mŕtvice, periférnej arteriálnej oklúzie a iných trombo-

embolických ochorení. Výhodou je, že nespôsobuje žiadne vedľajšie účinky na systémové krvácanie a vyčerpanie fibrinogénu (7). Ako zdroj na tPA produkciu na terapeutické účely sa najprv používali bowes melanómové bunky (12). Keďže na klinické použitie je potrebný konzistentný proces s účinnou produkciou vysoko purifikovaného proteínu s dobrým výťažkom, konštrukcia úplného rekombinantného tPA (r-tPA) smerovala k cicavčím bunkám. Vaječníkové bunky čínskeho škrečka sa transfekovali s tPA génom na syntetizovanie r-tPA (8, 22). Produkt, odvodený z rekombinantnej DNA, produkovaný cicavčím bunkovým kultivačným fermentačným systémom, sa izoloval a purifikoval z kultivačného média. Kvôli jednoduchosti a ekonomickosti produkcie, sa urobilo množstvo pokusov produkovať r-tPA z mikroorganizmov, najmä z baktérií, a konkrétnejšie z *Escherichia coli* (10, 13, 30). Vzhľadom na nízky výťažok a na vytváranie inklúzných teliesok, ktoré viedli k nesprávnemu skladaniu a k inaktívnemu enzýmu, navrhlo sa množstvo stratégií na prekonanie týchto problémov.

Zvažovalo sa niekoľko delečných mutantných variatov vrátane kringle 2 plus serínovej proteázy (K2S). Avšak enzymatická aktivita rekombinantného K2S (r-K2S) sa získala len vtedy, keď sa dosiahli preskladávacie procesy purifikovaných inklúzných teliesok z cytoplazmatického kompartmentu (16,29). Aby sa zabránilo ťažkopádny procesom opätovného skladania, nečistotám z nesprávne poskladaných proteínov a dodávaniu proteínov do periplazmy, využívali sa špeciálne bakteriálne expresné systémy (6, 31). Napriek periplazmatickej expresii tPA, nadexpresia viedla k inaktívnym agregátom, aj v relatívne vysoko oxidačným podmienkam v periplazme.

V predchádzajúcom stave techniky sa nachádza niekoľko opisov spôsobov na prípravu rekombinantného K2S v *E. coli*. Avšak nenachádza sa tam žiadny opis spôsobu vedúceho k nenákladnému spôsobu produkcie biologicky aktívneho K2S vo veľkom meradle.

Saito a ďalší (29) opisujú cytoplazmatickú expresiu r-K2S. Autori používajú *in vivo* renaturačné procesy pre exprimovaný r-K2S, ktorý sa purifikuje z cytoplazmatického priestoru *E. coli* vo forme inklúzných teliesok. Boehringer Mannheim používa podobný ťažkopádny denaturačný/preskladávací proces zahŕňajúci kroky bunkového štiepenia, solubilizácie v denaturačných a redukčných

podmienkach a reaktivácie v oxidačných podmienkach v prítomnosti GSH/GSSG, ktorý nie je ekonomicky efektívny (24) a vyžaduje mutáciu aminokyselinovej sekvencie s možným antigénnym potenciálom.

V roku 1991 Waldenström a ďalší (34) skonštruovali vektor (pEZZK2P) na sekréciu kringle 2 plus serínovej proteázovej domény do *E. coli* kultivačného supernatantu. Na odstránenie ZZ fúzovaného peptidu z IgG-Sepharose purifikovanej frakcie sa použil hydroxylamín. Použitie štiepiaceho činidla hydroxylamínu vyžadovalo modifikáciu štiepných miest kringle 2 plus serínovej proteázy (Asn¹⁷⁷ Ser a Asn¹⁸⁴ → Gln), čím sa zabráňovalo štiepeniu hydroxylamínu. Avšak výsledná nenatívna, nesprávne poskladaná K2S molekula nie je vhodná na terapeutické účely. Nebola opísaná žiadna enzymatická aktivita týkajúca sa fibrín viažucej/proteázovej aktivity. Nezvyčajná sekvencia môže aj aktivovať ľudský imunitný systém.

Takže problémom, ktorý rieši predložený vynález, bolo poskytnutie komerčne aplikovateľného spôsobu na produkciu tPA molekúl a ich derivátov, napr. K2S, kde K2S je molekula vylučovaná vo svojej biologicky aktívnej forme do kultivačného supernatantu, vo veľkom meradle.

Podstata vynálezu

Problém bol vyriešený v rozsahu nárokov a opisu predloženého vynálezu.

Použitie jednotného alebo množného čísla v nárokoch alebo v opise žiadnym spôsobom nie je mienené ako obmedzujúce a zahŕňa aj druhú z foriem.

Podstatou vynálezu je spôsob produkcie tkanivového plazminogénového aktivátora (tPA) odvodeného z rekombinantnej DNA, tPA variantu, Kringle 2 serínovej proteázovej molekuly (K2S) alebo K2S variantu v prokaryotických bunkách, kde uvedený tPA, tPA variant, K2S molekula alebo K2S variant sa vylučujú extracelulárne ako aktívny a správne poskladaný proteín, pričom tento spôsob spočíva v tom, že prokaryotická bunka obsahuje a exprimuje vektor obsahujúci DNA kódujúcu uvedený tPA, tPA variant, K2S molekulu alebo K2S variant, operatívne spojenú s DNA kódujúcou signálny peptid OmpA alebo jeho funkčný derivát.

Je prekvapujúce, že použitie signálneho peptidu OmpA, samotného a/alebo v kombinácii s N-koncovými aminokyselinami SEGN (sekv. č. 9)/SEGNSD (sekv. č. 10), translokuje tPA odvodený z rekombinantnej DNA, tPA variant, K2S molekulu alebo K2S variant do vonkajšieho priestoru a uľahčuje vylučovanie funkčnej a aktívnej molekuly do kultivačného média vo väčšom rozsahu ako akákoľvek iná metóda z predchádzajúceho stavu techniky. V súlade so spôsobom podľa predloženého vynálezu sa rekombinantný DNA proteín, pred tým, ako prejde cez vonkajšiu membránu, správne poskladá. Signálny peptid sa odštiepi, aby sa vyprodukovala zrelá molekula. Je zaujímavé, že účinnosť odstránenia signálneho peptidu je veľmi vysoká a vedie k správne poskladaniu proteínu odvodeného z rekombinantnej DNA.

Uvedený signálny peptid OmpA interaguje so SecE a je dodávaný cez vnútornú membránu prostredníctvom energie generovanej prostredníctvom SecA, ktorý sa viaže na Sec komponenty (SecE-SecY). SecY vytvára sekrečný pór na odoslanie proteínu odvodeného z rekombinantnej DNA podľa vynálezu. V priestore v Gram-negatívnych baktériách medzi vonkajšou a vnútornou membránou, v periplazme, sú vysoko oxidatívne podmienky v porovnaní s cytoplazmatickým priestorom. Toto podporuje formovanie disulfidových väzieb a správne skladanie proteínu odvodeného z rekombinantnej DNA (napr. K2S) v periplazme, čím sa získa aktívna molekula. Podľa predloženého vynálezu sa signálny peptid odštiepi, aby sa vytvorila zrelá molekula. Komplex GspD sekretínu a GspS lipoproteínu na vonkajšej membráne slúži ako prepúšťací kanál na vylučovanie proteínu odvodeného z rekombinantnej DNA podľa vynálezu do extracelulárneho média. Tento sekrečný proces vyžaduje energiu, ktorá je generovaná v cytoplazme prostredníctvom GspE nukleotid viažuceho proteínu, potom transformovaná na vnútorný membránový proteín (Gsp G-J, F a K-N). GspC prenáša energiu na GspD vytváraním krížového spojenia medzi sadou vnútorných membránových proteínov (Gsp G-J, F a K-N) a GspD. Pred úspešným prekročením membrány sa proteín odvodený z rekombinantnej DNA správne poskladá.

V súlade s vynálezom znamená výraz operatívne spojený to, že DNA kódujúca tPA, tPA variant, K2S molekulu alebo K2S variant (výhodne obsahujúci nukleovú kyselinu kódujúcu SEGN alebo SEGNSD vo svojej N-koncovej časti) je

klonovaná do tesnej blízkosti OmpA DNA do vektora, aby sa dosiahla expresia OmpA-tPA, -tPA variant, -K2S molekula alebo -K2S variant fúzovaného proteínu a priama sekrécia mimo prokaryotickú hostiteľskú bunku. Typicky, sa vylučuje väčšina tPA, tPA variantu, K2S molekuly alebo K2S variantu a môže sa potom purifikovať vhodnými metódami, ako napríklad precipitáciou so síranom amónnym a/alebo afinitnou chromatografiou a ďalšími purifikačnými krokmi. Vynález zahŕňa aj použitie induktorov, ako napríklad IPTG alebo IPTG v kombinácii s glycerolom, zlepšenie inkubačných podmienok a izolačnej periódy, aby sa maximalizovalo množstvo aktívneho proteínu.

Vo výhodnom uskutočnení môže byť uvedená DNA kódujúca OmpA signálny peptid fúzovaná s krátkym peptidom charakterizovaným aminokyselinovou sekvenciou SEGN alebo SEGNSD alebo kódujúcou nukleokyselinovou sekvenciou TCTGAGGGGAAAC (sekv. č. 20) alebo sekvenciou TCTGAGGGGAAACAGTGAC (sekv. č. 1), ktorý môže byť lokalizovaná na N-koncovej časti alebo na N-koncovej časti tPA, tPA variantu, K2S molekuly alebo K2S variantu. Takže výhodne, uvedený fúzovaný proteín obsahuje OmpA-SEGNSD-tPA, -tPA-variant, -K2S-molekula alebo -K2S-variant. Ešte výhodnejšie môžu uvedené aminokyseliny, charakterizované sekvenciou SEGN alebo SEGNSD, nieť bodovú mutáciu alebo môžu byť substituované inou ako prirodzenou aminokyselinou. Ešte výhodnejšie sa môže medzi OmpA a SEGN alebo SEGNSD a tPA, tPA variantom, K2S molekulou alebo K2S variantom nachádzať aminokyselinový alebo iný ako aminokyselinový oddeľovač.

Takže vo výhodnom spôsobe podľa vynálezu uvedená prokaryotická bunka obsahuje a exprimuje vektor obsahujúci DNA kódujúcu uvedený tPA, tPA variant, K2S molekulu alebo K2S variant operatívne spojený s DNA kódujúcou signálny peptid OmpA, ktorý je operatívne spojený s nukleokyselinovou molekulou definovanou sekvenciou TCTGAGGGGAAACAGTGAC alebo jej funkčným derivátom.

Spôsob podľa vynálezu zahŕňa prokaryotické hostiteľské bunky, ako napríklad, ale bez obmedzenia na *Escherichia coli* (*E. coli*), *Bacillus subtilis*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, napr. *Pseudomonas putida*, *Proteus mirabilis*, *Saccharomyces*, *Pichia* alebo *Staphylococcus*, napr. *Staphylococcus carnosus*. Výhodne sú hostiteľskými bunkami podľa vynálezu Gram-negatívne baktérie.

Výhodne je spôsob podľa vynálezu charakteristický tým, že prokaryotickou bunkou je *E. coli*, Vhodné kmene zahŕňajú, ale nie sú obmedzené na *E. coli* XL-1 blue, BL21(DE3), JM109, DH série, TOP10 a HB101.

Výhodne je spôsob podľa vynálezu charakteristický aj uskutočňovaním nasledujúcich krokov:

- a) DNA kódujúca tPA, tPA variant, K2S molekulu alebo K2S variant sa amplifikuje prostredníctvom PCR;
- b) PCR produkt sa purifikuje;
- c) PCR produkt sa začlení do vektora obsahujúceho DNA kódujúcu OmpA signálny peptid a DNA kódujúcu gpIII, takým spôsobom, že PCR produkt je operatívne pripojený pred DNA kódujúcu OmpA signálnu sekvenciu a za DNA kódujúcu gpIII, v uvedenom vektore;
- d) stop kodón je začlenený medzi tPA, tPA variant, K2S molekulu alebo K2S variant a gpIII;
- e) uvedený vektor sa exprimuje prokaryotickou bunkou;
- f) tPA, tPA variant, K2S molekula alebo K2S variant sa purifikujú.

V kroku a) podľa vynálezu je dôležitá voľba/návrh primerov na to, aby sa klonovala DNA v správnej polohe a správnom smere expresného vektora (pozri príklad 1). Takže primery, ktorých príklady sú uvedené v príklade 1 a na obrázku 4, predstavujú dôležitý predmet predloženého vynálezu. Skratkou gpII v kroku c) je označovaný proteín génu II, ktorý sa nachádza najmä vo fagemidových vektoroch. Stop kodón sa začleňuje na to, aby sa zabránilo transkripcii gpIII, čo eventuálne vedie k vylučovaniu daného tPA, tPA variantu, K2S molekuly alebo K2S variantu. Využiť sa môže akýkoľvek vhodný spôsob na inzerciu stop kodónu, ako napríklad miestne špecifická mutagenéza (napr. Weiner MP, Costa GL (1994) PCR Methods Appl 4(3): S131-136; Weiner MP, Costa GL, Schoettlin W, Cline J, Mathur E, Bauer JC (1994) Gene 151(1-2): 119-123, pozri aj príklad 1).

V spôsobe podľa vynálezu môže byť použitý akýkoľvek vhodný vektor, výhodne je uvedeným vektorom fagemidový vektor (pozri nižšie).

Výhodne je spôsob podľa vynálezu charakteristický aj tým, že tPA, tPA variant, K2S molekula alebo K2S variant sú vybrané zo skupiny, ktorá obsahuje humánnu tkanivový plazminogénový aktivátor (tPA, obrázok 16) alebo fragment,

funkčný variant, alelický variant, podjednotku, chemický derivát, fúzovaný proteín alebo jeho glykozylovaný variant. Takéto fragmenty, alelické varianty, funkčné varianty, varianty založené na degenerovanosti nukleokyselinového kódu, fúzované proteíny s tPA proteínom podľa vynálezu, chemické deriváty alebo glykozylované varianty tPA proteínov podľa vynálezu môžu zahŕňať jednu alebo niekoľko z nasledujúcich domén alebo ich podjednotiek alebo variantov:

1. Finger doména (4-50)
2. Doména rastového faktora (50-87)
3. Kringle 1 doména (87-176)
4. Kringle 2 doména (176-262)
5. Proteázová doména (276-527)

Číslovanie/označovanie domén je robené v súlade s Genbank prístupovým číslom GI 137119 alebo v súlade s publikáciou Nature 301 (5897), 214-221 (1983).

Výhodnejšie je spôsob podľa vynálezu charakteristický aj tým, že tPA, tPA variant, K2S molekula alebo K2S variant sú vybrané zo skupiny, ktorá zahŕňa Kringle 2 (4.) plus serínová proteáza (5.) K2S variant ľudského tkanivového plazminogénového aktivátora alebo jeho fragment, funkčný variant, alelický variant, podjednotku, chemický derivát, fúzovaný proteín alebo glykozylovaný variant.

Výhodnejšie je spôsob podľa vynálezu charakteristický aj tým, že vektorom je fagemidový vektor obsahujúci DNA kódujúcu OmpA signálny peptid a DNA kódujúcu gpIII.

Výhodnejšie je spôsob podľa vynálezu charakteristický aj tým, že vektorom je pComb3HSS fagemid (pozri aj príklad 1).

Výhodnejšie je spôsob podľa vynálezu charakteristický aj tým, že DNA sekvencia obsahuje alebo pozostáva z nasledujúcej DNA sekvencie kódujúcej OmpA a K2S alebo jej funkčný derivát alebo variant súvisiaci s degenerovaním nukleotidového kódu:

```
ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTGGCCCAGGC
GGCCTCTGAGGGAAACAGTGACTGCTACTTTGGGAATGGGTCAGCCTACCGTGGCACGCACA
GCCTCACCGAGTCGGGTGCCTCCTGCCTCCCGTGGAATTCCATGATCCTGATAGGCAAGGTT
TACACAGCACAGAACCCAGTGCCCAGGCACTGGGCCTGGGCAAACATAATTACTGCCGGAA
TCCTGATGGGGATGCCAAGCCCTGGTGCCACGTGCTGAAGAACCGCAGGCTGACGTGGGAGT
```

ACTGTGATGTGCCCTCCTGCTCCACCTGCGGCCTGAGACAGTACAGCCAGCCTCAGTTTCGC
ATCAAAGGAGGGCTCTTCGCCGACATCGCCTCCCACCCCTGGCAGGCTGCCATCTTTGCCAA
GCACAGGAGGTGCCCCGAGAGCGGTTCTGTGCGGGGGCATACTCATCAGCTCCTGCTGGA
TTCTCTCTGCCGCCCACTGCTTCCAGGAGAGGTTTCCGCCCCACCACCTGACGGTGATCTTG
GGCAGAACATACCGGGTGGTCCCTGGCGAGGAGGAGCAGAAATTGAAGTCGAAAAATACAT
TGTCCATAAGGAATTCGATGATGACACTTACGACAATGACATTGCGCTGCTGCAGCTGAAAT
CGGATTCGTCCCGCTGTGCCCAGGAGAGCAGCGTGGTCCGCACTGTGTGCCTTCCCCCGGCG
GACCTGCAGCTGCCGGACTGGACGGAGTGTGAGCTCTCCGGCTACGGCAAGCATGAGGCCTT
GTCTCCTTTCTATTCCGAGCGGCTGAAGGAGGCTCATGTGAGACTGTACCCATCCAGCCGCT
GCACATCACAACATTTACTTAAACAGAACAGTCACCGACAACATGCTGTGTGCTGGAGACACT
CGGAGCGGCGGGCCCCAGGCAAACTTGCACGACGCCTGCCAGGGCGATTCTGGGAGGCCCCCT
GGTGTGTCTGAACGATGGCCGCATGACTTTGGTGGGCATCATCAGCTGGGGCCTGGGCTGTG
GACAGAAGGATGTCCCGGGTGTGTACACAAAGGTTACCAACTACCTAGACTGGATTCTGTGAC
AACATGCGACCG (sekv. č. 2)

Výhodnejšie je spôsob podľa vynálezu charakteristický aj tým, že DNA sekvencia OmpA obsahuje alebo pozostáva z nasledujúcej sekvencie alebo jej funkčného variantu alebo variantu súvisiaceho s degenerovaním nukleotidového kódu:

ATGAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTGGCCCAGGC
GGCC (sekv. č. 3)

Uvedená DNA kóduje nasledujúcu OmpA aminokyselinovú sekvenciu. OmpA tak zahŕňa alebo pozostáva z proteínu, ktorý sa vyznačuje nasledujúcou aminokyselinovou sekvenciou alebo jej fragmentom, funkčným variantom, alelickým variantom, podjednotkou, chemických derivátom alebo glykozylačným variantom, ako súčasť vynálezu:

MKKTAIAIAVALAGFATVAQAA (sekv. č. 21)

Netranslatovaná oblasť môže obsahovať regulačný element, ako napr. transkripčnú iniciačnú jednotku (promótor) alebo zosilňovač. Uvedeným promótorom môže byť napríklad konštitutívny, inducibilný alebo vývojovo kontrolovaný promótor. Výhodne, bez vylúčenia iných známych promótorov, konštitutívny promótor ľudského cytomegalovírusu (CMV) a Rous sarkóma vírusu (ESV) ako aj Simian vírusu 40 (SV40) a Herpes simplex promótor. Inducibilné promótory podľa vynálezu

zahŕňajú antibiotikové rezistenčné promótoŕy, promótoŕy tepelného šoku, hormonálne inducibilný promótoŕ „vírusu nádoru prsníka“ a metalotioneínový promótoŕ. Výhodné promótoŕy zahŕňajú T3 promótoŕ, T7 promótoŕ, Lac/ara1 a Ltet0-1.

Výhodnejšie je spôsob podľa vynálezu charakteristický aj tým, že pred tPA, tPA variantovou, K2S molekulovou alebo K2S variantovou DNA sa nachádza lac promótoŕ a/alebo ribozóm viažuce miesto, ako napríklad Shine-Dalgarnová sekvencia (pozri aj príklad).

Výhodnejšie je spôsob podľa vynálezu charakteristický aj tým, že DNA kódujúca tPA, tPA variant, K2S molekulu alebo K2S variant je vybraná zo skupiny DNA molekúl kódujúcich aspoň 90% aminokyselín 87-527, 174-527, 180-527 alebo 220-527 ľudského tkanivového plazminogénového aktivátorového proteínu.

Výhodnejšie je spôsob podľa vynálezu charakteristický aj tým, že DNA sekvencia K2S zahŕňa alebo pozostáva z nasledujúcej sekvencie:

TCTGAGGGAAACAGTGACTGCTACTTTGGGAATGGGTCAGCCTACCGTGGCACGCACAGCCT
CACCGAGTCGGGTGCCTCCTGCCTCCCGTGGAATTCCATGATCCTGATAGGCAAGGTTTACA
CAGCACAGAACCCAGTGCCAGGCACTGGGCCTGGGCAAACATAATTACTGCCGGAATCCT
GATGGGGATGCCAAGCCCTGGTGCCACGTGCTGAAGAACCGCAGGCTGACGTGGGAGTACTG
TGATGTGCCCTCCTGCTCCACCTGCGGCCTGAGACAGTACAGCCAGCCTCAGTTTCGCATCA
AAGGAGGGCTCTTCGCCGACATCGCCTCCACCCCCTGGCAGGCTGCCATCTTTGCCAAGCAC
AGGAGGTGCCCCGAGAGCGGTTCTGTGCGGGGGCATACTCATCAGCTCCTGCTGGATTCT
CTCTGCCGCCCACTGCTTCCAGGAGAGGTTTCCGCCCCACCACCTGACGGTGATCTTGGGCA
GAACATAACGGGTGGTCCCTGGCGAGGAGGAGCAGAAATTTGAAGTCGAAAAATACATTGTC
CATAAGGAATTCGATGATGACACTTACGACAATGACATTGCGCTGCTGCAGCTGAAATCGGA
TTCGTCCCGCTGTGCCAGGAGAGCAGCGTGGTCCGCACTGTGTGCCTTCCCCCGGCGGACC
TGCAGCTGCCGGA CTGGACGGAGTGTGAGCTCTCCGGCTACGGCAAGCATGAGGCCTTGTCT
CCTTTCTATTCCGAGCGGCTGAAGGAGGCTCATGTCAGACTGTACCCATCCAGCCGCTGCAC
ATCACAACATTTACTTAACAGAACAGTCACCGACAACATGCTGTGTGCTGGAGACACTCGGA
GCGGCGGGCCCCAGGCAAACCTTGACAGACGCCTGCCAGGGCGATTCCGGGAGGCCCCCTGGTG
TGTCTGAACGATGGCCGCATGACTTTGGTGGGCATCATCAGCTGGGGCCTGGGCTGTGGACA
GAAGGATGTCCCGGGTGTGTACACAAAGGTTACCAACTACCTAGACTGGATTCTGTGACAACA
TGCGACCGTGA (sekv. č. 4)

Predložený vynález sa týka aj variantov vyššie uvedených nukleokyselinových molekúl súvisiacich s degeneráciou kódu alebo ich fragmentov, nukleových kyselín, ktoré hybridizujú s uvedenými nukleovými kyselinami v prísnych podmienkach, alelických alebo funkčných variantov. Vynález sa týka aj nukleových kyselín obsahujúcich uvedenú K2S nukleovú kyselinu fúzovanú s nukleovou kyselinou kódujúcou inú proteínovú molekulu.

Pod prísnymi podmienkami priemerný odborník v oblasti rozumie, že sú zvolené tak, aby zabezpečili viac ako 85%, výhodne viac ako 90% homológiu (Sambrook a ďalší, 1989; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. vyd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York). Hybridizácia sa bude uskutočňovať napríklad v 6x SSC/ 5x Denhardtov roztok/ 0,1% SDS (SDS: dodecylsulfát sodný) pri 65 °C. Stupeň prísnosti je určený premývacím krokom. Takže napríklad na selekciu DNA sekvencií s približne 85% alebo vyššou homológiou sú vhodné podmienky 0,2 x SSC/ 0,01% SDS/ 65 °C a na selekciu DNA sekvencií s približne 90% alebo vyššou homológiou sú vhodné podmienky 0,1x SSC/ 0,01% SDS/ 65 °C. Zloženie uvedených reakčných činidiel je opísané v Sambrook a ďalší (1989, *supra*).

Inou dôležitou súčasťou predloženého vynálezu je variant ľudského tkanivového plazminogénového aktivátora obsahujúci alebo pozostávajúci z Kringle 2 (4.) plus serínového proteázového (5.) (skratka K2S) proteínu alebo jeho variantu alebo fragmentu, funkčného variantu, alelického variantu, podjednotky, chemického derivátu, fúzaného proteínu alebo glykozylovaného variantu. Domény sa číslujú/označujú v súlade s Genbank prístupovým číslom GI137119 alebo s publikáciou Nature 301 (5897), 214-221 (1983), kde Kringle 2 doména zahŕňa aminokyseliny 176-262 a proteázová doména aminokyseliny 276-527. Takže podľa vynálezu môže výhodne K2S molekula zahŕňať aminokyseliny 176-527 vrátane aminokyselín medzi Kringle 2 a proteázou (aminokyseliny 263 až 275; ilustrované na obrázku ? (štruktúra A)). K2S molekula podľa vynálezu obsahuje minimálnu časť Kringle 2 domény a proteázovej domény, ktorá si ešte zachováva proteázovú aktivitu a fibrín viažucu aktivitu (príklad merania je uvedený v opise/príklade). K2S molekula podľa vynálezu obsahuje aminokyseliny SEGN alebo SEGNSD na svojom N-konci (pozri nižšie). Výhodná K2S molekula neobsahuje aminokyseliny 1 až 3

alebo 1 až 5 tPA molekuly. Výhodne, K2S molekula podľa vynálezu má aminokyselinu Asn v polohách 177 a 184, tzn. nevyžaduje modifikácie opísané Waldenströmom na zlepšenie produkovateľnosti spôsobom podľa vynálezu. Takže výhodná K2S molekula podľa vynálezu má natívnu aminokyselinovú sekvenciu (bez mutácie) na rozdiel od molekúl známych z doterajšieho stavu techniky. Najvýhodnejšie, K2S molekula podľa vynálezu je molekula, ktorá je charakteristická prirodzenou aminokyselinovou sekvenciou alebo jej časťou, pričom neobsahuje ani aminokyseliny 1 až 3, ani 1 až 5 z tPA a obsahuje na N-konci aminokyseliny SEGN alebo SEGNSD na zlepšenie produkovateľnosti a/alebo správneho skladania molekuly.

Nevyhnutné je, aby K2S proteín podľa vynálezu obsahoval vo svojej N-koncovej časti peptid, vyznačujúci sa aminokyselinovou sekvenciou SEGN, ktorá výhodne umožňuje komerčnú produkciu so spôsobom opísaným vyššie, vedúcim k správne poskladanému vylučovanému K2S proteínu. Uvedené 4 aminokyseliny charakteristické s SEGN môžu mať o jednu alebo niekoľko aminokyselín viac na N-konci, avšak aminokyseliny musia byť umiestnené v N-koncovej časti oproti C-koncovej časti. Najvýhodnejšie sú aminokyseliny umiestnené v N-koncovej časti. Výhodne, aminokyseliny charakteristické s SEGN môžu nieť miestnu mutáciu alebo môžu byť substituované inou ako prirodzenou aminokyselinou.

Takže v inom dôležitom uskutočnení sa vynález týka K2S proteínu vyznačujúceho sa tým, že obsahuje aminokyseliny definované sekvenciou SEGN, alebo jeho variantu alebo fragmentu, funkčného variantu, alelického variantu, podjednotky, chemického derivátu, fúzovaného proteínu alebo glykozylovaného variantu.

Príklady takýchto fragmentov sú uvedené na obrázku 10 (štruktúra B-1) a obrázku 11 (štruktúra B-2) zahŕňajúc aminokyseliny 193-527. Štruktúra B-1 má prirodzenú aminokyselinu Cys v polohe 261, zatiaľ čo v štruktúre B-2 je táto aminokyselina substituovaná so Ser. Ďalšie fragmenty podľa vynálezu obsahujúce aminokyseliny 220-527 (obrázok 14, štruktúra C) alebo obsahujúce aminokyseliny 260-527 (obrázok 15, štruktúra D) môžu byť modifikované v súlade s vynálezom prostredníctvom pridania aminokyselín SEGN a/alebo substitúciou Cys-262 so Ser. Priemerný odborník v oblasti môže určiť minimálnu dĺžku K2S molekuly podľa

vynálezu, aby si zachovala biologickú funkciu, a môže generovať K2S molekulu so zlepšenou produktovateľnosťou a/alebo zlepšeným správnym skladaním prostredníctvom pridania aminokyselín SEGN do N-koncovej časti. Takže iným výhodným uskutočnením je uvedená minimálna K2S molekula so SEGN vo svojej N-koncovej časti.

V inom dôležitom uskutočnení sa vynález týka K2S proteínu vyznačujúceho sa tým, že obsahuje aminokyseliny definované sekvenciou SEGNSD, alebo jeho variantu alebo fragmentu, funkčného variantu, alelického variantu, podjednotky, chemického derivátu, fúzaného proteínu alebo glykozylovaného variantu. Príklady takýchto fragmentov sú uvedené na obrázku 12 (štruktúra B-3) a obrázku 13 (štruktúra B-4) zahŕňajúc aminokyseliny 191-527. Štruktúra B-3 má prirodzenú aminokyselinu Cys v polohe 261, zatiaľ čo v štruktúre B-4 je táto aminokyselina substituovaná so Ser. Ďalšie fragmenty podľa vynálezu obsahujúce aminokyseliny 220-527 (obrázok 14, štruktúra C) alebo obsahujúce aminokyseliny 260-527 (obrázok 15, štruktúra D) môžu byť modifikované v súlade s vynálezom prostredníctvom pridania aminokyselín SEGNSD a/alebo substitúciou Cys-262 so Ser. Priemerný odborník v oblasti môže určiť minimálnu dĺžku K2S molekuly podľa vynálezu, aby si zachovala biologickú funkciu, a môže generovať K2S molekulu so zlepšenou produktovateľnosťou a/alebo zlepšeným správnym skladaním prostredníctvom pridania aminokyselín SEGNSD do N-koncovej časti. Takže iným výhodným uskutočnením je uvedená minimálna K2S molekula so SEGNSD vo svojej N-koncovej časti.

Iné výhodnejšie uskutočnenie predloženého vynálezu sa týka K2S proteínu obsahujúceho proteín, vyznačujúci sa nasledujúcou aminokyselinovou sekvenciou, alebo jeho variant alebo fragment, funkčný variant, alelický variant, podjednotku, chemický derivát alebo glykozylačný variant:

**SEGNSDCYFGNGSAYRGTHSLTESGASCLPWNSMILIGKVYTAQNPSAQUALGLGKHNYCRNP
DGDAPWCHVLKNRRLTWEYCDVPSCSTCGLRQYSQPQFRIKGGLFADIASHPWQAAIFAKH
RRSPGERFLCGGILISSCWILSAAHCFQERFPPHHLTVILGRTYRVVPGEEEEQKFEVEKYIV
HKEFDDDTYDNDIALQLKSDSSRCAQESSVVRTVCLPPADLQLPDWTECELSGYGKHEALS
PFYSERLKEAHVRLYPSSRCTSQHLLNRTVTDNMLCAGDTRSGGPQANLHDACQGDSSGGPLV
CLNDGRMTLVGIIISWGLGCGQKDVPGVYTKVTNYLDWIRDNMRP* (sekv. č. 11)**

V súlade s vynálezom * znamená STOP (tzn. je kódovaná stop kodónom).
Príklad tejto K2S molekuly je znázornený na obrázku 8.

Jeden variant K2S molekuly podľa vynálezu sa týka fúzovaného proteínu, ktorý pozostáva z K2S fúzovanej s inou proteínovou molekulou.

Iné výhodnejšie uskutočnenie predloženého vynálezu sa týka K2S proteínu pozostávajúceho z proteínu, vyznačujúceho sa nasledujúcou aminokyselinovou sekvenciou:

SEGNSDCYFGNGSAYRGTHSLTESGASCLPWNSMILIGKVYTAQNPSAQALGLGKHNYCRNP
DGDAKPWCHVLKNRRLTWEYCDVPSCSTCGLRQYSQPQFRIKGGLFADIASHPWQAAIFAKH
RRSPGERFLCGGILISSCWILSAAHCFQERFPPHHLTVILGRTYRVVPGEEEQKFEVEKYIV
HKEFDDDTYDNDIALQLKSDSSRCAQESSVVRTVCLPPADLQLPDWTECELSGYGKHEALS
PFYSERLKEAHVRLYPSSRCTSQHLLNRTVTDNMLCAGDTRSGGPQANLHDACQGDSSGGPLV
CLNDGRMTLVGIIISWGLGCGQKDVPGVYTKVTNYLDWIRDNMRP* (sekv. č. 11)

Uvedené K2S molekuly môžu byť kódované vyššie opísanou DNA molekulou.

Iné dôležité uskutočnenie vynálezu sa týka DNA molekuly, ktorá je charakteristická tým, že kóduje:

- a. OmpA proteín alebo jeho funkčný derivát operatívne spojený s
- b) DNA molekulou kódujúcou polypeptid obsahujúci kringle 2 domény a serínovú proteázovú doménu tkanivového plazminogénového aktivátorového proteínu.

Výhodnejšie je DNA molekula podľa vynálezu charakteristická aj tým, že DNA sekvencia zahŕňa alebo pozostáva z nasledujúcej DNA sekvencie kódujúcej OmpA a K2S alebo jej funkčného variantu alebo variantu súvisiaceho s degenerovanosťou nukleotidového kódu:

ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTGGCCCAGGC
GGCCTCTGAGGGAAACAGTGACTGCTACTTTGGGAATGGGTGAGCCTACCGTGGCACGCACA
GCCTCACCGAGTCGGGTGCCTCCTGCCTCCCGTGGAATTCATGATCCTGATAGGCAAGGTT
TACACAGCACAGAACCCAGTGCCCAGGCACTGGGCCTGGGCAAACATAATTACTGCCGGAA
TCCTGATGGGGATGCCAAGCCCTGGTGCCACGTGCTGAAGAACCGCAGGCTGACGTGGGAGT
ACTGTGATGTGCCCTCCTGCTCCACCTGCGGCCTGAGACAGTACAGCCAGCCTCAGTTTCGC
ATCAAAGGAGGGCTCTTCGCCGACATCGCCTCCCACCCCTGGCAGGCTGCCATCTTTGCCAA
GCACAGGAGGTGCCCCGAGAGCGGTTCTGTGCGGGGGCATACTCATCAGCTCCTGCTGGA

TTCTCTCTGCCGCCCCTGCTTCCAGGAGAGGTTTCCGCCCCACCACCTGACGGTGATCTTG
GGCAGAACATACCGGGTGGTCCCTGGCGAGGAGGAGCAGAAATTTGAAGTCGAAAAATACAT
TGTCCATAAGGAATTTCGATGATGACACTTACGACAATGACATTGCGCTGCTGCAGCTGAAAT
CGGATTTCGTCCCGCTGTGCCCAGGAGAGCAGCGTGGTCCGCACTGTGTGCCTTCCCCCGGCG
GACCTGCAGCTGCCGGACTGGACGGAGTGTGAGCTCTCCGGCTACGGCAAGCATGAGGCCTT
GTCTCCTTTCTATTTCGGAGCGGCTGAAGGAGGCTCATGTGAGACTGTACCCATCCAGCCGCT
GCACATCACAACATTTACTTAACAGAACAGTCACCGACAACATGCTGTGTGCTGGAGACACT
CGGAGCGGCGGGCCCCAGGCAAACCTTGACGACGCCTGCCAGGGCGATTCTGGGAGGCCCCCT
GGTGTGTCTGAACGATGGCCGCATGACTTTTGGTGGGCATCATCAGCTGGGGCCTGGGCTGTG
GACAGAAGGATGTCCCGGGTGTGTACACAAAGGTTACCAACTACCTAGACTGGATTCTGTGAC
AACATGCGACCG (sekv. č. 2)

Uvedená DNA molekula kóduje nasledujúci fúzovaný proteín pozostávajúci z OmpA a K2S. Uvedený fúzovaný proteín z OmpA a K2S sa vyznačuje tým, že zahŕňa alebo pozostáva z proteínu charakteristického nasledujúcou aminokyselinovou sekvenciou, alebo jeho fragmentu, funkčného variantu, alelického variantu, podjednotky, chemického derivátu alebo glykozylačného variantu, ktorý tvorí dôležitú časť predloženého vynálezu:

MKKTAIAIAVALAGFATVAQAASEGNSDCYFGNGSAYRGTHSLTESGASCLPWNSMILIGKV
YTAQNPSAQALGLGKHNYCRNPDGDAKPWCHVLKNRRLTWEYCDVPSCSTCGLRQYSQPQFR
IKGGLFADIASHPWQAIFAKHRRSPGERFLCGGILISSCWILSAAHCFQERFPPHHLTVIL
GRTYRVVPGEQQKFEVEKYIVHKEFDDDDTYDNDIALQLKSDSSRCAQESSVVRTVCLPPA
DLQLPDWTECELSGYGKHEALSPFYSERLKEAHVRLYPSSRCTSQHLLNRTVTDNMLCAGDT
RSGGPQANLHDACQGDSSGGLVCLNDGRMTLVGII SWGLGCGQKDVPGVYTKVTNYLDWIRD
NMRPG (sekv. č. 8)

Iné výhodné uskutočnenie vynálezu sa týka DNA molekuly podľa vynálezu, ktorá je charakteristická tým, že DNA sekvencia b) kóduje aspoň 90% aminokyselín 87-527 ľudského tkanivového plazminogénového aktivátorového proteínu (tu použité číslovanie zodpovedá GI 137119 alebo Nature 301 (5897) 214-221 (1983).

Iné výhodné uskutočnenie vynálezu sa týka DNA molekuly podľa vynálezu, ktorá je charakteristická tým, že DNA sekvencia b) kóduje aspoň 90% aminokyselín 174-527 ľudského tkanivového plazminogénového aktivátorového proteínu.

Iné výhodné uskutočnenie vynálezu sa týka DNA molekuly podľa vynálezu, ktorá je charakteristická tým, že DNA sekvencia b) kóduje aspoň 90% aminokyselín 180-527 ľudského tkanivového plazminogénového aktivátorového proteínu.

Iné výhodné uskutočnenie vynálezu sa týka DNA molekuly podľa vynálezu, ktorá je charakteristická tým, že DNA sekvencia b) kóduje aspoň 90% aminokyselín 220-527 ľudského tkanivového plazminogénového aktivátorového proteínu.

Iné výhodné uskutočnenie vynálezu sa týka DNA molekuly podľa vynálezu, ktorá je charakteristická tým, že DNA sekvencia a) hybridizuje v prísnych podmienkach s nasledujúcou sekvenciou:

ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTGGCCCAGGC GGCC (sekv. č. 3)

Iné výhodné uskutočnenie vynálezu sa týka DNA molekuly podľa vynálezu, ktorá je charakteristická tým, že DNA sekvencia a) pozostáva z nasledujúcej sekvencie:

ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTGGCCCAGGC GGCC (sekv. č. 3)

Iné výhodné uskutočnenie vynálezu sa týka DNA molekuly podľa vynálezu, ktorá je charakteristická tým, že DNA sekvencia b) hybridizuje v prísnych podmienkach s nasledujúcou sekvenciou:

**TCTGAGGGAAACAGTGACTGCTACTTTGGGAATGGGTGAGCCTACCGTGGCACGCACAGCCT
CACCGAGTCGGGTGCCTCCTGCCTCCCGTGGAATTCCATGATCCTGATAGGCAAGGTTTACA
CAGCACAGAACCCAGTGCCCAGGCACTGGGCCTGGGCAAACATAATTACTGCCGGAATCCT
GATGGGGATGCCAAGCCCTGGTGCCACGTGCTGAAGAACCGCAGGCTGACGTGGGAGTACTG
TGATGTGCCCTCCTGCTCCACCTGCGGCCTGAGACAGTACAGCCAGCCTCAGTTTCGCATCA
AAGGAGGGCTCTTCGCCGACATCGCCTCCCACCCCTGGCAGGCTGCCATCTTTGCCAAGCAC
AGGAGGTGCCCCGGAGAGCGGTTCTGTGCGGGGGCATACTCATCAGCTCCTGCTGGATTCT
CTCTGCCGCCCACTGCTTCCAGGAGAGGTTTCCGCCCCACCACCTGACGGTGATCTTGGGCA
GAACATAACGGGTGGTCCCTGGCGAGGAGGAGCAGAAATTTGAAGTCGAAAAATACATTGTC
CATAAGGAATTCGATGATGACACTTACGACAATGACATTGCGCTGCTGCAGCTGAAATCGGA
TTCGTCCCGCTGTGCCAGGAGAGCAGCGTGGTCCGCACTGTGTGCCTTCCCCGGCGGACC
TGCAGCTGCCGGAAGTGGACGGAGTGTGAGCTCTCCGGCTACGGCAAGCATGAGGCCTTGTCT
CCTTTCTATTTCGGAGCGGCTGAAGGAGGCTCATGTCAGACTGTACCCATCCAGCCGCTGCAC**

ATCACAAACATTTACTTAACAGAACAGTCACCGACAACATGCTGTGTGCTGGAGACACTCGGA
GCGGCGGGCCCCAGGCAAACCTTGACGACGCCTGCCAGGGCGATTTCGGGAGGCCCCCTGGTG
TGTCTGAACGATGGCCGCATGACTTTGGTGGGCATCATCAGCTGGGGCCTGGGCTGTGGACA
GAAGGATGTCCCGGGTGTGTACACAAAGGTTACCAACTACCTAGACTGGATTTCGTGACAACA
TGCGACCGTGA (sekv. č. 4)

Iné výhodné uskutočnenie vynálezu sa týka DNA molekuly podľa vynálezu, ktorá je charakteristická tým, že DNA sekvencia b) pozostáva z nasledujúcej sekvencie:

TCTGAGGGAAACAGTGACTGCTACTTTGGGAATGGGTCAGCCTACCGTGGCACGCACAGCCT
CACCGAGTCGGGTGCCTCCTGCCTCCCGTGGAATTCATGATCCTGATAGGCAAGGTTTACA
CAGCACAGAAACCCAGTGCCAGGCACTGGGCCTGGGCAAACATAATTACTGCCGGAATCCT
GATGGGGATGCCAAGCCCTGGTGCCACGTGCTGAAGAACCGCAGGCTGACGTGGGAGTACTG
TGATGTGCCCTCCTGCTCCACCTGCGGCCTGAGACAGTACAGCCAGCCTCAGTTTCGCATCA
AAGGAGGGCTCTTCGCCGACATCGCCTCCCACCCCTGGCAGGCTGCCATCTTTGCCAAGCAC
AGGAGGTGCCCCGAGAGCGGTTCTGTGCGGGGGCATACTCATCAGCTCCTGCTGGATTCT
CTCTGCCGCCCCTGCTTCCAGGAGAGGTTTCCGCCCCACCACCTGACGGTGATCTTGGGCA
GAACATAACGGGTGGTCCCTGGCGAGGAGGAGCAGAAATTTGAAGTCGAAAAATACATTGTC
CATAAGGAATTCGATGATGACACTTACGACAATGACATTGCGCTGCTGCAGCTGAAATCGGA
TTCGTCCCGCTGTGCCCAGGAGAGCAGCGTGGTCCGCACTGTGTGCCTTCCCCCGGCGGACC
TGCAGCTGCCGGAAGTGGACGGAGTGTGAGCTCTCCGGCTACGGCAAGCATGAGGCCTTGTCT
CCTTTCTATTTCGGAGCGGCTGAAGGAGGCTCATGTGAGACTGTACCCATCCAGCCGCTGCAC
ATCACAAACATTTACTTAACAGAACAGTCACCGACAACATGCTGTGTGCTGGAGACACTCGGA
GCGGCGGGCCCCAGGCAAACCTTGACGACGCCTGCCAGGGCGATTTCGGGAGGCCCCCTGGTG
TGTCTGAACGATGGCCGCATGACTTTGGTGGGCATCATCAGCTGGGGCCTGGGCTGTGGACA
GAAGGATGTCCCGGGTGTGTACACAAAGGTTACCAACTACCTAGACTGGATTTCGTGACAACA
TGCGACCGTGA (sekv. č. 4)

Iné výhodné uskutočnenie vynálezu sa týka vektora obsahujúceho DNA sekvenciu podľa vynálezu.

Iné výhodné uskutočnenie vynálezu sa týka vektora podľa vynálezu, v ktorom sa pred uvedenou DNA sekvenciou nachádza lac promótor a ribozóm viažuce miesto. Vhodné vektory podľa vynálezu zahŕňajú, ale nie sú obmedzené na vírusové vektory, ako napríklad Vaccinia, Semliki-Forest-Vírus a Adenovírus,

fagemidové vektory a podobne. Výhodné sú tie vektory, ktoré je možné výhodne použiť v *E. coli*, ale aj v akomkoľvek inom prokaryotickom hostiteľovi, ako napríklad pPROTet.E, pPROLar.A, členovia pBAD rodiny, pSE rodiny, pQE rodiny a pCAL.

Iné výhodné uskutočnenie vynálezu sa týka vektora pComb3HSS obsahujúceho DNA podľa vynálezu, v ktorom je expresia gpIII proteínu suprimovaná alebo inhibovaná prostredníctvom deletovania DNA molekuly kódujúcej uvedený gpIII proteín alebo prostredníctvom stop kodónu umiestneného medzi gén kódujúci polypeptid obsahujúci krigle 2 doménu a serínovú proteázovú doménu tkanivového plazminogénového aktivátorového proteínu a proteín génu III.

Iný dôležitý predmet predloženého vynálezu sa týka prokaryotickej hostiteľskej bunky obsahujúcej DNA molekulu podľa vynálezu.

Iný dôležitý predmet predloženého vynálezu sa týka prokaryotickej hostiteľskej bunky obsahujúcej vektor podľa vynálezu.

Iný dôležitý predmet predloženého vynálezu sa týka *E. coli* hostiteľskej bunky obsahujúcej DNA molekulu podľa vynálezu.

Iný dôležitý predmet predloženého vynálezu sa týka *E. coli* hostiteľskej bunky obsahujúcej vektor podľa vynálezu.

Ešte iným dôležitým predmetom predloženého vynálezu je použitie DNA molekuly podľa vynálezu alebo vektora podľa vynálezu alebo hostiteľskej bunky podľa vynálezu v spôsobe výroby polypeptidu majúceho aktivitu tkanivového plazminogénového aktivátora.

Ešte iným dôležitým predmetom predloženého vynálezu je použitie podľa vynálezu, ako je opísané vyššie, pričom uvedeným spôsobom je spôsob podľa vynálezu.

Iným veľmi dôležitým predmetom je farmaceutický prostriedok obsahujúci látku, získateľnú spôsobom podľa vynálezu, a farmaceuticky prijateľné excipienty a nosiče. Príkladom uvedenej látky je vyššie opísaná K2S molekula. Výraz „farmaceuticky prijateľný nosič, tak ako sa používa tu, označuje bežné farmaceutické excipienty alebo aditíva používané vo oblasti farmaceutickej výroby. Takéto fyziologicky prijateľné zlúčeniny zahŕňajú napríklad uhľovodíky, ako napríklad glukózu, sacharózu alebo dextrány, antioxidanty, ako napríklad kyselinu askorbovú alebo glutatión, chelatačné činidlá, proteíny s nízkou molekulovou

hmotnosťou alebo iné stabilizátory alebo excipienty (pozri aj napr. Remington's Pharmaceutical Sciences (1990, 18. vyd. Mack Publ., Easton.)). Uvedený farmaceutický prostriedok podľa vynálezu môže byť výhodne podávaný intravenózne ako bolus, napr. ako jediný bolus 5 až 10 sekúnd, intravenózne.

Vynález sa ďalej týka použitia látok získateľných spôsobom podľa vynálezu na výrobu liečiva na liečenie mŕtvice, srdcového infarktu, akútneho infarktu myokardu, pľúcnej embólie, akejkolvek arteriálnej oklúzie, ako napríklad periférne upchatých artérií, hlbokaj žilovej trombózy alebo príbuzných ochorení súvisiacich s nežiadúcim zrážaním krvi.

Nasledujúci príklad je určený na napomáhanie pochopeniu vynálezu a žiadnym spôsobom by nemal byť považovaný z limitujúci rozsah vynálezu.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obrázok 1: Hodnotenie PCR amplifikačného produktu K2S génu z p51-3 vektora použitím SK2/174 a ASSP primerov. Dráha 1 znázorňuje 1kb marker (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). Na dráhu 2 bol nenesený 1 μ l amplifikovaného produktu. Zobrazený je jediný pás s veľkosťou 1110 bp. Elektroforéza sa uskutočňovala v 1% agarózovom géli.

Obrázok 2: Identifikácia začleneného K2S génu na 1110 bp (*) po poštiepení pComb3H-K2S s *Sfi*I sa demonštrovala v dráhe 3. Dráha 1 znázorňuje 1 kb marker. Na dráhu 2 bol nanesený nepoštiepený pComb3H-K2S. Elektroforéza sa uskutočňovala v 1% agarózovom géli.

Obrázok 3: Schéma pComb3H-K2S znázorňujúca dve *Sfi*I klonovacie miesta, do ktorých sa začlenil K2S gén. Znáizornená je aj signálna sekvencia (OmpA), ribozóm viažuce miesto (RIBS), *lac* promótor a gpIII gén.

Obrázok 4: Schematický diagram mutačného miesta v spojení medzi K2S a gpIII génmi na pComb3H-K2S. Na anelačné miesto pComb3H-K2S je naviazaná sada mutačných primerov (MSTPA a MASTPA) obsahujúcich modifikované oligonukleozidy (podčiarknuté). Po uskutočnení cyklickej amplifikácie sa *Sfi*I miesto (hrubo vyznačené) modifikuje a stratí v novo syntetizovanom páse.

Obrázok 5: Charakterizácia novo syntetizovaného MpComb3H-K2S prostredníctvom *SfiI* restriktčného enzýmu. Jediný 4319bp pás, ktorý označuje jediné štiepne miesto MpComb3H-K2S, sa pozoroval na dráhe 3. Nebolo možné vizualizovať žiadny 1110bp K2S pás. Dráha 1 znázorňuje 1kb marker. Na dráhu 2 sa naniesol nepoštepený MpComb3H-K2S. Elektroforéza sa uskutočňovala v 1% agarózovom géli.

Obrázok 6: Identifikácia imunologicky reaktívneho pásu s proteínom odvodeným z rekombinantnej DNA, purifikovaným z XM[K2S] kultivačného supernatantu, s ovčou anti-tPA protilátkou konjugovanou s HRP. Na dráhu 1 sa nanieslo 40 ng štandardného melanómového tPA (86/67), ktorý vykazoval 70kDa reaktívny pás. Čiastočne purifikované koncentrované kultivačné supernatanty z netransformovaného *E. coli* XL-1 Blue a XM[K2S] sa aplikovali na dráhu 2, respektíve 3. Rozlíšený reaktívny pás bol demonštrovaný najmä v dráhe 3 na 39 kDa.

Obrázok 7: Determinácia molekulovej hmotnosti extracelulárneho r-K2S nesúceho aktívnu serínovú proteázovú doménu prostredníctvom kopolymerizovanej plazminogénovej polyakrylamidovej gélovej elektroforézy. Dráha 1 obsahuje označené štandardy molekulovej hmotnosti ($\times 10^{-3}$), SDS-6H (Sigma, Saint Louis, MO). 50 μ g kultivačného supernatantu z XL-1 Blue, XL-1 Blue transformovaného s pComb3HSS, a z XM[K2S] kultivačného supernatantu, precipitovaného s 55% nasýteným síranom amónnym, sa nanieslo na dráhu 2, 3, respektíve 4. Dráha 5 obsahovala 50 mIU štandardného melanómového tPA (86/670). Priesvitné zóny poštepeného plazminogénu v polyakrylamidovom géli sú viditeľné len v dráhe 4, na molekulovej hmotnosti 34 a 37 kDa (B), a v dráhe 5, na molekulovej hmotnosti 66 a 72 kDa (A).

Obrázok 8: Štruktúra A (sekv. č. 11): Natívna K2S molekula z aminokyselín 174-527 bez modifikácie.

Obrázok 9: Štruktúra B-0 (sekv. č. 12): Natívna K2S molekula z aminokyselín 197-527 bez modifikácie.

Obrázok 10: Štruktúra B-0 (sekv. č. 13): K2S molekula z aminokyselín 193-527, pričom ku štruktúre B-0 podľa obrázku 9 sa pridali na N-koncovú časť aminokyseliny SEGN.

Obrázok 11: Štruktúra B-2 (sekv. č. 14): K2S molekula z aminokyselín 193-527, ako na obrázku 10, pričom Cys-261 sa zmenil za Ser.

Obrázok 12: Štruktúra B-3 (sekv. č. 15): K2S molekula z aminokyselín 191-527, pričom ku štruktúre B-0 podľa obrázku 9 sa pridali na N-koncovú časť aminokyseliny SEGNSD.

Obrázok 13: Štruktúra B-4 (sekv. č. 16): K2S molekula z aminokyselín 191-527, ako na obrázku 12, pričom Cys-261 sa zmenil za Ser.

Obrázok 14: Štruktúra C (sekv. č. 17): Natívna K2S molekula z aminokyselín 220-527 bez modifikácie. Táto molekula môže byť ďalej modifikovaná podobným spôsobom ako je opísané pre štruktúru B na obrázkoch 10-13.

Obrázok 15: Štruktúra D (sekv. č. 18): Natívna K2S molekula z aminokyselín 260-527 bez modifikácie. Táto molekula môže byť ďalej modifikovaná podobným spôsobom ako je opísané pre štruktúru B na obrázkoch 10-13.

Obrázok 16: tPA molekula (sekv. č. 19).

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Materiály a metódy

Návrh primeru. Na amplifikáciu špecifickej časti tPA génu, sa syntetizoval (Life Technologies, Grand Island, NY) pár primerov SK2/174 [5' GAGGAGGAGGT GGC CCAGGCGGCCTCTGAGGAAACAGTGAC 3'] (sekv. č. 22) a ASSP [5' GAGGAGGAG CTGGCCGGCCTGGCCCGGTCGCATGTTGTCACG 3'] (sekv. č. 23). Tieto primery sa navrhli na základe ľudského tPA génu získaného z NCBI databáz (g137119). Syntetizovali sa so *Sfi*I koncovými klonovacími miestami (podčiarknuté) takým spôsobom, aby sa čítací rámec z ATG *gpIII* génu vo fagemidovom vektore, pComb3HSS, udržiaval cez začlenenú sekvenciu.

Iná primerová sada na miestne špecifickú mutagenózu sa navrhla na anelovanie na sekvenciu situovanú medzi K2S génom a génom III v pComb3H-K2S. Sekvencie primerov s mutovanými bázami (podčiarknuté) na generovanie nového

stop kodónu boli: MSTPA [5' ACATGCGACCGTGTGACAGGCCGGCCAG 3'] (sekv. č. 24) a MASTPA [5' CTGGCCGGCCTGTCACGGTCGCATGT 3'] (sekv. č. 25).

Amplifikácia K2S génu prostredníctvom PCR. 1 µg SK2/174 a ASSP primerov spolu s 50 ng p51-3 templátu (získaného od Dr. Hiroshi Sasakiho, Fujisawa Pharmaceutical, Japonsko) sa supendovalo v 100 µl PCR zmesi. Do roztoku sa nakoniec pridalo 2,5 U Taq polymerázy (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). Titrovaný amplifikačný stav sa inicioval skokovým štartom pri 85 °C počas 4 minút, potom prebiehala denaturácia pri 95 °C 50 sekúnd, anelovanie pri 42 °C 50 sekúnd, predlžovanie pri 72 °C 1,5 minúty. Opakovane sa to uskutočňovalo tridsaťpäť kôl. Zmes sa ďalej inkubovala pri 72 °C 10 minút. Ampplifikovaný produkt s dĺžkou 1110 bp sa následne purifikoval prostredníctvom QIAquick PCR purifikačného kitu (QIAGEN, Hilden, Nemecko). Správnosť purifikovaného produktu sa potvrdila prostredníctvom restriekčných enzýmov.

Konštrukcia fagemidu exprimujúceho K2S. Purifikovaný PCR produkt K2S a pCimb3HSS fagemid (láskavo poskytnutý Dr. Carlosom F. Barbasom, Scripps Institute, USA) sa poštiepili s *SfiI* (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN), aby sa pripravili špecifické kohézne klonovacie miesta. Štyri µg purifikovaného PCR produktu sa štiepilo so 60 U *SfiI* pri 50 °C 18 hodín. Pre pComb3HSS sa 20 µg fagemidových vektorov ošetrovalo s 100 U *SfiI*. Poštiepené produkty purifikovaného PCR produktu K2S a pComb3HSS (približne 3300 bp) sa následne gélovo purifikovali prostredníctvom QIAquick gélového extrakčného kitu (QIAGEN, Hilden, Nemecko). Do zmesi 0,7 µg purifikovaného s *SfiI* poštiepeného pComb3HSS a 0,9 µg purifikovaného s *SfiI* poštiepeného PCR produktu sa pridalo 5 U T4 ligázy (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). Ligačná reakčná zmes sa inkubovala pri 30 °C 18 hodín. Novo skonštruovaný fagemid sa označil ako pComb3H-K2S.

Transformácia *E. coli* XL-1 Blue. Dvesto µl CaCl₂ kompetentných *E. coli* XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla, CA) sa transformovalo so 70 ng ligovaného alebo mutovaného produktu. Transformované bunky sa namnožili prostredníctvom vysiatia na LB agar obsahujúci 100 µg/ml ampicilínu a 10 µg/ml tetracyklínu (Sigma, Saint Louis, MO). Po kultivácii pri 37 °C počas 18 hodín sa selektovalo niekoľko

kolónií rezistentných voči antibiotiku na prípravu plazmidu v minimeradle prostredníctvom použitia alkalické lyzačnej metódy. Každý purifikovaný plazmid sa podrobil analýze na *SfiI* restrikčné miesto. Transformant nesúci plazmid so správnym *SfiI* restrikčným miestom (miestami) sa následne množil 18 hodín pri 37 °C v 100 ml LB média s ampicilínom 100 µg/ml a tetracyklínom 10 µg/ml. Uskutočnili sa maxipreparácie plazmidu použitím QIAGEN plazmidového maxi kitu (QIAGEN, Hilden, Nemecko). Purifikovaný plazmid sa znova skúmal na špecifické restrikčné miesta prostredníctvom *SfiI* a sekvenoval sa prostredníctvom AmpliTaq DNA polymerázového terminátorového cyklického sekvenačného kitu (The Perkin-Elmer Corporation, Foster City, CA).

Mieste špecifická mutagenéza pComb3H-K2S. 10 ng pComb3H-K2S templátu sa zmiešalo so 125 ng MSTPA a MASTPA primerov. 2,5 U PfuTurbo DNA polymerázy (Stratagene, La Jolla, CA) sa pridalo do zmesi na cyklickú amplifikáciu. Reakcia začala jedným kolom pri 95 °C 30 s. Potom nasledovalo 16 kôl pozostávajúcich z 95 °C 30 s, 55 °C 1 min a 68 °C 9 min. Reakčná skúmavka sa následne umiestnila na ľad na 2 minúty. Aby sa rozrušili templátové vlákna, 10 U *DpnI* restrikčného enzýmu (Stratagene, LA Jolla, CA) sa pridalo do amplifikačnej reakcie a táto sa inkubovala 1 hodinu pri 37 °C. Tento syntetizovaný produkt (MpComb3H-K2S) sa ďalej použil na transformáciu *E. coli* XL-1 Blue.

Príprava rekombinantného K2S vystaveného na fág (phage-display). Potom ako sa pComb3H-K2S transformoval do XL-1 Blue, uskutočňovala sa fágová displejová technika. Klon *E. coli* XL-1 Blue transformovaný s pComb3H-K2S sa množil v 10 ml super média obsahujúcom ampicilín 100 µg/ml a tetracyklín 10 µg/ml, pri 37 °C pokiaľ sa nedosiahlo O.D. (600 nm) 1,5. Bakteriálna kultúra sa následne množila v 100 ml rovnakého média a kultivovala sa 2 hodiny. Na infekciu transformovaného *E. coli* CL-1 Blue sa použilo 10¹² pfu VCSM13 pomocného fága (Stratagene, La Jolla, CA). Po troch hodinách inkubovania sa do kultúry pridal kanamycín v konečnej koncentrácii 70 µg/ml. Kultúra sa nechala pretrepávať (200 ot./min) 18 hodín pri 37 °C. Bakteriofágy, ktoré niesli K2S na gp3 (K2S-φ) sa potom izolovali prostredníctvom pridania 4% w/v PEG MW 8000 (Sigma, Saint Louis, MO) a 3% w/v NaCl. Nakoniec sa izolovaný fág resuspendoval v 2 ml PBS pH 7,4.

Počet fágov sa určil prostredníctvom infikovaných *E. coli* XL-1 Blue. Podľa známeho opisu sa vypočítal počet jednotiek tvoriacich kolónie na mililiter (cfu/ml) (21).

Expresia rekombinantného K2S v trepacích fľašiach. *E. coli* XL-1 Blue transformované s MpComb3H-K2S sa kultivovali v 100 ml super média (3% hmotn./objem tryptón, 2% hmotn./objem kvasinkový extrakt a 1% hmotn./objem MOPS) pri pH 7,0 v prítomnosti ampicilínu (100 µg/ml) pri 37 °C až kým sa nedosiahlo O.D. (600 nm) 0,8. Následne sa indukovala proteínová syntéza prostredníctvom 1 mM IPTG (Promega, Madison, WI). Baktérie sa ďalej kultivovali pretrepávaním (200 ot./min) 6 hodín pri 30 °C. Kultivačný supernatant sa izoloval a precipitoval s 55% nasýteným síranom amónnym (32). Precipitát sa rekonštituoval s PBA, pH 7,2 a dialyzoval sa v rovnakom tlmivom roztoku pri 4 °C 18 hodín. Periplazmatické proteíny z bakteriálnych buniek sa extrahovali použitím chloroformového šoku, ako už bolo opísané v Ames a ďalší (2).

Kvantifikácia rekombinantného K2S imunologickým testom. Na detegovanie r-K2S sa tuhý podklad pokryl s monoklonálnou protilátkou proti kringle 2 doméne (16/B) (láskavo poskytnutou Dr. Ute Zachariasom, Central Institute of Molecular Biology, Berlin-Buch, Nemecko). Uskutočňovali sa štandardné ELISA premývacie a blokovacie procesy. Do každej jamky pokrytej s anti-kringle 2 sa pridávalo päťdesiat µl 10^{11} cfu/ml K2S-φ alebo sekrečného r-K2S. Detekcia komplexu antigén-protilátka sa uskutočňovala nasledovne. Do každej reakčnej jamky sa po premývacom kroku pridala buď ovčia anti-M13 protilátka konjugovaná s HRP (Pharmacia Biotech, Uppsala, Švédsko), alebo ovčia anti-TPA protilátka konjugovaná s HRP (Cedarlane, Ontario, Kanada). Do každej jamky sa pridal substrát TMB a reakcia sa nakoniec zastavila po 30 minútach inkubovania pridaním H₂SO₄ roztoku. Ako pozitívna kontrola bol použitý štandardný melanómový tPA 86/670 (National Institute for Biological Standards and Control, Hertfordshire, UK).

Test amidolytickej aktivity. Testovací kit na detekciu tPA amidolytickej aktivity sa kúpil od firmy Chromagenix (Molndal, Švédsko). Sibstrátová zmes obsahujúca plazminogén a S-2251 sa použila na determináciu serínovej proteázovej enzymatickej aktivity. Riedenie 10-2 každej vzorky precipitovanej s amoniakom sa testovalo s a bez stimulátora, ľudských fibrinogénových fragmentov. Testovacia procedúra bola v súlade s COASET t-PA manuálom.

SDS-PAGE a imunobloting. Displejovaný precipitát-produkt z kultivačného supernatantu sa ďalej skoncentroval desaťnásobne s centricon 10 (AMICON, Beverly, MA). Koncentrovaná vzorka sa podrobila proteínovej separácii prostredníctvom SDS-PAGE, použitím 15% rozlišovacieho gélu v redukčnom tlmivom roztoku, a nasledoval elektroblotting na nitrocelulózu. Nitrocelulóza sa potom blokovala so 4% odstredeným mliekom dve hodiny. Na detekciu r-K2S sa na nitrocelulózu aplikovalo správne riedenie ovčej anti-tPA protilátky konjugovanej s HRP. Imuoreaktívny pás sa vizualizoval senzitívnym detekčným systémom, Amplified Opti-4CN kit (BIORAD, Hercules, CA).

Kopolymerizovaná plazminogénová polyakrylamidová gélová elektroforéza. 11% rozlišovací polyakrylamidový gél sa kopolymerizoval s plazminogénom a želatínou, ako bolo opísané v Heussen a ďalší (14). Usporiadavací gél sa pripravil ako 4% koncentrácia bez plazminogénu a želatíny. Elektroforéza sa uskutočňovala pri 4 °C za konštantného prúdu 8 mA. Zvyšné SDS v gélovom páse sa odstránilo miernym pretrepávaním pri laboratórnej teplote počas 1 hodiny v 2,5% Trito X-100. Potom sa gélový pás inkuboval v 0,1M zmesi glycín-NaOH, pH 8,3 5 hodín pri 37 °C. Nakoniec sa gélový pás farbil a odfarbil štandardným farbiacim systémom Coomassie brilliant blue (R-250). Poloha peptidu, ktorý je nositeľom enzymatickej aktivity, sa nefarbila farbičkou v kontraste s modrým pozadím.

Výsledky

Konštrukcia vektora nesúceho K2S gén. Z vektora p51-3 sme amplifikovali kringle 2 plus serínovú proteázovú časť tPA (Ser¹⁷⁴ v kringle 2 doméne až Pro⁵²⁷ v serínovej proteáze) použitím primerov SK2/174 a ASSP. Amplifikovaný 1110bp produkt sa demonštroval prostredníctvom agarózovej gélovej elektroforézy (obrázok 1, dráha 2) a začlenil sa do pComb3HSS fagemidu prostredníctvom dvoch *SfiI* štiepných miest na 5' a 3' koncoch v správnom čítacom rámci. Tak sa generoval nový vektor, pComb3H-K2S, nesúci K2S. V tomto vektore je K2S ohraničená spredu (upstream) OmpA signálnou sekvenciou a zozadu (downstream) s gpIII. Správne začlenenie K2S sa overilo tak restričnou analýzou so *SfiI* (obrázok 2, dráha 3), ako aj PCR analýzou (demonštrovanie jediným pásom s veľkosťou 1110

bp), a DNA sekvenovaním. Schematický diagram mapy pComb3H-K2S je znázornený na obrázku 3.

r-K2S displejovaný na fág. VCSM13 vlákniť fág sa použil na infekciu *E. coli* XL-1 Blue, X[K2S], ktorý bol transformovaný s pComb3H-K2S. VCSM13 sa množil a začlenil K2S-gp3 fúzovaný proteín v priebehu procesov zbaľovania vírusu. Izolovaný rekombinantný fág (K2S- ϕ) poskytol koncentráciu $5,4 \times 10^{11}$ cfu/ml determinovanú prostredníctvom opätovnej infekcie *E. coli* XL-1 Blue s PEG-precipitovanými fágmi. Expresia r-K2S týmito rekombinantnými fágovými časticami sa overila prostredníctvom sendvičovej ELISA. Heterológny K2S proteín naviazaný na fág bol rozoznávaný monoklonálnou anti-kringle 2 protilátkou (16/B) použitím ovčieho anti-tPA monoklonálneho detekčného systému konjugovaného s HRP. Absorbancia v tomto teste bola $1,12 \pm 0,03$ (tabuľka 1). Množstvo K2S detegovateľné na 10^{12} fágových častíc sa rovnalo 336 g proteínu vo vzťahu ku štandardnému melanómovému tPA. Na potvrdenie toho, že K2S-gp3 proteín bol spojený s fágovými časticami sa ovčia anti-tPA protilátka konjugovaná s HRP nahradila ovčou anti-M13 protilátkou konjugovanou s HRP. Táto imunoreakcia vykazovala absorbanciu $1,89 \pm 0,07$ (tabuľka 1). Na rozdiel od toho, keď zachytávacou protilátkou bola ovčia anti-M13 protilátka, pozorovala sa extrémne nízka K2S s ovčou anti-tPA protilátkou konjugovanou s HRP; absorbancia bola len $0,17 \pm 0,01$ (tabuľka 1). Toto naznačuje, že len minimum purifikovaných fágových častíc nieslo K2S-gp3 fúzovaný proteín. VCSM13 pripravený z netransformovaných XL-1 Blue sa použil ako negatívna kontrola.

Tabuľka 1

Detekcia r-K2S molekuly vo fágovom prípravku prostredníctvom sendvičovej ELISA

Zachytávací protilátka	Stopovacia protilátka (konjugovaná s HRP)			
	Anti-tPA		Anti-M13	
	K2S- ϕ	VCSM13 ^a	K2S- ϕ	VCSM13
Anti-kringle 2 ^b	$1,12 \pm 0,04^c$	$0,12 \pm 0,03$	$1,89 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,02$
Anti-M13	$0,17 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,05$	$1,91 \pm 0,02$	$1,88 \pm 0,03$

^a VCSM13 sa izoloval z XL-1 Blue transformovaného s pComb3HSS.

^b Použitá bola myšacia monoklonálna anti-kringle 2 (16/B) protilátka. Ostatné protilátky boli pripravené z ovčieho imunoglobulínu.

^c Hodnota je priemerom absorbancie každej vzorky, ktorá bola testovaná trojmo.

Konštrukcia MpComb3H-K2S. Generovali sme stop kodón medzi K2S a gp3 v pComb3H-K2S pomocou mutagénnych primerov (MSTPA a MASTPA) (obrázok 4). Na obohatenie novo syntetizovaného a mutovaného MpComb3H-K2S sa cyklická amplifikačná zmes dôkladne poštiepila s *DpnI*, aby sa degradoval starý dam metylovaný pComb3H-K1S templát (*DpnI* preferuje dam metylovanú DNA). Po transformovaní *E. coli* XL-1 Blue s MpComb3H-K2S sa na ďalšie štúdium vybral transformant XM[K2S]. V dôsledku bp substitúcie sa stratilo jedno *SfiI* štiepne miesto v blízkosti 3' konca K2S génu po miestne špecifickej mutagenéze. Lineárna verzia s *SfiI* poštiepeného MpComb3H-K2S sa pozorovala na 4319 bp bez objavenia sa fragmentu so začleneným K2S génom (obrázok 5, dráha 3). Takže K2S gén kódovaný MpComb3H-K2S sa v XM[K2S] exprimoval ako nefúzovaný s gp3.

Expresia a purifikácia K2S. K2S expresia v XM[K2S] sa indukovala prostredníctvom IPTG. r-K2S bol detegovateľný použitím ELISA tak v periplazmatickou priestore, ako aj v kultivačnom supernatante. Množstvo heterológneho proteínu v každom prípravku sa determinovalo prostredníctvom sendvičovej ELISA a vo vzťahu k štandardnému tPA. Zo 100 ml bakteriálnej kultúry v pretrepávacej fľaši s O.D. [600 nm] 50 poskytla periplazmatická frakcia výťažok 1,38 µg r-K2S (približne 32 %), zatiaľ čo 2,96 µg r-K2S (približne 68 %) sa získalo z kultivačného supernatantu precipitovaného s amoniakom. Sendvičová ELISA sa použila na overenie PEG precipitovaného fágu z VCSM13 infikovaného XM[K2S]. Nedetegoval sa žiadny r-K2S zachytený monoklonálnou anti-kringle 2 protilátkou prostredníctvom anti-M13 protilátky konjugovanej s HRP, z čoho vyplýva, že K2S sa nenachádzala vo fágových časticiach ak chýbal gp3.

Merania amidolytickej aktivity. Ak sa vo vzorke nachádza serínová proteázová doména, plazminogén sa bude konvertovať na plazmín. Vyprodukovaný plazmín ďalej štiepi S-2251 substrát na farebný produkt, *p*-nitroanilín, ktorý má

maximálnu absorbanciu pri 405 nm. Špecifická aktivita rekombinantného produktu je v súlade s absorbanciou. Hodnotila a porovnávala sa na fibrinogéne závislá enzymatická aktivita každej vzorky, tzn. K2S- ϕ , periplazmatického r-K2S alebo kultivačného supernatantového r-K2S. Tak K2S- ϕ , ako aj periplazmatický r-K2S vykazovali značne nízku enzymatickú aktivitu, ktorá bola nižšia ako citlivosť testu (0,25 IU/ml). Kultivačný supernatantový r-K2S vykazoval na fibrinogéne závislú enzymatickú aktivitu 7 IU/ml. Takže zo 100 ml kultúry sa celkovo získalo 700 IU enzymatickej aktivity. Bez fibrinogénu nebola pozorovaná žiadna enzymatická aktivita r-K2S purifikovaného z kultivačného supernatantu, zatiaľ čo štandardný melanómový tPA vykazoval určitú aktivitu.

Demonštrovanie rekombinantného proteínu prostredníctvom imunoblotingu. Čiastočne purifikovaný K2S z kultivačného supernatantu XM[K2S] mal molekulovú hmotnosť 39 kDa pri použití ovčích anti-tPA protilátok (obrázok 6). Negatívna kontrola, čiastočne purifikovaný kultivačný supernatant netransformovaných XL-1 Blue, neobsahoval žiadny reaktívny pás s podobnou veľkosťou.

Lokalizácia aktívneho enzýmu prostredníctvom PAGE. Plazminogén sa kopolymerizoval a imobilizoval so želatínou v polyakrylamidovom géli pred elektroforézou. Analyzovali sa kultivačné supernatanty precipitované so síranom amónnym z *E. coli* XL-1 Blue, *E. coli* XL-1 Blue transformovaného s pComb3HSS a z XM[K2S] (obrázok 7). Všetky vzorky sa spracovali v neredukujúcich podmienkach, aby sa zachovala správna konformácia a aktivita serínovej proteázovej domény. Priehľadné oblasti plazminogénu poštiepeného so serínovou proteázou sa pozorovali len v kultivačných supernatantoch, precipitovaných so síranom amónnym, z XM[K2S] v polohách 34 a 37 kDa. Ostatné vzorky neposkytli žiadne čisté zóny. Dráha pozitívnej kontroly, štandardného melanómového tPA, tiež demonštrovala enzymatickú aktivitu v polohách 66 a 72 kDa.

Zoznam sekvencií

<110> Boehringer Ingelheim International GmbH

<120> Spôsoby produkcie tPA alebo K2S molekúl, odvodených
z rekombinantnej DNA, vo veľkom meradle

<130> case 1-1170

<140>

<141>

<150> GB 0027779.8

<151> 2000-11-14

<160> 25

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: sekvencia kódujúca N-koncovú časť K2S
proteínu

<400> 1

tctgagggaa acagtgac

18

<210> 2

<211> 1128

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: sekvencia kódujúca OmpA-K2S fúzovaný
proteín

<400> 2

```
atgaaaaaga cagctatcgc gattgcagtg gcactggctg gtttcgctac cgtggcccag 60
gcggcctctg agggaaacag tgactgctac tttgggaatg ggtcagccta ccgtggcacg 120
cacagcctca ccgagtcggg tgctcctgc ctcccgtgga attccatgat cctgataggc 180
aaggtttaca cagcacagaa cccagtgcc caggcactgg gcctgggcaa acataattac 240
tgccggaatc ctgatgggga tgccaagccc tggtgccacg tgctgaagaa ccgcaggctg 300
acgtgggagt actgtgatgt gccctcctgc tccacctgcg gcctgagaca gtacagccag 360
cctcagtttc gcatcaaagg agggctcttc gccgacatcg cctcccaccc ctggcaggct 420
gccatctttg ccaagcacag gaggtcgccc ggagagcggg tcctgtgcgg gggcatactc 480
atcagctcct gctggattct ctctgccgcc cactgcttcc aggagagggt tccgccccac 540
cacctgacgg tgatcttggg cagaacatac cgggtggtcc ctggcgagga ggagcagaaa 600
tttgaagtgc aaaaatacat tgtccataag gaattcgatg atgacactta cgacaatgac 660
attgcgctgc tgcagctgaa atcggattcg tcccgctgtg ccaggagag cagcgtggtc 720
cgactgtgt gccttcccc ggcgacctg cagctgccgg actggacgga gtgtgagctc 780
tccggctacg gcaagcatga ggccttgtct cctttctatt cggagcggct gaaggaggct 840
catgtcagac tgtaccatc cagccgctgc acatcacaa atttacttaa cagaacagtc 900
accgacaaca tgctgtgtgc tggagacact cggagcggcg ggccccaggc aaacttgac 960
gacgcctgcc agggcgattc gggaggcccc ctggtgtgtc tgaacgatgg ccgcatgact 1020
ttggtgggca tcatcagctg gggcctgggc tgtggacaga aggatgtccc ggggtgtgtac 1080
acaaaggtta ccaactacct agactggatt cgtgacaaca tgcgaccg 1128
```

<210> 3

<211> 66

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

<400> 3

```
atgaaaaaga cagctatcgc gattgcagtg gcactggctg gtttcgctac cgtggcccag 60
gcggcc 66
```

<210> 4

<211> 1065

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: sekvencia kódujúca K2S proteín

<400> 4

```
tctgagggaa acagtgactg ctactttggg aatgggtcag cctaccgtgg cacgcacagc 60
ctcaccgagt cgggtgcctc ctgcctcccg tggaattcca tgatcctgat aggcaagggtt 120
tacacagcac agaaccacag tgcccaggca ctgggcctgg gcaaacataa ttactgccgg 180
aatcctgatg gggatgccaa gccctggtgc cacgtgctga agaaccgag gctgacgtgg 240
gagtactgtg atgtgcctc ctgctccacc tgcggcctga gacagtacag ccagcctcag 300
tttcgcatca aaggagggct ctgcgcgac atgcctccc acccctggca ggctgccatc 360
tttgccaagc acaggaggtc gcccgagag cggttcctgt gcgggggcat actcatcagc 420
tctgtctgga ttctctctgc cgccactgc ttccaggaga ggtttccgcc ccaccacctg 480
acggtgatct tgggcagaac ataccgggtg gtccctggcg aggaggagca gaaatttgaa 540
gtcgaaaaat acattgtcca taaggaatc gatgatgaca cttacgacaa tgacattgcg 600
ctgctgcagc tgaaatcgga ttctgccgc tgtgccagg agagcagcgt ggtccgcact 660
gtgtgccttc ccccgcgga cctgcagctg ccggactgga cggagtgtga gctctccggc 720
tacggcaagc atgaggcctt gtctccttct tattcggagc ggctgaagga ggctcatgtc 780
agactgtacc catccagccg ctgcacatca caacatttac ttaacagaac agtcaccgac 840
aacatgctgt gtgctggaga cactcggagc ggcgggcccc aggcaaactt gcacgacgcc 900
tgccaggcg attcgggagg cccctggtg tgtctgaacg atggccgcat gactttggtg 960
ggcatcatca gctggggcct gggctgtgga cagaaggatg tcccgggtgt gtacacaaag 1020
gttaccaact acctagactg gattcgtgac aacatgcgac cgtga 1065
```

<210> 5

<211> 1128

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: sekvencia kódujúca OmpA-K2S fúzovaný proteín

<400> 5

```
atgaaaaaga cagctatcgc gattgcagtg gcactggctg gtttcgctac cgtggcccag 60
```

gcggcctctg agggaaacag tgactgctac tttgggaatg ggtcagccta cctgggcacg 120
cacagcctca ccgagtcggg tgccctcctgc ctcccgtgga attccatgat cctgataggc 180
aaggtttaca cagcacagaa cccagtgcc caggcactgg gcctgggcaa acataattac 240
tgccggaatc ctgatgggga tgccaagccc tgggtgccacg tgctgaagaa ccgcaggctg 300
acgtgggagt actgtgatgt gccctcctgc tccacctgcg gcctgagaca gtacagccag 360
cctcagtttc gcatcaaagg agggctcttc gccgacatcg cctcccaccc ctggcaggct 420
gccatctttg ccaagcacag gaggtcgccc ggagagcggg tcctgtgcgg gggcatactc 480
atcagctcct gctggattct ctctgccgcc cactgcttcc aggagagggt tccgccccac 540
cacctgacgg tgatcttggg cagaacatac cgggtggtcc ctggcgagga ggagcagaaa 600
tttgaagtcg aaaaatacat tgtccataag gaattcgatg atgacactta cgacaatgac 660
attgcgctgc tgcagctgaa atcggattcg tcccgtgtg cccaggagag cagcgtgggc 720
cgactgtgtg gccttcccc ggcgacactg cagctgccgg actggacgga gtgtgagctc 780
tccggctacg gcaagcatga ggcttgtct cctttctatt cggagcggct gaaggaggct 840
catgtcagac tgtacccatc cagccgctgc acatcacaac atttacttaa cagaacagtc 900
accgacaaca tgctgtgtgc tggagacact cggagcggcg ggccccaggc aaacttgcac 960
gacgcctgcc agggcgattc gggaggcccc ctggtgtgtc tgaacgatgg ccgcatgact 1020
ttggtgggca tcatcagctg gggcctgggc tgtggacaga aggatgtccc ggggtgtgtac 1080
acaaaggtta ccaactacct agactggatt cgtgacaaca tgcgaccg 1128

<210> 6

<211> 66

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

<400> 6

atgaaaaaga cagctatcgc gattgcagtg gcactggctg gtttcgctac cgtggcccag 60
gcggcc 66

<210> 7

<211> 1065

<212> DNA

<213> Umeľá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: sekvencia kódujúca K2S proteín

<400> 7

tctgagggaa acagtgactg ctactttggg aatgggtcag cctaccgtgg cagcacagc 60
ctcaccgagt cgggtgcctc ctgcctcccg tggaattcca tgatcctgat aggcaagggt 120
tacacagcac agaaccaccag tgcccaggca ctgggcctgg gcaaacataa ttactgccgg 180
aatcctgatg gggatgccaa gccctggtgc cactgtctga agaaccgcag gctgacgtgg 240
gagtactgtg atgtgccctc ctgctccacc tgccggcctga gacagtacag ccagcctcag 300
tttcgcatca aaggaggggt cttcgccgac atcgctctcc acccctggca ggctgccatc 360
tttgccaagc acaggagggt gcccgagag cggttcctgt gcggggggcat actcatcagc 420
tcctgtctga ttctctctgc cggccactgc ttccaggaga ggtttccgcc ccaccacctg 480
acgggtgatc tgggcagAAC ataccgggtg gtccctggcg aggaggagca gaaatttgaa 540
gtcgaaaaat acattgtcca taaggaattc gatgatgaca cttacgacaa tgacattgcg 600
ctgtctgcagc tgaaatcgga ttctgtccgc tgtgccagg agagcagcgt ggtccgcact 660
gtgtgccttc ccccgccgga cctgcagctg ccggactgga cggagtgtga gctctccggc 720
tacggcaagc atgaggcctt gtctcctttc tattcggagc ggctgaagga ggctcatgtc 780
agactgtacc catccagccg ctgcacatca caacatttac ttaacagAAC agtcaccgac 840
aacatgctgt gtgctggaga cactcggagc ggccggcccc aggcaaaact gcacgacgcc 900
tgccagggcg attcgggagg cccctggtg tgtctgaacg atggccgcac gactttggtg 960
ggcatcatca gctggggcct gggctgtgga cagaaggatg tcccgggtgt gtacacaaag 1020
gttaccaact acctagactg gattcgtgac aacatgcgac cgtga 1065

<210> 8

<211> 377

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: OmpA-K2S fúzovaný proteín

<400> 8

Met	Lys	Lys	Thr	Ala	Ile	Ala	Ile	Ala	Val	Ala	Leu	Ala	Gly	Phe	Ala
1					5				10					15	
Thr	Val	Ala	Gln	Ala	Ala	Ser	Glu	Gly	Asn	Ser	Asp	Cys	Tyr	Phe	Gly
		20						25					30		
Asn	Gly	Ser	Ala	Tyr	Arg	Gly	Thr	His	Ser	Leu	Thr	Glu	Ser	Gly	Ala
		35					40					45			
Ser	Cys	Leu	Pro	Trp	Asn	Ser	Met	Ile	Leu	Ile	Gly	Lys	Val	Tyr	Thr
	50					55					60				

Ala Gln Asn Pro Ser Ala Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr
65 70 75 80

Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Ala Lys Pro Trp Cys His Val Leu Lys
85 90 95

Asn Arg Arg Leu Thr Trp Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser Cys Ser Thr
100 105 110

Cys Gly Leu Arg Gln Tyr Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys Gly Gly
115 120 125

Leu Phe Ala Asp Ile Ala Ser His Pro Trp Gln Ala Ala Ile Phe Ala
130 135 140

Lys His Arg Arg Ser Pro Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly Gly Ile Leu
145 150 155 160

Ile Ser Ser Cys Trp Ile Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Gln Glu Arg
165 170 175

Phe Pro Pro His His Leu Thr Val Ile Leu Gly Arg Thr Tyr Arg Val
180 185 190

Val Pro Gly Glu Glu Glu Gln Lys Phe Glu Val Glu Lys Tyr Ile Val
195 200 205

His Lys Glu Phe Asp Asp Asp Thr Tyr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu
210 215 220

Gln Leu Lys Ser Asp Ser Ser Arg Cys Ala Gln Glu Ser Ser Val Val
225 230 235 240

Arg Thr Val Cys Leu Pro Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp Trp Thr
245 250 255

Glu Cys Glu Leu Ser Gly Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser Pro Phe
260 265 270

Tyr Ser Glu Arg Leu Lys Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser
275 280 285

Arg Cys Thr Ser Gln His Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp Asn Met
290 295 300

Leu Cys Ala Gly Asp Thr Arg Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn Leu His
305 310 315 320

Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Leu Asn Asp
325 330 335

Gly Arg Met Thr Leu Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly
340 345 350

Gln Lys Asp Val Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp
355 360 365

Trp Ile Arg Asp Asn Met Arg Pro Gly
370 375

<210> 9

<211> 4

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: peptidová sekvencia

<400> 9

Ser Glu Gly Asn

1

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: peptidová sekvencia

<400> 10

Ser Glu Gly Asn Ser Asp

1

5

<210> 11

<211> 354

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: K2S 174-527

<400> 11

Ser	Glu	Gly	Asn	Ser	Asp	Cys	Tyr	Phe	Gly	Asn	Gly	Ser	Ala	Tyr	Arg	
1				5					10					15		
Gly	Thr	His	Ser	Leu	Thr	Glu	Ser	Gly	Ala	Ser	Cys	Leu	Pro	Trp	Asn	
			20					25					30			
Ser	Met	Ile	Leu	Ile	Gly	Lys	Val	Tyr	Thr	Ala	Gln	Asn	Pro	Ser	Ala	
		35					40					45				
Gln	Ala	Leu	Gly	Leu	Gly	Lys	His	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	
	50					55					60					
Asp	Ala	Lys	Pro	Trp	Cys	His	Val	Leu	Lys	Asn	Arg	Arg	Leu	Thr	Trp	
65					70					75					80	
Glu	Tyr	Cys	Asp	Val	Pro	Ser	Cys	Ser	Thr	Cys	Gly	Leu	Arg	Gln	Tyr	
				85					90					95		
Ser	Gln	Pro	Gln	Phe	Arg	Ile	Lys	Gly	Gly	Leu	Phe	Ala	Asp	Ile	Ala	
			100					105					110			
Ser	His	Pro	Trp	Gln	Ala	Ala	Ile	Phe	Ala	Lys	His	Arg	Arg	Ser	Pro	
		115					120					125				
Gly	Glu	Arg	Phe	Leu	Cys	Gly	Gly	Ile	Leu	Ile	Ser	Ser	Cys	Trp	Ile	
	130					135					140					
Leu	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Gln	Glu	Arg	Phe	Pro	Pro	His	His	Leu	
145					150					155					160	
Thr	Val	Ile	Leu	Gly	Arg	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Pro	Gly	Glu	Glu	Glu	
				165					170					175		
Gln	Lys	Phe	Glu	Val	Glu	Lys	Tyr	Ile	Val	His	Lys	Glu	Phe	Asp	Asp	
			180					185					190			
Asp	Thr	Tyr	Asp	Asn	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ser	Asp	Ser	
		195					200					205				
Ser	Arg	Cys	Ala	Gln	Glu	Ser	Ser	Val	Val	Arg	Thr	Val	Cys	Leu	Pro	
	210					215					220					
Pro	Ala	Asp	Leu	Gln	Leu	Pro	Asp	Trp	Thr	Glu	Cys	Glu	Leu	Ser	Gly	
225					230					235					240	
Tyr	Gly	Lys	His	Glu	Ala	Leu	Ser	Pro	Phe	Tyr	Ser	Glu	Arg	Leu	Lys	
			245						250					255		
Glu	Ala	His	Val	Arg	Leu	Tyr	Pro	Ser	Ser	Arg	Cys	Thr	Ser	Gln	His	
			260					265					270			

Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Thr
 275 280 285

Arg Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln Gly Asp
 290 295 300

Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu Val
 305 310 315 320

Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro Gly
 325 330 335

Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp Trp Ile Arg Asp Asn Met
 340 345 350

Arg Pro

<210> 12

<211> 331

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: K2S 197-527

<400> 12

Ser Gly Ala Ser Cys Leu Pro Trp Asn Ser Met Ile Leu Ile Gly Lys
 1 5 10 15

Val Tyr Thr Ala Gln Asn Pro Ser Ala Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys
 20 25 30

His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Ala Lys Pro Trp Cys His
 35 40 45

Val Leu Lys Asn Arg Arg Leu Thr Trp Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser
 50 55 60

Cys Ser Thr Cys Gly Leu Arg Gln Tyr Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile
 65 70 75 80

Lys Gly Gly Leu Phe Ala Asp Ile Ala Ser His Pro Trp Gln Ala Ala
 85 90 95

Ile Phe Ala Lys His Arg Arg Ser Pro Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly
 100 105 110

Gly	Ile	Leu	Ile	Ser	Ser	Cys	Trp	Ile	Leu	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Phe	115	120	125
Gln	Glu	Arg	Phe	Pro	Pro	His	His	Leu	Thr	Val	Ile	Leu	Gly	Arg	Thr	130	135	140
Tyr	Arg	Val	Val	Pro	Gly	Glu	Glu	Glu	Gln	Lys	Phe	Glu	Val	Glu	Lys	145	150	155
Tyr	Ile	Val	His	Lys	Glu	Phe	Asp	Asp	Asp	Thr	Tyr	Asp	Asn	Asp	Ile	165	170	175
Ala	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ser	Asp	Ser	Ser	Arg	Cys	Ala	Gln	Glu	Ser	180	185	190
Ser	Val	Val	Arg	Thr	Val	Cys	Leu	Pro	Pro	Ala	Asp	Leu	Gln	Leu	Pro	195	200	205
Asp	Trp	Thr	Glu	Cys	Glu	Leu	Ser	Gly	Tyr	Gly	Lys	His	Glu	Ala	Leu	210	215	220
Ser	Pro	Phe	Tyr	Ser	Glu	Arg	Leu	Lys	Glu	Ala	His	Val	Arg	Leu	Tyr	225	230	235
Pro	Ser	Ser	Arg	Cys	Thr	Ser	Gln	His	Leu	Leu	Asn	Arg	Thr	Val	Thr	245	250	255
Asp	Asn	Met	Leu	Cys	Ala	Gly	Asp	Thr	Arg	Ser	Gly	Gly	Pro	Gln	Ala	260	265	270
Asn	Leu	His	Asp	Ala	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Val	Cys	275	280	285
Leu	Asn	Asp	Gly	Arg	Met	Thr	Leu	Val	Gly	Ile	Ile	Ser	Trp	Gly	Leu	290	295	300
Gly	Cys	Gly	Gln	Lys	Asp	Val	Pro	Gly	Val	Tyr	Thr	Lys	Val	Thr	Asn	305	310	315
Tyr	Leu	Asp	Trp	Ile	Arg	Asp	Asn	Met	Arg	Pro						325	330	

<210> 13

<211> 339

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: K2S 193-527, modifikovaná

<400> 13

Ser	Glu	Gly	Asn	Ser	Leu	Thr	Glu	Ser	Gly	Ala	Ser	Cys	Leu	Pro	Trp	1	5	10	15
Asn	Ser	Met	Ile	Leu	Ile	Gly	Lys	Val	Tyr	Thr	Ala	Gln	Asn	Pro	Ser	20	25	30	
Ala	Gln	Ala	Leu	Gly	Leu	Gly	Lys	His	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	35	40	45	
Gly	Asp	Ala	Lys	Pro	Trp	Cys	His	Val	Leu	Lys	Asn	Arg	Arg	Leu	Thr	50	55	60	
Trp	Glu	Tyr	Cys	Asp	Val	Pro	Ser	Cys	Ser	Thr	Cys	Gly	Leu	Arg	Gln	65	70	75	80
Tyr	Ser	Gln	Pro	Gln	Phe	Arg	Ile	Lys	Gly	Gly	Leu	Phe	Ala	Asp	Ile	85	90	95	
Ala	Ser	His	Pro	Trp	Gln	Ala	Ala	Ile	Phe	Ala	Lys	His	Arg	Arg	Ser	100	105	110	
Pro	Gly	Glu	Arg	Phe	Leu	Cys	Gly	Gly	Ile	Leu	Ile	Ser	Ser	Cys	Trp	115	120	125	
Ile	Leu	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Gln	Glu	Arg	Phe	Pro	Pro	His	His	130	135	140	
Leu	Thr	Val	Ile	Leu	Gly	Arg	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Pro	Gly	Glu	Glu	145	150	155	160
Glu	Gln	Lys	Phe	Glu	Val	Glu	Lys	Tyr	Ile	Val	His	Lys	Glu	Phe	Asp	165	170	175	
Asp	Asp	Thr	Tyr	Asp	Asn	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ser	Asp	180	185	190	
Ser	Ser	Arg	Cys	Ala	Gln	Glu	Ser	Ser	Val	Val	Arg	Thr	Val	Cys	Leu	195	200	205	
Pro	Pro	Ala	Asp	Leu	Gln	Leu	Pro	Asp	Trp	Thr	Glu	Cys	Glu	Leu	Ser	210	215	220	
Gly	Tyr	Gly	Lys	His	Glu	Ala	Leu	Ser	Pro	Phe	Tyr	Ser	Glu	Arg	Leu	225	230	235	240
Lys	Glu	Ala	His	Val	Arg	Leu	Tyr	Pro	Ser	Ser	Arg	Cys	Thr	Ser	Gln	245	250	255	
His	Leu	Leu	Asn	Arg	Thr	Val	Thr	Asp	Asn	Met	Leu	Cys	Ala	Gly	Asp	260	265	270	

Thr Arg Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln Gly
275 280 285

Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu
290 295 300

Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro
305 310 315 320

Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp Trp Ile Arg Asp Asn
325 330 335

Met Arg Pro

<210> 14

<211> 335

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: K2S 193-527, modifikovaná

<400> 14

Ser Leu Thr Glu Ser Gly Ala Ser Cys Leu Pro Trp Asn Ser Met Ile
1 5 10 15

Leu Ile Gly Lys Val Tyr Thr Ala Gln Asn Pro Ser Ala Gln Ala Leu
20 25 30

Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Ala Lys
35 40 45

Pro Trp Cys His Val Leu Lys Asn Arg Arg Leu Thr Trp Glu Tyr Cys
50 55 60

Asp Val Pro Ser Ser Ser Thr Cys Gly Leu Arg Gln Tyr Ser Gln Pro
65 70 75 80

Gln Phe Arg Ile Lys Gly Gly Leu Phe Ala Asp Ile Ala Ser His Pro
85 90 95

Trp Gln Ala Ala Ile Phe Ala Lys His Arg Arg Ser Pro Gly Glu Arg
100 105 110

Phe Leu Cys Gly Gly Ile Leu Ile Ser Ser Cys Trp Ile Leu Ser Ala
115 120 125

Ala	His	Cys	Phe	Gln	Glu	Arg	Phe	Pro	Pro	His	His	Leu	Thr	Val	Ile
130						135					140				
Leu	Gly	Arg	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Pro	Gly	Glu	Glu	Glu	Gln	Lys	Phe
145					150					155					160
Glu	Val	Glu	Lys	Tyr	Ile	Val	His	Lys	Glu	Phe	Asp	Asp	Asp	Thr	Tyr
				165					170					175	
Asp	Asn	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ser	Asp	Ser	Ser	Arg	Cys
			180					185						190	
Ala	Gln	Glu	Ser	Ser	Val	Val	Arg	Thr	Val	Cys	Leu	Pro	Pro	Ala	Asp
		195					200					205			
Leu	Gln	Leu	Pro	Asp	Trp	Thr	Glu	Cys	Glu	Leu	Ser	Gly	Tyr	Gly	Lys
	210					215					220				
His	Glu	Ala	Leu	Ser	Pro	Phe	Tyr	Ser	Glu	Arg	Leu	Lys	Glu	Ala	His
225					230					235					240
Val	Arg	Leu	Tyr	Pro	Ser	Ser	Arg	Cys	Thr	Ser	Gln	His	Leu	Leu	Asn
				245					250					255	
Arg	Thr	Val	Thr	Asp	Asn	Met	Leu	Cys	Ala	Gly	Asp	Thr	Arg	Ser	Gly
			260					265					270		
Gly	Pro	Gln	Ala	Asn	Leu	His	Asp	Ala	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly
		275					280					285			
Pro	Leu	Val	Cys	Leu	Asn	Asp	Gly	Arg	Met	Thr	Leu	Val	Gly	Ile	Ile
	290					295					300				
Ser	Trp	Gly	Leu	Gly	Cys	Gly	Gln	Lys	Asp	Val	Pro	Gly	Val	Tyr	Thr
305					310					315					320
Lys	Val	Thr	Asn	Tyr	Leu	Asp	Trp	Ile	Arg	Asp	Asn	Met	Arg	Pro	
			325						330					335	

<210> 15

<211> 343

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: K2S 191-527, modifikovaná

<400> 15

Ser	Glu	Gly	Asn	Ser	Asp	Thr	His	Ser	Leu	Thr	Glu	Ser	Gly	Ala	Ser	1	5	10	15
Cys	Leu	Pro	Trp	Asn	Ser	Met	Ile	Leu	Ile	Gly	Lys	Val	Tyr	Thr	Ala	20	25	30	
Gln	Asn	Pro	Ser	Ala	Gln	Ala	Leu	Gly	Leu	Gly	Lys	His	Asn	Tyr	Cys	35	40	45	
Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Asp	Ala	Lys	Pro	Trp	Cys	His	Val	Leu	Lys	Asn	50	55	60	
Arg	Arg	Leu	Thr	Trp	Glu	Tyr	Cys	Asp	Val	Pro	Ser	Cys	Ser	Thr	Cys	65	70	75	80
Gly	Leu	Arg	Gln	Tyr	Ser	Gln	Pro	Gln	Phe	Arg	Ile	Lys	Gly	Gly	Leu	85	90	95	
Phe	Ala	Asp	Ile	Ala	Ser	His	Pro	Trp	Gln	Ala	Ala	Ile	Phe	Ala	Lys	100	105	110	
His	Arg	Arg	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Phe	Leu	Cys	Gly	Gly	Ile	Leu	Ile	115	120	125	
Ser	Ser	Cys	Trp	Ile	Leu	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Gln	Glu	Arg	Phe	130	135	140	
Pro	Pro	His	His	Leu	Thr	Val	Ile	Leu	Gly	Arg	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	145	150	155	160
Pro	Gly	Glu	Glu	Glu	Gln	Lys	Phe	Glu	Val	Glu	Lys	Tyr	Ile	Val	His	165	170	175	
Lys	Glu	Phe	Asp	Asp	Asp	Thr	Tyr	Asp	Asn	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Gln	180	185	190	
Leu	Lys	Ser	Asp	Ser	Ser	Arg	Cys	Ala	Gln	Glu	Ser	Ser	Val	Val	Arg	195	200	205	
Thr	Val	Cys	Leu	Pro	Pro	Ala	Asp	Leu	Gln	Leu	Pro	Asp	Trp	Thr	Glu	210	215	220	
Cys	Glu	Leu	Ser	Gly	Tyr	Gly	Lys	His	Glu	Ala	Leu	Ser	Pro	Phe	Tyr	225	230	235	240
Ser	Glu	Arg	Leu	Lys	Glu	Ala	His	Val	Arg	Leu	Tyr	Pro	Ser	Ser	Arg	245	250	255	
Cys	Thr	Ser	Gln	His	Leu	Leu	Asn	Arg	Thr	Val	Thr	Asp	Asn	Met	Leu	260	265	270	
Cys	Ala	Gly	Asp	Thr	Arg	Ser	Gly	Gly	Pro	Gln	Ala	Asn	Leu	His	Asp	275	280	285	

Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Leu Asn Asp Gly
290 295 300

Arg Met Thr Leu Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Gln
305 310 315 320

Lys Asp Val Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp Trp
325 330 335

Ile Arg Asp Asn Met Arg Pro
340

<210> 16

<211> 343

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: K2S 191-527, modifikovaná

<400> 16

Ser Glu Gly Asn Ser Asp Thr His Ser Leu Thr Glu Ser Gly Ala Ser
1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Asn Ser Met Ile Leu Ile Gly Lys Val Tyr Thr Ala
20 25 30

Gln Asn Pro Ser Ala Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys
35 40 45

Arg Asn Pro Asp Gly Asp Ala Lys Pro Trp Cys His Val Leu Lys Asn
50 55 60

Arg Arg Leu Thr Trp Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser Ser Ser Thr Cys
65 70 75 80

Gly Leu Arg Gln Tyr Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys Gly Gly Leu
85 90 95

Phe Ala Asp Ile Ala Ser His Pro Trp Gln Ala Ala Ile Phe Ala Lys
100 105 110

His Arg Arg Ser Pro Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly Gly Ile Leu Ile
115 120 125

Ser Ser Cys Trp Ile Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Gln Glu Arg Phe
130 135 140

Pro	Pro	His	His	Leu	Thr	Val	Ile	Leu	Gly	Arg	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
145					150					155					160
Pro	Gly	Glu	Glu	Glu	Gln	Lys	Phe	Glu	Val	Glu	Lys	Tyr	Ile	Val	His
				165					170					175	
Lys	Glu	Phe	Asp	Asp	Asp	Thr	Tyr	Asp	Asn	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Gln
			180					185					190		
Leu	Lys	Ser	Asp	Ser	Ser	Arg	Cys	Ala	Gln	Glu	Ser	Ser	Val	Val	Arg
		195					200					205			
Thr	Val	Cys	Leu	Pro	Pro	Ala	Asp	Leu	Gln	Leu	Pro	Asp	Trp	Thr	Glu
	210					215					220				
Cys	Glu	Leu	Ser	Gly	Tyr	Gly	Lys	His	Glu	Ala	Leu	Ser	Pro	Phe	Tyr
225					230					235					240
Ser	Glu	Arg	Leu	Lys	Glu	Ala	His	Val	Arg	Leu	Tyr	Pro	Ser	Ser	Arg
			245						250					255	
Cys	Thr	Ser	Gln	His	Leu	Leu	Asn	Arg	Thr	Val	Thr	Asp	Asn	Met	Leu
			260					265					270		
Cys	Ala	Gly	Asp	Thr	Arg	Ser	Gly	Gly	Pro	Gln	Ala	Asn	Leu	His	Asp
	275						280					285			
Ala	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Val	Cys	Leu	Asn	Asp	Gly
	290					295					300				
Arg	Met	Thr	Leu	Val	Gly	Ile	Ile	Ser	Trp	Gly	Leu	Gly	Cys	Gly	Gln
305					310					315					320
Lys	Asp	Val	Pro	Gly	Val	Tyr	Thr	Lys	Val	Thr	Asn	Tyr	Leu	Asp	Trp
			325						330					335	
Ile	Arg	Asp	Asn	Met	Arg	Pro									
			340												

<210> 17

<211> 308

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: K2S 220-527

<400> 17

Ser	Ala	Gln	Ala	Leu	Gly	Leu	Gly	Lys	His	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	1	5	10	15
Asp	Gly	Asp	Ala	Lys	Pro	Trp	Cys	His	Val	Leu	Lys	Asn	Arg	Arg	Leu	20	25	30	
Thr	Trp	Glu	Tyr	Cys	Asp	Val	Pro	Ser	Cys	Ser	Thr	Cys	Gly	Leu	Arg	35	40	45	
Gln	Tyr	Ser	Gln	Pro	Gln	Phe	Arg	Ile	Lys	Gly	Gly	Leu	Phe	Ala	Asp	50	55	60	
Ile	Ala	Ser	His	Pro	Trp	Gln	Ala	Ala	Ile	Phe	Ala	Lys	His	Arg	Arg	65	70	75	80
Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Phe	Leu	Cys	Gly	Gly	Ile	Leu	Ile	Ser	Ser	Cys	85	90	95	
Trp	Ile	Leu	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Gln	Glu	Arg	Phe	Pro	Pro	His	100	105	110	
His	Leu	Thr	Val	Ile	Leu	Gly	Arg	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Pro	Gly	Glu	115	120	125	
Glu	Glu	Gln	Lys	Phe	Glu	Val	Glu	Lys	Tyr	Ile	Val	His	Lys	Glu	Phe	130	135	140	
Asp	Asp	Asp	Thr	Tyr	Asp	Asn	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ser	145	150	155	160
Asp	Ser	Ser	Arg	Cys	Ala	Gln	Glu	Ser	Ser	Val	Val	Arg	Thr	Val	Cys	165	170	175	
Leu	Pro	Pro	Ala	Asp	Leu	Gln	Leu	Pro	Asp	Trp	Thr	Glu	Cys	Glu	Leu	180	185	190	
Ser	Gly	Tyr	Gly	Lys	His	Glu	Ala	Leu	Ser	Pro	Phe	Tyr	Ser	Glu	Arg	195	200	205	
Leu	Lys	Glu	Ala	His	Val	Arg	Leu	Tyr	Pro	Ser	Ser	Arg	Cys	Thr	Ser	210	215	220	
Gln	His	Leu	Leu	Asn	Arg	Thr	Val	Thr	Asp	Asn	Met	Leu	Cys	Ala	Gly	225	230	235	240
Asp	Thr	Arg	Ser	Gly	Gly	Pro	Gln	Ala	Asn	Leu	His	Asp	Ala	Cys	Gln	245	250	255	
Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Val	Cys	Leu	Asn	Asp	Gly	Arg	Met	Thr	260	265	270	
Leu	Val	Gly	Ile	Ile	Ser	Trp	Gly	Leu	Gly	Cys	Gly	Gln	Lys	Asp	Val	275	280	285	

Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp Trp Ile Arg Asp
290 295 300

Asn Met Arg Pro
305

<210> 18

<211> 268

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: K2S 260-527

<400> 18

Ser Cys Ser Thr Cys Gly Leu Arg Gln Tyr Ser Gln Pro Gln Phe Arg
1 5 10 15

Ile Lys Gly Gly Leu Phe Ala Asp Ile Ala Ser His Pro Trp Gln Ala
20 25 30

Ala Ile Phe Ala Lys His Arg Arg Ser Pro Gly Glu Arg Phe Leu Cys
35 40 45

Gly Gly Ile Leu Ile Ser Ser Cys Trp Ile Leu Ser Ala Ala His Cys
50 55 60

Phe Gln Glu Arg Phe Pro Pro His His Leu Thr Val Ile Leu Gly Arg
65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Pro Gly Glu Glu Glu Gln Lys Phe Glu Val Glu
85 90 95

Lys Tyr Ile Val His Lys Glu Phe Asp Asp Asp Thr Tyr Asp Asn Asp
100 105 110

Ile Ala Leu Leu Gln Leu Lys Ser Asp Ser Ser Arg Cys Ala Gln Glu
115 120 125

Ser Ser Val Val Arg Thr Val Cys Leu Pro Pro Ala Asp Leu Gln Leu
130 135 140

Pro Asp Trp Thr Glu Cys Glu Leu Ser Gly Tyr Gly Lys His Glu Ala
145 150 155 160

Leu Ser Pro Phe Tyr Ser Glu Arg Leu Lys Glu Ala His Val Arg Leu
165 170 175

Tyr Pro Ser Ser Arg Cys Thr Ser Gln His Leu Leu Asn Arg Thr Val
180 185 190

Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Thr Arg Ser Gly Gly Pro Gln
195 200 205

Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val
210 215 220

Cys Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly
225 230 235 240

Leu Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr
245 250 255

Asn Tyr Leu Asp Trp Ile Arg Asp Asn Met Arg Pro
260 265

<210> 19

<211> 527

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 19

Ser Tyr Gln Val Ile Cys Arg Asp Glu Lys Thr Gln Met Ile Tyr Gln
1 5 10 15

Gln His Gln Ser Trp Leu Arg Pro Val Leu Arg Ser Asn Arg Val Glu
20 25 30

Tyr Cys Trp Cys Asn Ser Gly Arg Ala Gln Cys His Ser Val Pro Val
35 40 45

Lys Ser Cys Ser Glu Pro Arg Cys Phe Asn Gly Gly Thr Cys Gln Gln
50 55 60

Ala Leu Tyr Phe Ser Asp Phe Val Cys Gln Cys Pro Glu Gly Phe Ala
65 70 75 80

Gly Lys Cys Cys Glu Ile Asp Thr Arg Ala Thr Cys Tyr Glu Asp Gln
85 90 95

Gly Ile Ser Tyr Arg Gly Thr Trp Ser Thr Ala Glu Ser Gly Ala Glu
100 105 110

Cys Thr Asn Trp Asn Ser Ser Ala Leu Ala Gln Lys Pro Tyr Ser Gly
115 120 125

Arg	Arg	Pro	Asp	Ala	Ile	Arg	Leu	Gly	Leu	Gly	Asn	His	Asn	Tyr	Cys	130	135	140
Arg	Asn	Pro	Asp	Arg	Asp	Ser	Lys	Pro	Trp	Cys	Tyr	Val	Phe	Lys	Ala	145	150	155
Gly	Lys	Tyr	Ser	Ser	Glu	Phe	Cys	Ser	Thr	Pro	Ala	Cys	Ser	Glu	Gly	165	170	175
Asn	Ser	Asp	Cys	Tyr	Phe	Gly	Asn	Gly	Ser	Ala	Tyr	Arg	Gly	Thr	His	180	185	190
Ser	Leu	Thr	Glu	Ser	Gly	Ala	Ser	Cys	Leu	Pro	Trp	Asn	Ser	Met	Ile	195	200	205
Leu	Ile	Gly	Lys	Val	Tyr	Thr	Ala	Gln	Asn	Pro	Ser	Ala	Gln	Ala	Leu	210	215	220
Gly	Leu	Gly	Lys	His	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Asp	Ala	Lys	225	230	235
Pro	Trp	Cys	His	Val	Leu	Lys	Asn	Arg	Arg	Leu	Thr	Trp	Glu	Tyr	Cys	245	250	255
Asp	Val	Pro	Ser	Cys	Ser	Thr	Cys	Gly	Leu	Arg	Gln	Tyr	Ser	Gln	Pro	260	265	270
Gln	Phe	Arg	Ile	Lys	Gly	Gly	Leu	Phe	Ala	Asp	Ile	Ala	Ser	His	Pro	275	280	285
Trp	Gln	Ala	Ala	Ile	Phe	Ala	Lys	His	Arg	Arg	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	290	295	300
Phe	Leu	Cys	Gly	Gly	Ile	Leu	Ile	Ser	Ser	Cys	Trp	Ile	Leu	Ser	Ala	305	310	315
Ala	His	Cys	Phe	Gln	Glu	Arg	Phe	Pro	Pro	His	His	Leu	Thr	Val	Ile	325	330	335
Leu	Gly	Arg	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Pro	Gly	Glu	Glu	Glu	Gln	Lys	Phe	340	345	350
Glu	Val	Glu	Lys	Tyr	Ile	Val	His	Lys	Glu	Phe	Asp	Asp	Asp	Thr	Tyr	355	360	365
Asp	Asn	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Ser	Asp	Ser	Ser	Arg	Cys	370	375	380
Ala	Gln	Glu	Ser	Ser	Val	Val	Arg	Thr	Val	Cys	Leu	Pro	Pro	Ala	Asp	385	390	395
Leu	Gln	Leu	Pro	Asp	Trp	Thr	Glu	Cys	Glu	Leu	Ser	Gly	Tyr	Gly	Lys	405	410	415

- 48 -

His Glu Ala Leu Ser Pro Phe Tyr Ser Glu Arg Leu Lys Glu Ala His
420 425 430

Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser Arg Cys Thr Ser Gln His Leu Leu Asn
435 440 445

Arg Thr Val Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Thr Arg Ser Gly
450 455 460

Gly Pro Gln Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly
465 470 475 480

Pro Leu Val Cys Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu Val Gly Ile Ile
485 490 495

Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro Gly Val Tyr Thr
500 505 510

Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp Trp Ile Arg Asp Asn Met Arg Pro
515 520 525

<210> 20

<211> 12

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: sekvencia kódujúca SEGN

<400> 20

tctgagggaa ac

12

<210> 21

<211> 22

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 21

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15

Thr Val Ala Gln Ala Ala
20

<210> 22

<211> 42

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 22

gaggaggagg tggcccaggc ggcctctgag ggaaacagtg ac

42

<210> 23

<211> 42

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 23

gaggaggagc tggccggcct ggcccggtcg catgttgtca cg

42

<210> 24

<211> 26

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 24

acatgacgacc gtgacaggcc ggccag

26

<210> 25

<211> 26

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primer

<400> 25

ctggccggcc tgtcacggtc gcatgt

26

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Spôsob produkcie tkanivového plazminogénového aktivátora - tPA, tPA variantu, Kringle 2 serínovej proteázovej molekuly - K2S alebo K2S variantu, odvodených z rekombinantnej DNA, v prokaryotických bunkách, pričom tPa, tPA variant, K2S molekula alebo K2S variant sa vylučuje extracelulárne ako aktívny a správne poskladaný proteín, vyznačujúci sa tým, že prokaryotická bunka obsahuje a exprimuje vektor obsahujúci DNA kódujúcu tPA, tPA variant, K2S molekulu alebo K2S variant, operatívne spojenú s DNA kódujúcou signálny peptid OmpA.

2. Spôsob podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že prokaryotická bunka obsahuje a exprimuje vektor obsahujúci DNA kódujúcu tPA, tPA variant, K2S molekulu alebo K2S variant, operatívne spojenú s DNA kódujúcou signálny peptid OmpA, ktorá je operatívne spojená s nukleokyselinovou molekulou definovanou sekvenciou TCTGAGGGAAACAGTGAC (sekv. č. 1) alebo jej funkčným derivátom.

3. Spôsob podľa nároku 1 alebo 2, vyznačujúci sa tým, že prokaryotickou bunkou je *E. coli*.

4. Spôsob podľa jedného z nárokov 1 až 3, vyznačujúci sa tým, že sa uskutočňujú nasledujúce kroky:

- a) DNA kódujúca tPA, tPA variant, K2S molekulu alebo K2S variant sa amplifikuje prostredníctvom PCR;
- b) PCR produkt sa purifikuje;
- c) PCR produkt sa začlení do vektora obsahujúceho DNA kódujúcu OmpA signálny peptid a DNA kódujúcu gpIII takým spôsobom, aby bol PCR produkt operatívne napojený za DNA kódujúcu OmpA signálnu sekvenciu a pred DNA kódujúcu gpIII, v uvedenom vektore;
- d) stop kodón sa začlení medzi tPA, tPA variant, K2S molekulu alebo K2S variant a gpIII;
- e) vektor sa exprimuje v prokaryotickej bunke;

f) tPA, tPA variant, K2S molekula alebo K2S variant sa purifikuje.

5. Spôsob podľa jedného z nárokov 1 až 4, vyznačujúci sa tým, že vektorom je fagemidový vektor obsahujúci DNA kódujúcu OmpA signálny peptid a DNA kódujúcu gpIII.

6. Spôsob podľa jedného z nárokov 1 až 5, vyznačujúci sa tým, že vektorom je pComb3HSS fagemid.

7. Spôsob podľa jedného z nárokov 1 až 6, vyznačujúci sa tým, že DNA sekvencia OmpA, pripojená upstream ku K2S, obsahuje nasledujúcu sekvenciu alebo jej variant súvisiaci s degenerovaním nukleotidového kódu:

ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTG ...

8. Spôsob podľa jedného z nárokov 1 až 7, vyznačujúci sa tým, že DNA sekvencia OmpA obsahuje nasledujúcu sekvenciu:

ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGT
GGCCCAGGCGGCC (sekv. č. 3).

9. Spôsob podľa jedného z nárokov 1 až 8, vyznačujúci sa tým, že DNA sekvencia OmpA pozostáva z nasledujúcej sekvencie:

ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGT
GGCCCAGGCGGCC (sekv. č. 3).

10. Spôsob podľa jedného z nárokov 1 až 9, vyznačujúci sa tým, že pred DNA tPA, tPA variantu, K2S molekulu alebo K2S variantu sa nachádza lac promótor a/alebo ribozóm viažuce miesto.

11. Spôsob podľa jedného z nárokov 1 až 10, vyznačujúci sa tým, že DNA kódujúca tPA, tPA variant, K2S molekulu alebo K2S variant je vybraná zo skupiny DNA molekúl kódujúcich aspoň 90 % aminokyselín 87-527, 174-527,

180-527 alebo 220-527 ľudského tkanivového plazminogénového aktivátorového proteínu.

12. Spôsob podľa jedného z nárokov 5 až 11, vyznačujúci sa tým, že DNA sekvencia K2S obsahuje nasledujúci sekvenciu alebo jej funkčný variant alebo jej variant súvisiaci s degeneráciou nukleotidového kódu:

TCTGAGGGAAACAGTGA CTGCTACTTTGGGAATGGGTCAGC ...

13. Spôsob podľa jedného z nárokov 5 až 12, vyznačujúci sa tým, že DNA sekvencia K2S pozostáva z nasledujúcej sekvencie:

TCTGAGGGAAACAGTGA CTGCTACTTTGGGAATGGGTCAGC ...

14. DNA molekula, ktorá kóduje:

a) OmpA proteín operatívne spojený s

b) DNA molekulou kódujúcou polypeptid obsahujúci kringle 2 doménu a serínovú proteázovú doménu tkanivového plazminogénového aktivátorového proteínu.

15. DNA molekula podľa nároku 14, ktorá obsahuje nasledujúcu sekvenciu alebo variant súvisiaci s degeneráciou nukleotidového kódu:

ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGT ...

16. DNA molekula podľa nároku 14 alebo 15, ktorá obsahuje DNA sekvenciu pozostávajúcu z nasledujúcej sekvencie:

ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGT ...

17. DNA molekula podľa jedného z nárokov 14 až 16, kde DNA sekvencia b) kóduje aspoň 90 % aminokyselín 87-527 ľudského tkanivového plazminogénového aktivátorového proteínu.

18. DNA molekula podľa jedného z nárokov 14 až 17, kde DNA sekvencia b) kóduje aspoň 90 % aminokyselín 174-527 ľudského tkanivového plazminogénového aktivátorového proteínu.

19. DNA molekula podľa jedného z nárokov 14 až 18, kde DNA sekvencia b) kóduje aspoň 90 % aminokyselín 180-527 ľudského tkanivového plazminogénového aktivátorového proteínu.

20. DNA molekula podľa jedného z nárokov 14 až 19, kde DNA sekvencia b) kóduje aspoň 90 % aminokyselín 220-527 ľudského tkanivového plazminogénového aktivátorového proteínu.

21. DNA molekula podľa ktoréhokoľvek z nárokov 14 až 20, kde DNA sekvencia b) hybridizuje za prísnych podmienok s nasledujúcou sekvenciou:
TCTGAGGGAAACAGTGACTGCTACTTTGGGAATGGGTCAGCCT ...

22. DNA molekula podľa ktoréhokoľvek z nárokov 14 až 21, kde DNA sekvencia b) pozostáva z nasledujúcej sekvencie:
TCTGAGGGAAACAGTGACTGCTACTTTGGGAATGGGTCAGCCT ...

23. Fúzaný proteín OmpA a K2S, ktorý zahŕňa proteín s nasledujúcou aminokyselinovou sekvenciou:
MKKTAIAIAVALAGFATVAQAASEGNSDCYFGNGSAYRGTHSLTESGASCLPWNS
MILIGKVYTAQNPSAQUALGLGKHNYCRNPDGDAKPWCHVLKNRRLTWEYCDVPS
CSTCGLRQYSQPQFRIKGGLFADIASHPWQAAIFAKHRRSPGERFLCGGILISSCWI
LSAAHCFQERFPPHLLTVILGRTYRVVPGEESQKFEVEKYIVHKEFDDDDTYDNDIAL
LQLKSDSSRCAQESSVVRTVCLPPADLQLPDWTECELSGYGKHEALSPFYSERLK
EAHVRLYPSSRCTSQHLLNRTVTDNMLCAGDTRSGGPQANLHDACQGDSSGGPLV
CLNDGRMTLVGIISWGLGCGQKDVPGVYTKVTNYLDWIRDNMRPG (sekv. č. 8).

24. Fúzaný proteín OmpA a K2S podľa nároku 23, ktorý pozostáva z proteínu s nasledujúcou aminokyselinovou sekvenciou:
MKKTAIAIAVALAGFATVAQAASEGNSDCYFGNGSAYRGTHSLT ...

25. K2S proteín s nasledujúcou aminokyselinovou sekvenciou:
SEGNSDCYFGNGSAYRGTHSLTESGASCLPWNSMILIGKVYTAQ ...

26. Vektor, ktorý obsahuje DNA sekvenciu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 14 až 22.

27. Vektor podľa nároku 26, v ktorom sa pred uvedenou DNA sekvenciou nachádza lac promótor a ribozóm viažuce miesto.

28. Vektor pComb3HSS obsahujúci DNA podľa ktoréhokoľvek z nárokov 14 až 22, kde expresia gpIII proteínu je suprimovaná alebo inhibovaná deletovaním DNA molekuly kódujúcej gpIII proteín alebo stop kodónom umiestneným medzi génom kódujúcim polypeptid obsahujúci kringle 2 doménu a serínovú proteázovú doménu tkanivového plazminového aktivátorového proteínu a génom proteínu III.

29. Prokaryotická hostiteľská buka obsahujúca DNA molekulu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 14 až 22.

30. Prokaryotická hostiteľská bunka obsahujúca vektor podľa ktoréhokoľvek z nárokov 26 až 28.

31. *E. coli* hostiteľská buka obsahujúca DNA molekulu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 14 až 22.

32. *E. coli* hostiteľská bunka obsahujúca vektor podľa ktoréhokoľvek z nárokov 26 až 28.

33. Použitie DNA molekuly podľa ktoréhokoľvek z nárokov 14 až 22 alebo vektora podľa ktoréhokoľvek z nárokov 26 až 28 alebo hostiteľskej bunky podľa ktoréhokoľvek z nárokov 29 až 32 v spôsobe produkcie polypeptidu majúceho aktivitu tkanivového plazminogénového aktivátora.

34. Použitie podľa nároku 33, kde spôsobom je spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 13.

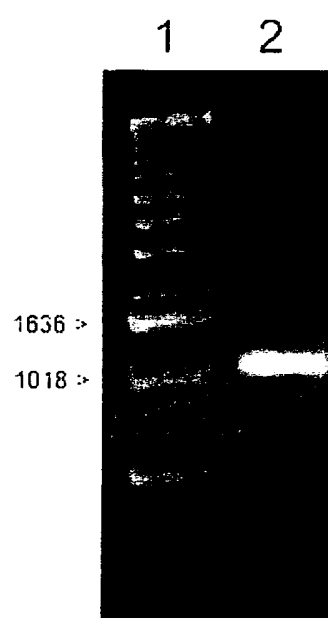


Fig 1

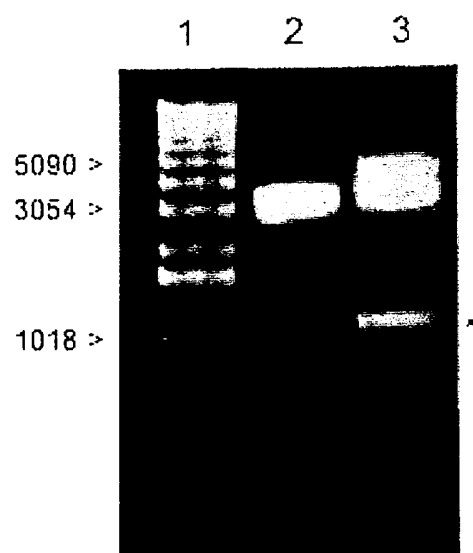


Fig 2

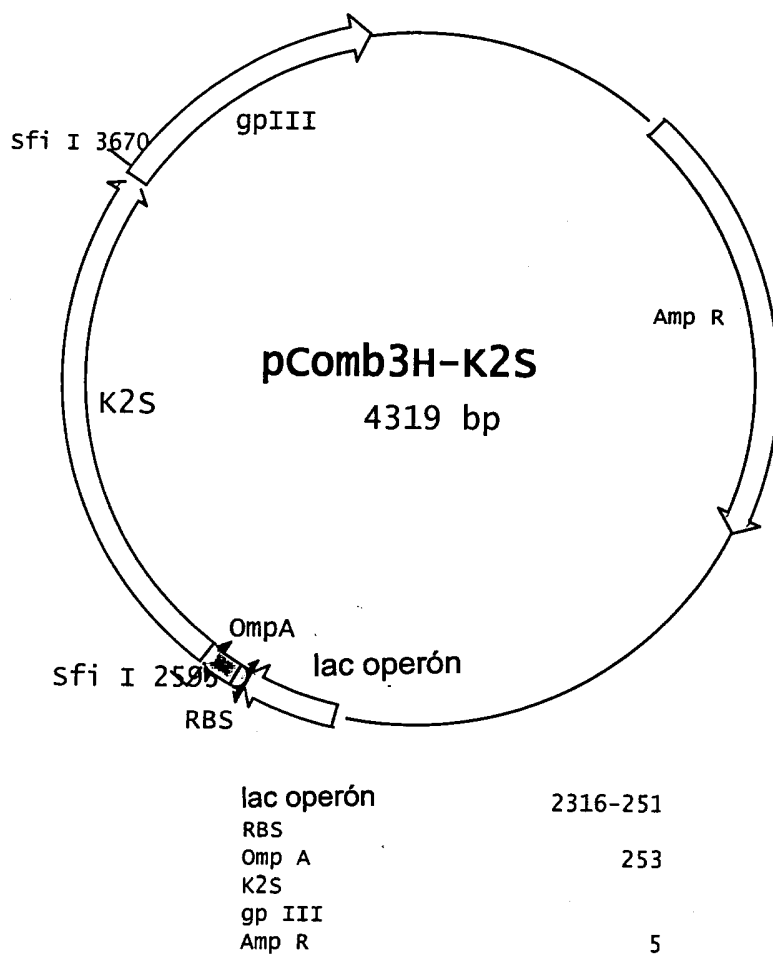


Fig. 3

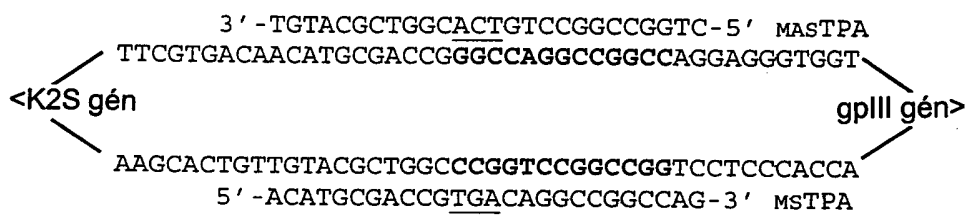
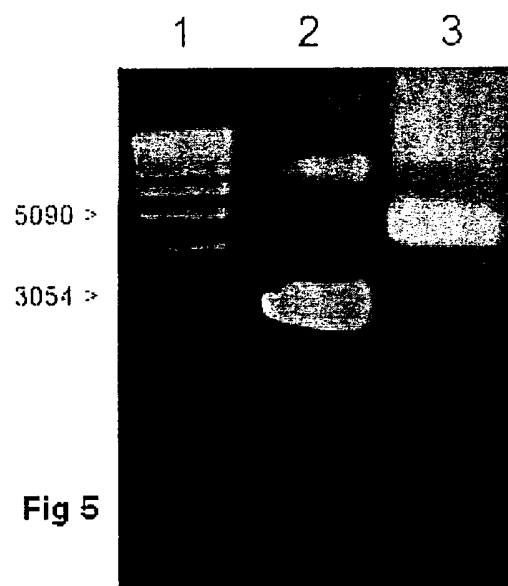


Fig. 4



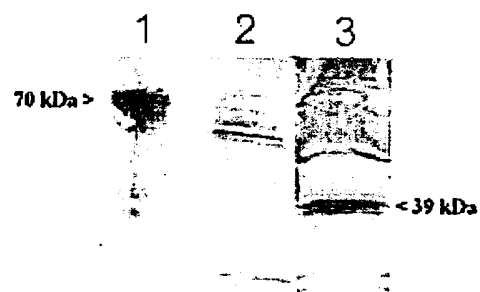
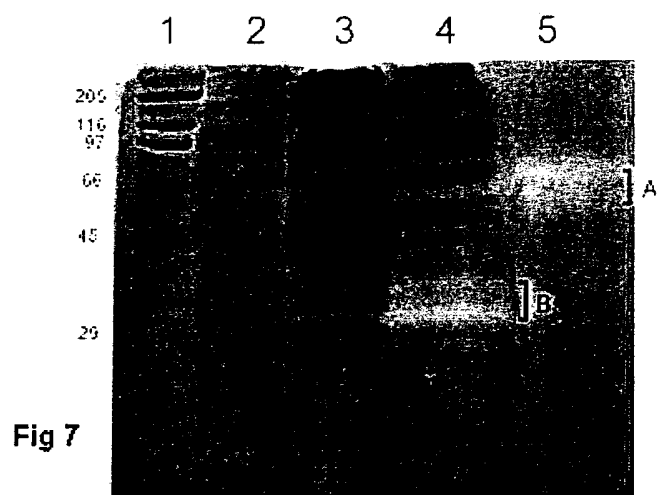


Fig 6



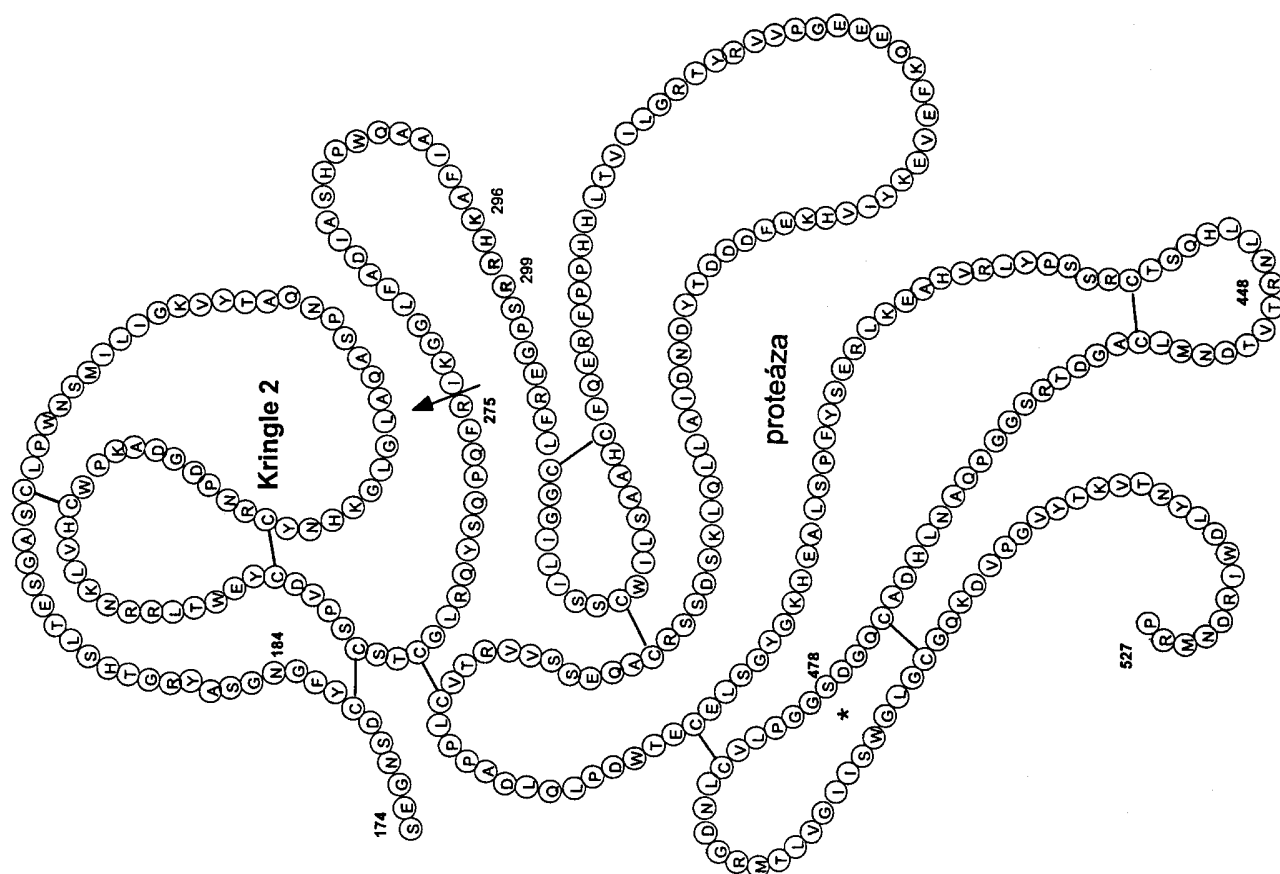


Fig. 8

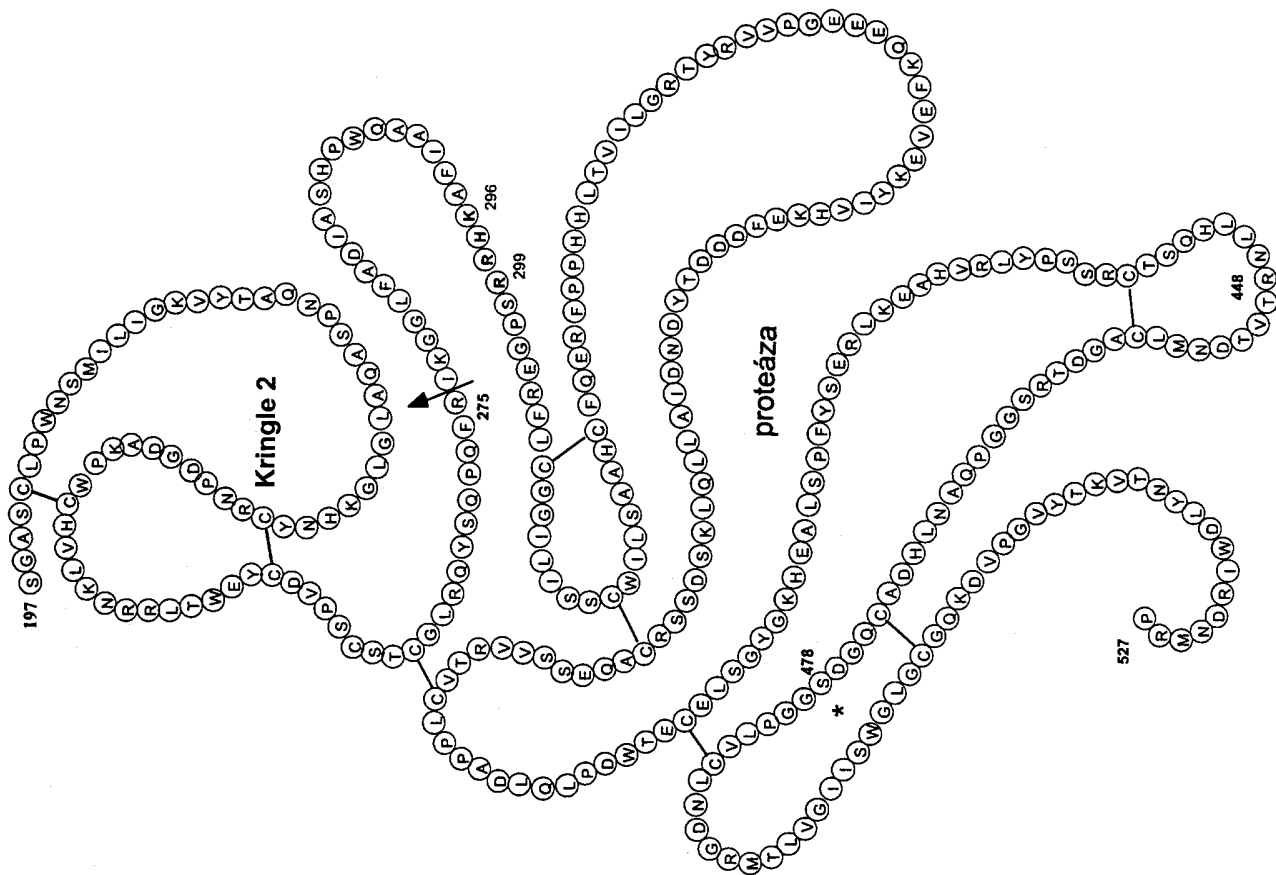


Fig. 9

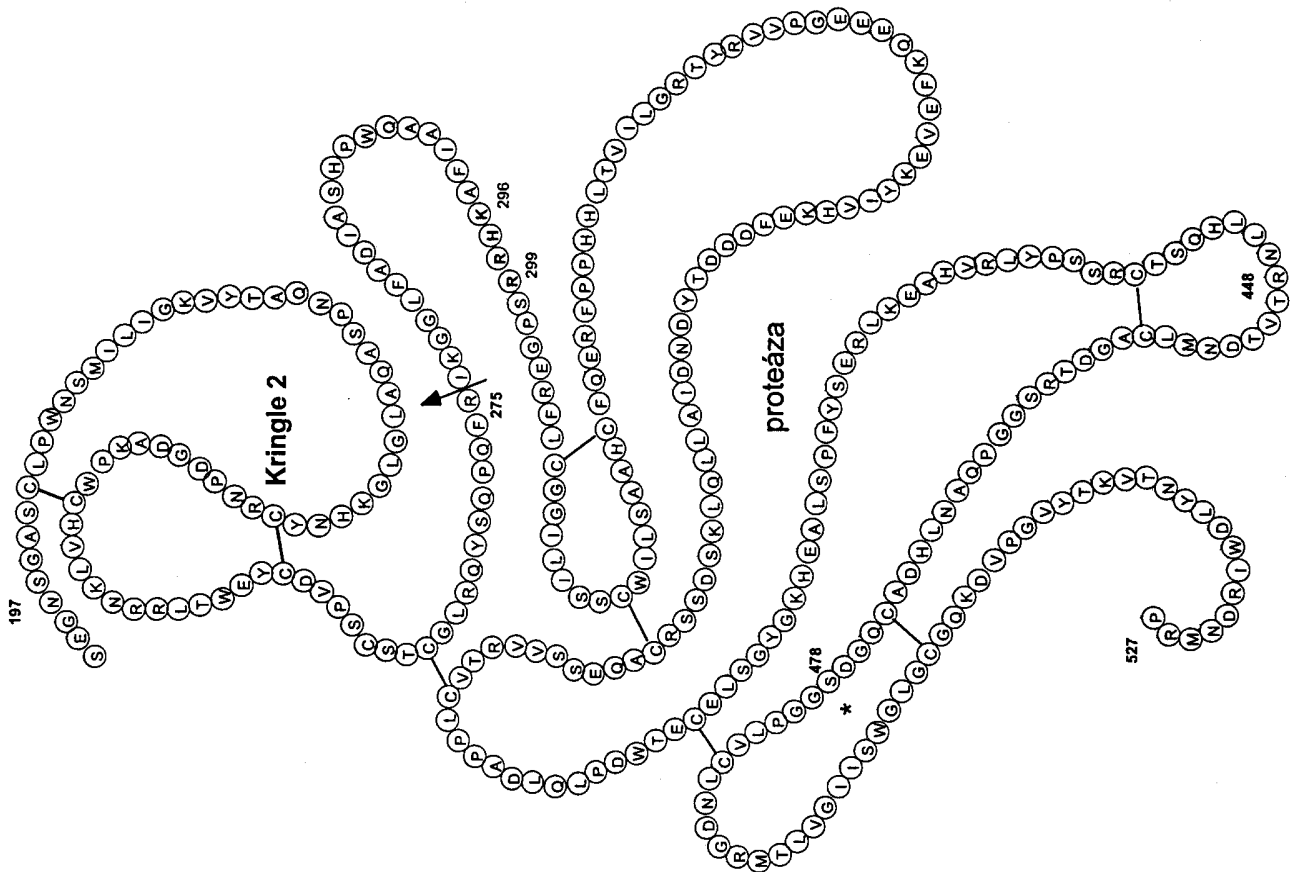


Fig. 10

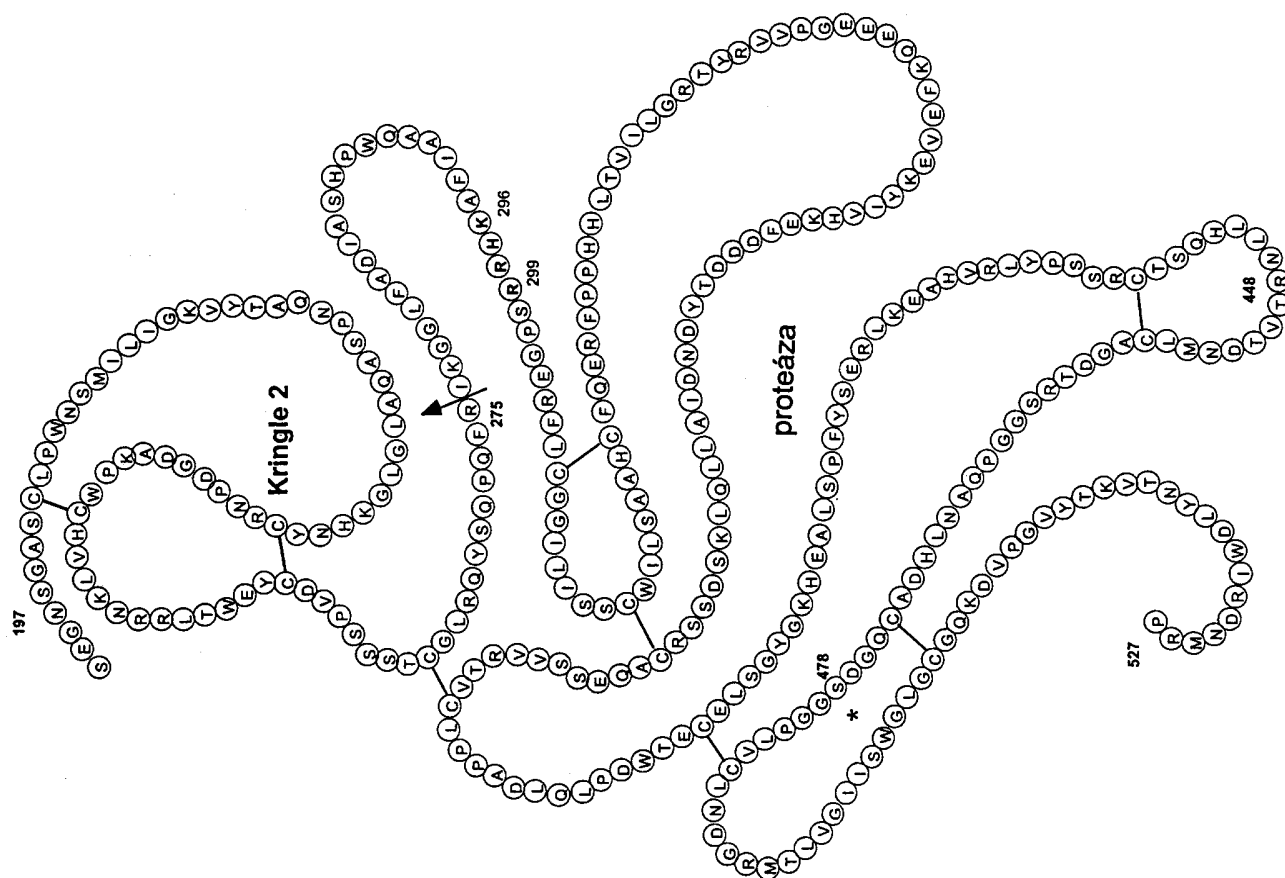
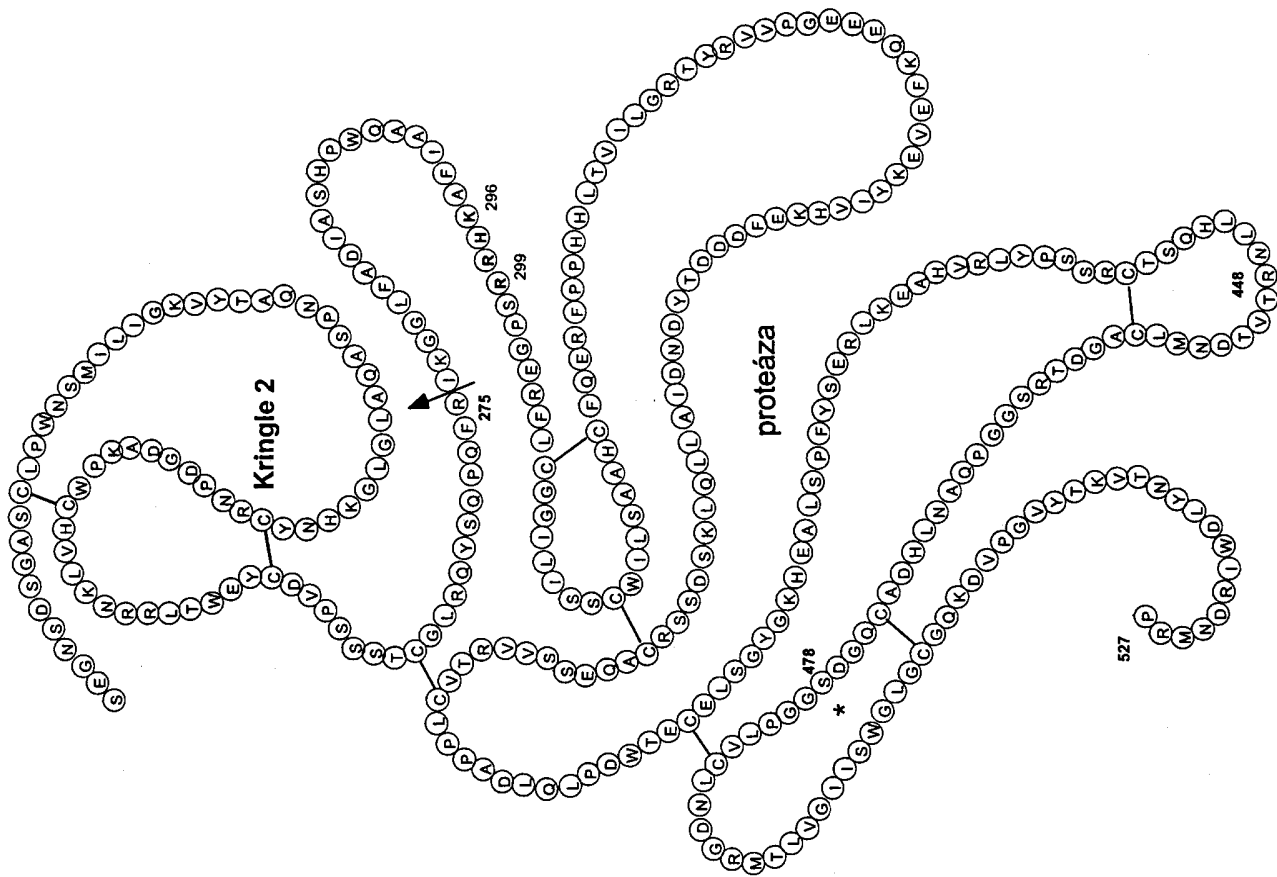


Fig. 11





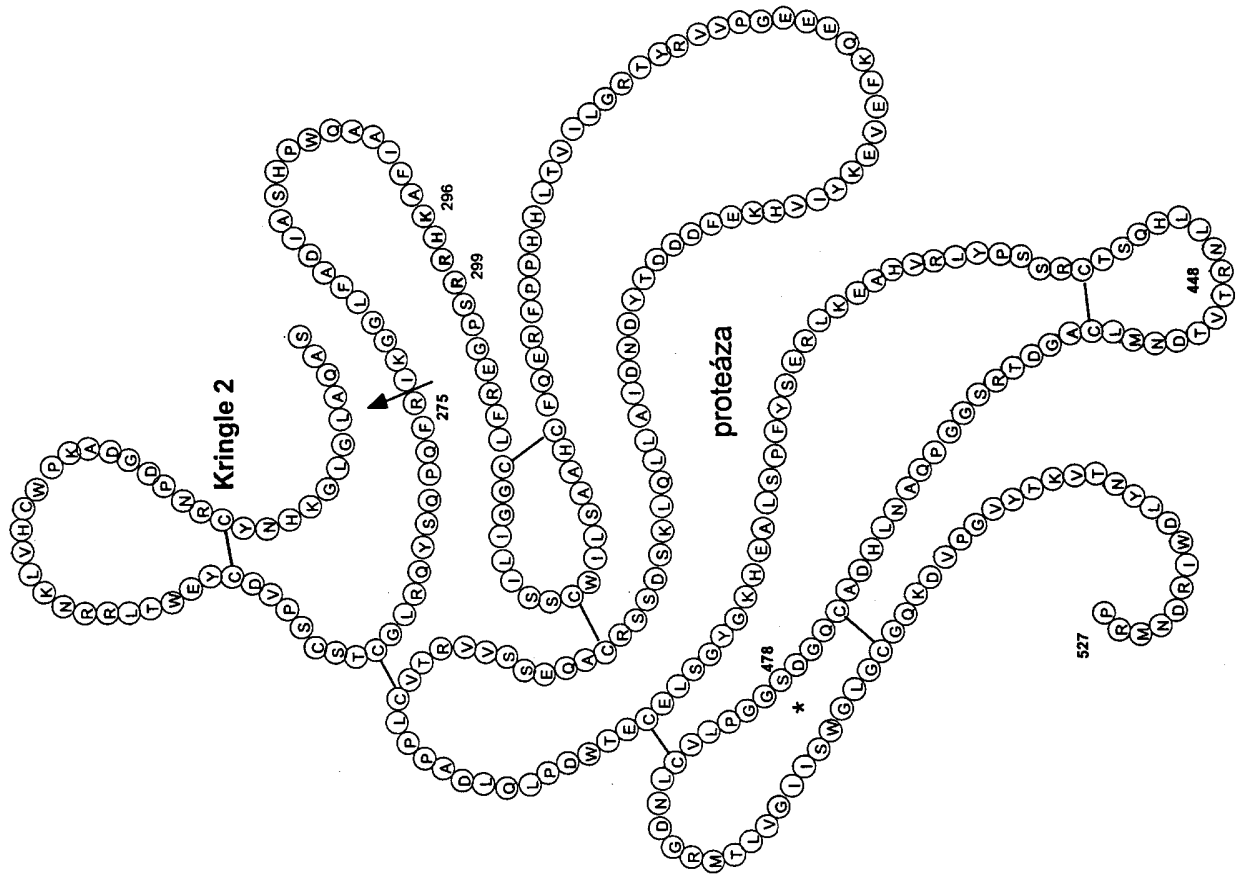


Fig. 14

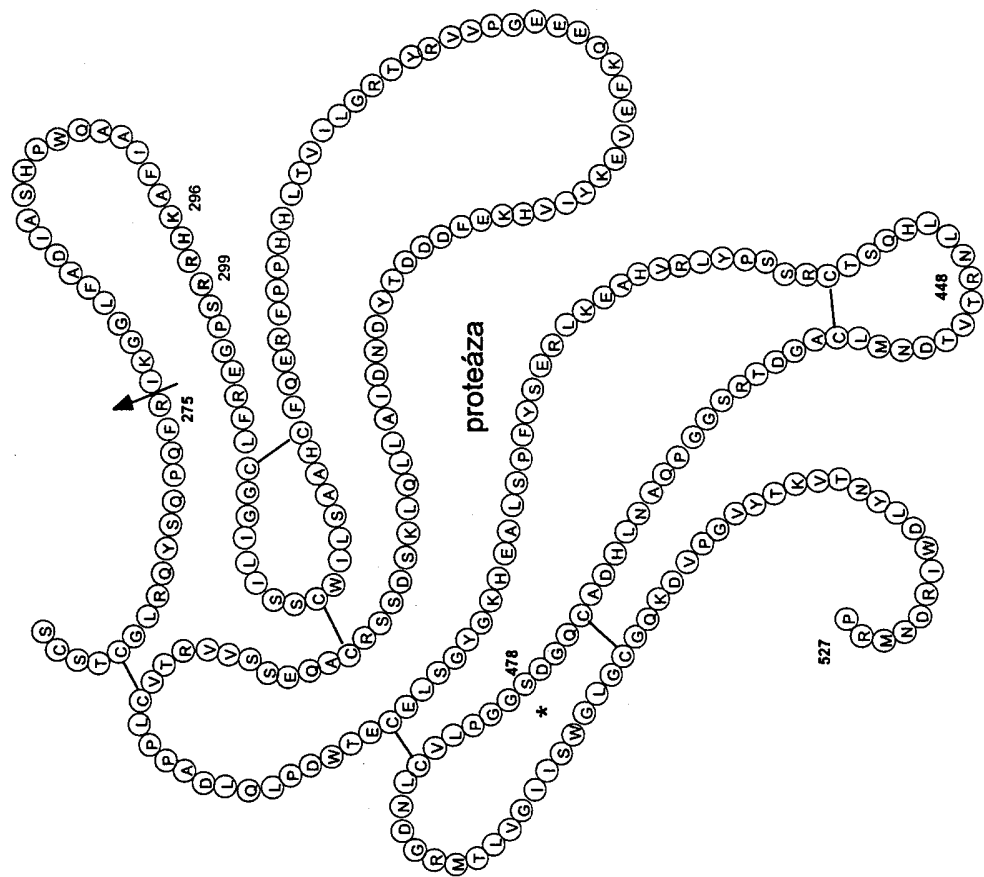


Fig. 15

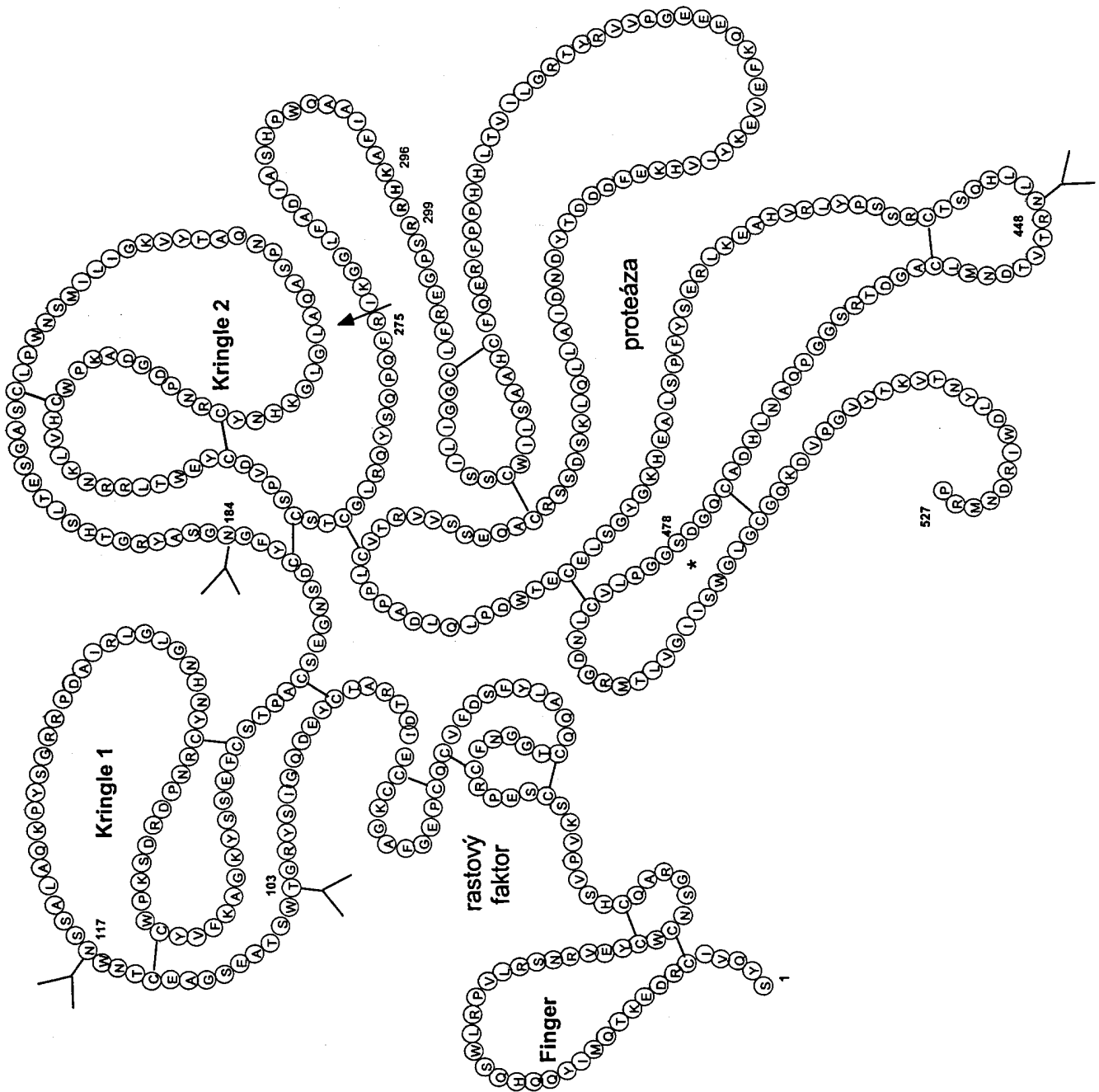


Fig. 16