

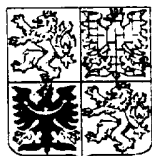
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

283 533

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **3764-92**

(22) Přihlášeno: **18. 12. 92**

(30) Právo přednosti:
02. 04. 92 EP 92/92810249

(40) Zveřejněno: **19. 01. 94**
(Věstník č. 1/94)

(47) Uděleno: **27. 02. 98**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **15. 04. 98**
(Věstník č. 4/98)

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N 15/28

C 12 P 21/02

C 07 K 14/00

A 61 K 38/00

(73) Majitel patentu:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG, Basle, CH;

(72) Původce vynálezu:

Lesslauer Werner, Riehen, CH;

Lötscher Hansruedi, Möhlin, CH;

Stüber Dietrich, Grenzach-Wyhlen, DE;

(74) Zástupce:

Hořejš Milan JUDr. ing. advokát, Národní
32, Praha 1, 11000;

(54) Název vynálezu:

**Mutein humánního faktoru nekrózy
nádoru, způsob jeho výroby,
farmaceutický prostředek na jeho bázi a
sekvence DNA, která jej kóduje**

(57) Anotace:

Mutein humánního faktoru nekrózy nádorů a jeho farmaceuticky vhodné soli, které vykazují selektivní vazebnou afinitu k humánnímu receptoru p55 nádorového nekrotického faktoru (hp55-TNF-R) a jejichž aminokyselinová sekvence humánního nádorového nekrotického faktoru je změněna přinejmenším v poloze 86, kde je přítomen threoninový zbytek místo serinového zbytku, způsob výroby tohoto muteinu a sekvence DNA, která jej kóduje.

CZ 283 533 B6

Mutein humánního faktoru nekrózy nádorů, způsob jeho výroby, farmaceutický prostředek na jeho bázi a sekvence DNA, která jej kóduje

5 Oblast techniky

Vynález se týká muteinu humánního nádorového nekrotického faktoru, způsobu jeho výroby, farmaceutického přípravku na jeho bázi, tohoto muteinu pro léčení chorob a sekvence DNA, která zahrnuje sekvenci DNA, která kóduje tento mutein.

10

Dosavadní stav techniky

15 Nekrotický faktor nádorů, či konkrétněji nádorový nekrotický faktor-alfa (TNF- α), je cytokin, který produkují zejména stimulované makrofágy. TNF- α vykazuje nejen pozoruhodnou cytotoxicitu vůči různým nádorovým buňkám [Carswell a další, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72, 3666 až 3670 (1975)], nýbrž hraje i mnohonásobnou úlohu jako mediátor zánětu a imunitní odpovědi [přehled lze nalézt v Beutler a Cerami, Ann. Rev. Immunol. 7, 625 až 655 (1989), Bonavista a Granger (red.) "Tumor Necrosis Factor: Structure, Mechanism of Action, Role in Disease and Therapy" Karger, Basilej (1990)]. Primární struktura humánního
20 nádorového nekrotického faktoru-alfa (hTNF- α) byla dedukována z nukleotidové sekvence cDNA, která byla klonována a exprimována v E. coli [Pennica a další, Nature 312, 724 až 729 (1984); Marmenout a další, Europ. J. Biochem. 152, 515 až 522 (1985); Wang a další, Science 228, 149 až 154 (1985); Shirai a další, Nature 313, 803 až 806 (1985)]. Zjistilo se, že existuje
25 pozoruhodná homologie aminokyselinové sekvence (30 %) mezi hTNF- α a humánním lymfotoxinem, který bývá často označován názvem humánní nádorový nekrotický faktor - beta (hTNF- β). hTNF- β je cytokin, který produkují hlavně lymfocyty [Gray a další, Nature 312, 721 až 724 (1984); Fiers a další, Cold Spring Harbour Symp. 51, 587 až 595 (1986)].

30 V dosavadním stavu techniky jsou také popsány látky hTNF- α s modifikovanou sekvencí aminokyselin, tzv. TNF- α -muteiny [(viz například Yamagishi a další Protein Engineering 3, 713 až 719 (1990), nebo Fiers v "Tumor Necrosis Factors: Structure, Function and Mechanisms of Action" Aggarwal a Vilcek (red.), Marcel Dekker Inc., New York - v tisku, nebo Fiers a další v Bonavista a Granger, str. 77 až 81 (viz výše)]. TNF- α -muteiny se staly také předmětem
35 několika patentových přihlášek, například mezinárodních patentových přihlášek, publikovaných pod čísly WO 86/02381, WO 86/04606, WO 88/06625, evropských patentových přihlášek, publikovaných pod čísly 155 549, 158 286, 168 214, 251 037 a 340 333, a německé zveřejněné patentové přihlášky DE-OS 3 843 534.

40 V dosavadním stavu techniky jsou také popsány muteiny lymfotoxinu, například v evropských patentových přihláškách, publikovaných pod čísly 250 000, 314 094 a 336 383.

Biologické účinky TNF jsou zprostředkovány specifickými receptory, totiž receptorem, který vykazuje zdánlivou molekulovou hmotnost 55 kD při elektroforéze na polyakrylamidovém gelu
45 s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE) (p55-TNF-R), a receptorem, který vykazuje zdánlivou molekulovou hmotnost 75 kD na SDS-PAGE (p75-TNF-R). Obě tyto formy receptorů TNF byly klonovány, totiž p55-TNF-R Loetscherem a dalšími [Cell 61, 351 až 359 (1990)] a p75-TNF-R, například Dembicem a dalšími [Cytokine 2, 53 až 58 (1990)] (oba tyto receptory jsou také
50 popsány v evropské patentové přihlášce č. 90116707.2). Nedávno se zjistilo, že oba tyto receptory vážou s vysokou afinitou nejen TNF- α , nýbrž také TNF- β [Shönfeld a další, J. Biol. Chem. 266, 3863 až 3869 (1991)].

Je dobře známo v tomto oboru, že na základě biologických účinností může být TNF- α cennou sloučeninou při léčbě různých chorob. Tak například se může TNF- α samotného nebo v kombinaci s interferonem používat jako účinného protinádorového činidla [Brouckaert a další, Int. J. Cancer 38, 763 až 769 (1986)]. Velkým omezením jeho širšího terapeutického využití je však jeho systemická toxicita [Taguchi T. a Sohmura Y., Biotherapy 3, 177 až 186 (1991)].

Bylo zjištěno, že u myši je humánní TNF- α (hTNF- α), který se váže pouze k menšímu myším TNF-receptoru (murinní p55-TNF-R), mnohem méně toxický než murinní TNF- α (mTNF- α), který se váže jak k p55-TNF-R, tak k p75-TNF-R. Tak například, u myši C57B16 činí hodnota LD₅₀ přibližně 10 μ g/myš u mTNF- α , a 500 μ g/myš u hTNF- α [Brouckaert a další, Agents and Actions 26, 196 až 198 (1989); Everaerd B. a další Biochem. Biophys. Res. Comm. 163, 378 až 385 (1989), Lewis M. a další. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 2830 (1991)]. Zdá se tedy, že p75-TNF-R hraje zvláštní úlohu při systemické toxicitě.

hTNF- α a mTNF- α se vážou přibližně stejně k humánnímu p55-TNF-R a humánnímu p75-TNF-R. Mutanty hTNF- α , které si zachovaly biologickou účinnost, zprostředkovanou hp55-TNF-R, ale které téměř ztratily všechnu účinnost, zprostředkovanou hp75-TNF-R, jsou však funkčními ekvivalenty hTNF- α v murinním systému a očekává se, že budou mít sníženou systemickou toxicitu u primátů.

Muteiny humánního nádorového nekrotického faktoru, které vykazují podstatný rozdíl mezi svou vazebnou afinitou k humánnímu receptoru p75 nádorového nekrotického faktoru (hp75-TNF-R) a k humánnímu receptoru p55 nádorového nekrotického faktoru (hp55-TNF-R), jsou popsány v evropské patentové přihlášce č. 91119128.6.

Podstata vynálezu

Nyní se zjistilo, že muteiny hTNF nebo jejich farma ceuticky vhodné soli, které mají aminokyselinovou sekvenci humánního nádorového nekrotického faktoru, změněnou přinejmenším v poloze 86 (kde je místo serinového zbytku přítomen threoninový zbytek), si zachovávají vazebnou aktivitu k hp55-TNF-R, ale téměř úplně ztratily všechnu vazebnou afinitu k hp75-TNF-R. Dále byly také nalezeny takové hTNF muteiny, které si zachovaly biologickou účinnost, zprostředkovanou hp55-TNF-R, ale již se nevážou k hp75-TNF-R. Muteiny hTNF podle vynálezu se neomezují na tento typ muteinu. Zahrnují také muteiny dalšího typu, které se sice vážou výlučně k hp55-TNF-R, ale které ztratily schopnost vyvolávat funkční odpověď buněk.

Předmětem tohoto vynálezu jsou muteiny humánního nekrotického faktoru a jejich farmaceuticky vhodné soli, které vykazují selektivní vazebnou afinitu k humánnímu receptoru p55 nádorového nekrotického faktoru (hp55-TNF-R) a jejichž aminokyselinová sekvence humánního nádorového nekrotického faktoru je změněna přinejmenším v poloze 86, kde je přítomen threoninový zbytek místo serinového zbytku.

Sekvence aminokyselin humánního TNF- α podle autorů a další (viz výše) vypadá takto:

```

1                               10
VAL ARG SER SER SER ARG THR PRO SER ASP LYS PRO VAL ALA HIS

                               20                               30
VAL VAL ALA ASN PRO GLN ALA GLU GLY GLN LEU GLN TRP LEU ASN

                               40
ARG ARG ALA ASN ALA LEU LEU ALA ASN GLY VAL GLU LEU ARG ASP

                               50                               60
ASN GLN LEU VAL VAL PRO SER GLU GLY LEU TYR LEU ILE TYR SER

                               70
GLN VAL LEU PHE LYS GLY GLN GLY GYS PRO SER THR HIS VAL LEU

                               80                               90
LEU THR HIS THR ILE SER ARG ILE ALA VAL SER TYR GLN THR LYS

                               100
VAL ASN LEU LEU SER ALA ILE LYS SER PRO CYS GLN ARG GLU THR

                               110                               120
PRO GLU GLY ALA GLU ALA LYS PRO TRP TYR GLU PRO ILE TYR LEU

                               130
GLY GLY VAL PHE GLN LEU GLU LYS GLY ASP ARG LEU SER ALA GLU

                               140                               150
ILE ASN ARG PRO ASP TYR LEU ASP PHE ALA GLU SER GLY GLN VAL

                               157
TYR PHE GLY ILE ILE ALA LEU

```

5 Tuto sekvenci zveřejnili také Marmenout a další (viz výše), Wang a další (viz výše) a Shirai a další a konkrétněji je pro maturovaný TNF α kódována nukleotidovou sekvencí vloženého plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNF α (viz obr. 1a a 1b a příklad I.

10 Muteiny hTNF, definované výše, mohou mít pozměněnu aminokyselinovou sekvenci hTNF v jedné nebo více přídavných polohách, přednostně v jedné nebo dvou přídavných polohách, přičemž přednostními polohami jsou zejména polohy 29, 31, 32, 29 a 32 nebo 31 a 32. V těchto přídavných polohách se může použít jakékoliv aminokyseliny, přednostně jakékoliv aminokyseliny, která se vyskytuje v přírodě. V případě substitucí v poloze 29 se dává přednost serinu, glycinu nebo tyrosinu, zejména serinu. V případě substitucí v poloze 31 se dává přednost kyselině glutamové nebo asparaginu. V případě substitucí v poloze 32 se dává přednost tyrosinu, tryptofanu nebo threoninu, přičemž obzvláště výhodný je tryptofan a threonin.

15 hTNF muteiny podle tohoto vynálezu mohou obsahovat další aminokyselinové substituce, pokud takové substituce nemění jejich selektivní vazebnou afinitu vůči p55-TNF-R. Aminokyselinové substituce v proteinech a polypeptidech, které v podstatě nemění biologickou aktivitu, jsou v tomto oboru známy a jsou například popsány v H. Neurath a R. L. Hill v "The Proteins" Academic Press. New York (1979), zejména na obr. 6, str. 14. Nejčastěji pozorované aminokyselinové substituce jsou:

```

Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr,
Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg,
Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly

```

a naopak, hTNF muteiny podle tohoto vynálezu mohou přídatně obsahovat sekvence několika aminokyselin, které jsou kódovány sekvencemi "linkeru". Tyto sekvence mohou vzniknout z expresních vektorů, použitých pro expresi hTNF muteinů, popsaných výše.

5 hTNF muteiny podle tohoto vynálezu mohou také obsahovat specifické sekvence, které se přednostně vážou k afinitnímu nosičovému materiálu. Jako příklady takových sekvencí je možno uvést sekvence, obsahující alespoň dva sousední histidinové zbytky (viz Evropská patentová přihláška, publikovaná pod číslem 282042). Tyto sekvence se selektivně vážou k pryskyřicím s niklovým chelátem nitrilotrioctové kyseliny (Hochuli a Döbeli, Biol. Chem. Hoppe-Seyler 368, 748 (1987); Evropská patentová přihláška, publikovaná pod číslem 253303). hTNF, které
10 obsahují takovou specifickou sekvenci, mohou být vázány buď k C-konci, nebo N-konci, nebo oběma těmito koncům aminokyselinové sekvence hTNF muteinu.

hTNF muteiny podle tohoto vynálezu je také možno spojovat s různými těžkými řetězci imunoglobulinu nebo lehkými řetězci polypeptidů. Tak vznikají chimerické hTNF mutein-
15 imunoglobulinové polypeptidy, které by mohly mít zvýšený poločas životnosti in vivo. Zvýšený poločas životnosti in vivo byl například demonstrován u chimerických polypeptidů, které se skládají z prvních dvou domén konstantních oblastí těžkého řetězce nebo lehkého řetězce savčího imunoglobulinu (viz Traunecker a další, Nature 331, 84 až 86 [1988] a Evropská
20 patentová přihláška, publikovaná pod číslem 394827).

hTNF muteiny je také možno spojovat s polymery, například polyethylenglykolem nebo polypropylenglykolem o molekulové hmotnosti 500 až 20 000 Dalton. To vede k chráněným
25 hTNF muteinovým látkám, které by mohly být v podstatě neimunogenní. K dispozici je a bylo popsáno několik způsobů spojování polymeru s polypeptidem (viz například US patent 4 179 337).

Z hTNF muteinů podle vynálezu se dává přednost zejména těmto látkám:

30 $\text{Thr}^{86}\text{-TNF}\alpha$, $\text{Ser}^{29}\text{-Thr}^{86}\text{-TNF}\alpha$, $\text{Glu}^{31}\text{-Thr}^{86}\text{-TNF}\alpha$, $\text{Trp}^{32}\text{-Thr}^{86}\text{-TNF}\alpha$, $\text{Ser}^{29}\text{-Trp}^{32}\text{-Thr}^{86}\text{-TNF}\alpha$ nebo $\text{Asn}^{31}\text{-Thr}^{32}\text{-Thr}^{86}\text{-TNF}\alpha$

hTNF muteiny podle tohoto vynálezu je možno vyrábět postupy, které jsou o sobě známé v tomto oboru a které jsou například popsány v Sambrook a další [Molecular Cloning.
35 A Laboratory Manual, druhé vydání, Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour Laboratory Press, USA (1989)] nebo v následujících odstavcích. Zda hTNF muteiny ještě vykazují selektivní vazebnou afinitu vůči p55-TNF-R, lze zjistit způsobem, popsaným v následujících příkladech. Alternativně je také možno hTNF muteiny podle tohoto vynálezu chemicky syntetizovat standardními postupy, které jsou známe v tomto oboru, přednostně
40 postupy v tuhém stavu, jako jsou postupy, popsané v Merrifield (J. Am. Chem. Soc. 85, 2149 až 2154 [1963]). Předmětem vynálezu jsou také soli těchto muteinů. Tyto soli je možno vyrábět o sobě známými způsoby.

Předpokládá se, že strategie, která spočívá v "odříznutí" prospěšných účinností $\text{TNF}\alpha$ od nežádoucích účinností, za použití sloučenin, které se specificky vážou k jednomu nebo druhému
45 TNF-receptoru, jako jsou hTNF muteiny podle tohoto vynálezu, je možno použít obecně i u jiných chorobných stavů, při nichž hraje TNF svou roli.

Předmětem vynálezu jsou také sekvence DNA, které obsahují sekvenci DNA, kódující výše
50 popsané hTNF muteiny. Tyto sekvence DNA je možno zkonstruovat z výchozích genomových nebo cDNA-sekvencí, kódujících hTNF, jak je to posáno v dosavadním stavu techniky (viz výše), za použití známých metod nebo mutagenéz in vitro (viz například Sambrook a další, 1989). Tato mutagenéza se může provádět náhodně za účelem získání velkého počtu mutantů,

5 které lze potom zkoušet na požadované vlastnosti za použití vhodných zkušebních systémů, místně orientovanou mutagenézí, t. j. mutagenézí, při níž dochází k mutaci definovaných poloh dané sekvence DNA [viz například Sambrook a další, 1989, 15, 51-15, 113], nebo mutagenézí za použití řetězové reakce, probíhající v přítomnosti polymerázy (viz například White a další, Trends in Genetics 5, 185 až 189 [1989]).

10 Jedním z chemických mutagenů, kterých se často používá pro náhodnou mutagenézi, je hydrogensířičitan sodný, kterým se převádí cytosinový zbytek na uracilový zbytek, čímž dochází k přechodu C na T (standardní zkratky nukleotidů) [Tento způsob je například popsán v publikaci Shortle a Nathans, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 2170 až 2174 (1978) nebo Pine a Huang, Meth. Enzym. 154, 415 až 430 (1987)]. Tento mutagen působí výhradně na

15 jednovláknovou DNA, zatímco exprese mutované cílové sekvence DNA se dosahuje za použití dvouvláknového plazmidového vektoru. Jednou možností, jak se vyhnout nutnosti provádět reklonování ve vektorech pro mutagenézi a expresi, je použití tzv. "phazmidů". Phazmidy jsou vektory, které kromě plazmidového počátku replikace nesou také počátek replikace, pocházející z vláknitého fágu. Jako příklady takových phazmidů je možno uvést pMa- pMc-phazmidy, které jsou popsány v publikaci Stanssen a další (Nucleic Acids Res. 17, 4441 až 4454 (1989)]. Za

20 použití tohoto exprimačního systému je možno zkonstruovat tzv. struktury "gap-duplex" [viz také Kramer a další Nucl. Acids Res. 12, 9441 až 9456 (1984)], v nichž je pouze sekvence kódující TNF (viz výše) v jednovláknové konfiguraci, a proto je dosažitelná pro specifický chemický mutagen. Struktury gap-duplex, kterých se má použít pro náhodnou mutagenézi, je možno konstruovat způsobem, popsaným pro výrobu takových struktur, které jsou určeny pro místně specifickou mutagenézi (Stanssen a další, viz výše), pouze s tím rozdílem, že (-) vlákno obsahuje

25 stejný gen aktivní odolnosti proti antibiotiku, jako (+) vlákno. Za použití různých restričních míst v sekvenci DNA, která kóduje hTNF α , je možno měnit šířku mezery ("gap"). Jako příklady takových restričních míst je možno uvést místa ClaI-SalI (470 nukleotidů), BstXI-BstXI (237 nukleotidů) nebo Styl-Styl (68 nukleotidů). Na takové konstrukty gap-duplex se potom může působit rostoucími koncentracemi (až do 4M) sířičitanu, načež se provede několik dialyzačních stupňů (Shortle a Natans, viz výše). Pomocí takových phazmidových konstruktů lze

30 potom transformovat vhodnou prokaryotickou hostitelskou buňku způsobem, který je o sobě známý (například Sambrook a další, viz výše uvedená publikace). Pod výrazem "vhodná prokaryotická hostitelská buňka" se v tomto kontextu rozumí hostitelská buňka, která nemá specifickou párovací funkci, takže uracilový zbytek zůstává v DNA zachován v průběhu replikace, přičemž tato hostitelská buňka je schopna exprimovat odpovídající mutovaný TNF.

35 Takové specifické hostitelské kmeny jsou v tomto oboru známy; z kmenů E. coli se například jedná o E. coli BW 313 [Kunkel. T. A. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 488 až 492 (1985)]. Pomocí vhodných zkušebních systémů se potom provede skrínig, za účelem nalezení klonů, které exprimují požadovaný hTNF mutein. Tak například je možno každou kolonii na mikrotitrové plotně inokulovat do vhodného média, obsahujícího relevantní antibiotikum. Buňky

40 je možno podrobit lyzi přidávkem lysozymu, po níž se provede několik cyklů zmrazování a tání. Po vysrážení nukleových kyselin a centrifugací se může supernatantu každé kolonie přímo použít při vhodných zkouškách, které jsou například popsány v příkladu IIa a IIb nebo příkladu VIII, při nichž se měří vazba k p75-TNF-R a p55-TNF-R na povrchu živých buněk nebo v přečištěné formě.

45 Je-li to žádoucí, mohou se specifická místa mutace stanovit například analýzou restričních fragmentů (viz například Sambrook a další, výše uvedená citace). Stanovením sekvence DNA těchto fragmentů je možno určit přesnou polohu mutace a pokud taková mutace vede k náhradě aminokyselin, je možno novou aminokyselinu odvodit ze stanovené sekvence DNA. DNA-sekvenování se může provádět způsobem, který je o sobě známý v tomto oboru, například za

50 použití T7 polymerázy na superhelix DNA, pomocí obchodně dostupné soupravy pro sekvenování (Pharmacia, Uppsala, Švédsko).

Jak již bylo uvedeno výše, další možností mutace dané sekvence DNA je místně orientovaná mutagenese. V širokém rozsahu používaná strategie pro tento typ mutagenese byla původně navržena Hutchinsonem a Edgellem (J. Virol. 8, 181 [1971]) a zahrnuje hybridizaci syntetického oligonukleotidu, nesoucího požadovanou substituci nukleotidu, k cílové oblasti jednovláknové sekvence DNA, do níž má být mutace zavedena [přehled je uveden například v Smith. Annual Rev. Genet. 19, 423 (1985)]. Zlepšené metody jsou uvedeny ve druhé až šesté citaci Stanssena a dalších (1989).

Jednou takovou přednostní metodou je metoda Stanssena a dalších (1989), při níž se používá "gapped duplex DNA", kterou původně popsali Kramer a další roku 1984 [viz výše uvedená citace a citace Kramer a Fritz. Methods in Enzymology, (1987), Academic Press Inc., USA], s tím rozdílem, že se pro selekci vlákna, obsahujícího mutaci, používá genů odolnosti proti antibiotikům místo funkčních genů M13, kromě plazmidové technologie, kterou také popsali Stanssen a další (1989) (viz výše uvedená citace). Výhodou tohoto postupu je také možnost provádět následné cykly mutagenese, aniž by bylo nutno přenášet gen do nového vektoru pro mutagenesi, druhé kolo mutagenese se liší pouze v selekci na jiný antibiotický marker (Stanssen a další, viz výše). Pro kontrolu lze použít místně specifické zpětné mutagenese mutantu na TNF divokého typu. Kromě toho, použití oligonukleotidu, který vytváří nebo ničí restrikční místo genu TNF, umožňuje kontrolovat mutant nejen hybridizací k oligonukleotidu, použitému pro místně orientovanou mutagenesi, nýbrž také na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti restrikčního místa. Pro vytvoření série hTNF muteinů, v nichž je v definované poloze jejich aminokyselinové sekvence aminokyselina divokého typu nahrazena jakoukoliv aminokyselinou, vyskytující se v přírodě, se používá série oligonukleotidů se všemi možnými kodony v definované poloze.

Jak již bylo uvedeno výše, další možností, jak mutovat danou sekvenci DNA, je mutagenese za použití řetězové reakce s polymerázou (PCR). Základy této metody jsou popsány v publikaci Whitea a dalších (1989), přičemž zlepšené postupy jsou například popsány v publikaci Innis a další (PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc., (1990)).

PCR je metoda in vitro, která se hodí pro výrobu velkých množství specifických fragmentů DNA o definované délce a sekvenci z malých množství templátové DNA. PCR je založena na enzymatické amplifikaci fragmentu DNA, lemovaného dvěma oligonukleotidovými primery, které se hybridizují k opačným vláknům cílové sekvence. Primery jsou orientovány tak, že jejich 3' konce směřují k sobě. Opakované cykly tepelné denaturace templátu, tepelné hybridizace primerů ke komplementárním sekvencím a prodlužování hybridizovaných primerů pomocí DNA polymerázy vedou k amplifikaci segmentu mezi 5' konce primerů PCR. Vzhledem k tomu, že produkt prodlužování každého primeru může sloužit jako templát pro další primer, v každém cyklu se v podstatě zdvojnásobí množství fragmentu DNA, produkovaného v předchozím cyklu. Vzhledem k tomu, že primery jsou fyzicky zabudovány do amplifikovaného produktu a chyby mezi 5' koncem primeru a templátem podstatně neovlivňují účinnost amplifikace, je možno pozměňovat amplifikovanou sekvenci zaváděním požadované mutace do amplifikované DNA. Za použití tepelně stálé Taq DNA polymerázy, izolované z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, je možno se vyhnout denaturaci polymerázy, která jinak vyžaduje přidavek enzymu po každém stupni tepelné denaturace. Tento vývoj vedl k automatizaci PCR za použití různých zařízení pro jednoduché cyklování teploty. Kromě toho, specifická reakce se zvyšuje tím, že se použije vyšších teplot pro hybridizaci primeru a prodlužování. Zvýšení specifické zlepšuje celkový výtěžek amplifikovaných produktů tím, že se minimalizuje konkurence necílových fragmentů o enzym a primery.

Navrhování a syntéza oligonukleotidů se mohou provádět způsobem známým v tomto oboru, který je například popsán v publikaci Sambrook a další (1989), nebo v některé z publikací, které byly uvedeny výše v souvislosti s místně orientovanou mutagenesí.

Jakmile se vytvoří sekvenční DNA kódující hTNF mutein podle tohoto vynálezu, je možno přistoupit k expresi pomocí phazmidové technologie, popsané výše, nebo pomocí jakéhokoliv jiného vhodného proubo eukaryotického expresního systému, dobře známého v tomto oboru (viz například Sambrook a další, výše uvedená citace).

5

Expres se přednostně provádí v prokaryotických buňkách, například *E. coli*. *Bacillus subtilis* apod., přičemž přednost se dává *E. coli*, zejména kmenům *E. coli* K12, například M15 [popsaným jako DZ 291, Villarejo a další v *J. Bacteriol* 120, 466-474 (1974)] , HB 101 [ATCC č. 33694] WK6 (Stranssens a další, viz výše), nebo *E. coli* SGI3009 [Gottesman a další *J. Bacteriol* 148, 265 až 273 (1981)]. Expres hTNF muteinů podle tohoto vynálezu se také může provádět v nižších nebo vyšších eukaryotických buňkách, jako jsou například kvasinkové buňky (jako *Saccharomyces* nebo *Pichia* atd.), vláknité houby (jako *Aspergillus* atd.), nebo buněčných liniích (jako jsou vaječnickové buněčné linie čínského křečka atd.), přičemž expresi v kvasinkových buňkách se dává přednost [viz Sreekrishna a další. *Biochem.* 28, 4117-4125 (1989); Hitzeman a další. *Nature* 293, 717 až 722 (1981); Evropská patentová přihláška publikovaná pod číslem 263311]. Expres hTNF muteinů podle tohoto vynálezu se v takových systémech může provádět buď intracelulárně, nebo po vhodné adaptaci genu také extracelulárně (viz Leemans a další, *Gene* 85, 99 až 108, 1989).

Vhodnými vektory pro použití při expresi v *E. coli* jsou například vektory, které uvádějí Sambrook a další ve výše uvedené citaci, nebo Fiers a další v "Proc. 8th Int. Biotechnology Symposium" [Soc. Franc. de Microbiol., Paříž (Durand a další red.), str. 680 až 697 (1988)], nebo konkrétněji vektory ze skupiny pDS [Bujard a další *Methods in Enzymology*, red. Wu a Grossmann. Academic Press. Inc, sv. 155, 416 až 433 (1987); Stüber a další, *Immunological Methods*, red. Lefkovits a Pernis. Academic Press. Inc., sv. IV 121 až 152 (1990)], jako například pDS56/RBSII, SphI-TNF α (Thr86) (viz příklad I), nebo pDS56/RBSII, SphI-TNF α (Trp32Thr86) (viz příklad III), nebo pDS56/RBSII, SphI-TNF α (Ser29Thr86) , pDS56/RBSII, SphI-TNF α (Ser29Trp32Thr86) , pDS56/RBSII, SphI-TNF α (Asn31Thr32Thr86), nebo pDS56/RBSII, SphI-TNF α (Glu31Thr86) (viz příklad IV).

35

40

45

50

Jelikož lze s těmito specifickými pDS56/RBSII-plazmidy díky jejich specifickým prvkům promotor/operátor a ribosomálním vazebným místům dosáhnout vysoké úrovně exprese, je možno tyto plazmidy udržovat v buňkách *E. coli* pouze za předpokladu, že je aktivita prvku promotor/operátor potlačena vazbou lac represoru k operátoru. Aktivitu promotoru je možno restaurovat při požadované hustotě buněk přidáním IPTG, který inaktivuje represor a uvolňuje promotor. Jelikož většina kmenů *E. coli* neposkytuje dostatek represorových molekul pro úplné potlačení funkce promotorových sekvencí, přítomných v těchto plazmidech s vysokým počtem kopií, takové kmeny *E. coli*, jako je *E. coli* M15 nebo SGI3009, je třeba transformovat nejprve plazmidem, jako je pREP4 (viz obr. 2a a 2b), kódujícím lac represor, před tím, než se provede jejich transformace specifickými pDS56/RBSII-plazmidy podle vynálezu. Teprve potom lze tyto plazmidy stabilně udržet v buňkách *E. coli*. Kromě toho, že pREP4 kóduje lac represor, obsahuje také oblast plazmidu pACYC184 [Chang a Cohen, *J. Bacteriol.* 134, 1141 až 1156 (1978)], která obsahuje všechny informace, potřebné pro replikaci a stabilní transmissi na dceřiné buňky [další informace lze také nalézt v "System for high level production in *E. coli* and rapid purification of recombinant proteins: Application to epitope mapping, preparation of antibodies and structure function analysis", Stüber a další, v *Immunological Methods*, sv. IV, str. 121 až 152, Lefkovitz a Pernis (red.), Academic Press, New York (1990)].

Transformace hostitelských buněk výše popsanými vektory se může provádět jakýmkoliv konvenčním postupem (viz například Sambrook a další, výše uvedená citace). Pokud je

hostitelská buňka prokaryotická, jako například *E. coli*, připravují se kompetentní buňky, které jsou schopny přijmout DNA z buněk, sklizených po exponenciální fázi růstu, a potom se zpracovávají známou metodou s chloridem vápenatým. Transformace se také může provést po vytvoření protoplastu hostitelské buňky, nebo jinými metodami, známými v tomto oboru, které jsou například popsány v publikaci Sambrooka a dalších (viz výše).

Hostitelské organismy, které obsahují požadovaný expresní vektor, se obvykle nechají růst za podmínek, které jsou pro jejich růst optimální. V případě prokaryotického hostitele se na konci exponenciálního růstu, kdy poklesne nárůst počtu buněk za časovou jednotku, vyvolá exprese požadovaného hTNF muteinu, tj. DNA, která kóduje požadovaný hTNF mutein, se transkribuje a provede se translace transkribované mRNA. Indukce se může provést přidáním induceru nebo derepresoru k růstovému médiu, nebo změnou fyzikálního parametru, například změnou teploty. V expresních vektorech, kterých se používá v přednostních provedení tohoto vynálezu, se exprese kontroluje lac represorem. Přídavkem isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosidu (IPTG) dojde k derepresi sekvence, kontrolující expresi, a tím se indukuje syntéza požadovaného hTNF muteinu.

hTNF muteiny podle tohoto vynálezu, produkované transformovanými hostitelskými buňkami, popsanými výše, se mohou izolovat z kultivačního média před nebo po otevření buněk a/nebo extrakci jakoukoliv vhodnou metodou, která je známá v chemii proteinů a peptidů, jako je například srážení síranem amonným, dialýza, ultrafiltrace, gelová filtrace nebo ionexová chromatografie, gelová elektroforéza, izoelektrická fokusace, afinitní chromatografie, jako je imunoafinitní chromatografie. HPLC apod. Jako konkrétní přednostní metody je možno uvést srážení síranem amonným a/nebo polyethyleniminem, dialýzu, afinitní chromatografii, například na fenylagaróze, konkrétně fenyl-sepharóze, nebo ionexovou chromatografii, konkrétně na MONO-O- a/nebo MONO-Smatrici (Pharmacia, Uppsala, Švédsko). Zvláště vhodnými jsou metody, popsané v Tavernier a další, *J. Mol. Biol.* 211, 493 až 501 (1990), a metody, popsané v příkladu V.

Předmětem vynálezu je tedy také způsob výroby hTNF muteinů, definovaných výše, který se vyznačuje tím, že se transformovaná hostitelská buňka, popsaná výše, kultivuje ve vhodném médiu a ze supernatantu kultury nebo samotné hostitelské buňky se izoluje mutein, načež se tento mutein popřípadě převádí na farmaceuticky vhodnou sůl. Předmětem vynálezu jsou také všechny sloučeniny, vyrobené tímto způsobem.

hTNF muteiny podle vynálezu jsou charakteristické tím, že vykazují selektivní vazebnou afinitu vůči lidskému p55-TNF-R. Tuto vlastnost lze stanovit jakoukoliv zkušební metodou, známou v tomto oboru, která se hodí pro měření vazebných afinit. Tak například vazbu samotného TNF a muteinů podle tohoto vynálezu je možno měřit za použití buněk v buněčné kultuře, které exprimují oba typy TNF-receptorů v odlišném stupni, jako jsou například buňky Hep-2, které výlučně exprimují lidské p55-TNF-R, a buňky U937 nebo HL60, které kromě toho exprimují také lidské p75-TNF-R [viz Brockhaus a další, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 87, 3127 až 3131 (1990); Hohmann a další, *J. Biol. Chem.* 264, 14927 až 14934, (1989); Loetscher a další (1990); Dembic a další (1990)]. Vazebné afinity je také možno stanovovat přímo za použití purifikovaného nativního nebo rekombinantního p55-TNF-R a p75-TNF-R, jak je to konkrétně popsáno v příkladech, nebo za použití odpovídajících rozpustných analogů těchto receptorů.

Pod označením "selektivní vazebná afinita pro receptor p55 lidského nekrotického nádorového faktoru" se v kontextu předloženého vynálezu rozumí rozdíl ve vazebné afinitě ke dvěma typům receptorů TNF, který je vzhledem k použitému zkušebnímu systému dostatečně signifikantní, aby bylo možno konstatovat, že se mutein podle vynálezu selektivně váže k p55-TNF-receptorům, podobně jako TNF divokého typu, přičemž však tento mutein v podstatě ztratil schopnost funkčně relevantní vazby k hp75-TNF-R. V kontextu zkušebního systému, kterého se

používá v příkladech, toto označení konkrétněji znamená, že hodnota K_D specifického hTNF muteinu podle vynálezu je 10x nebo víckrát (s výhodou alespoň asi 100x) vyšší než hodnota K_D TNF α divokého typu, při stanovení zkouškou vazby in vitro s rekombinantním rozpustným hp75-TNF-R, zatímco jeho hodnota K_D , stanovená zkouškou vazby in vitro s rekombinantním rozpustným hp55-TNF-R se neliší o více než dvojnásobek, ve srovnání s TNF α divokého typu. Je samozřejmé, že uváděné konkrétní hodnoty K_D mají sloužit pouze pro ilustrativní účely a v žádném rozsahu neomezují vynález.

hTNF muteiny podle tohoto vynálezu vykazují protinádorovou účinnost, kterou lze prokázat metodami, známými v tomto oboru.

hTNF muteiny je možno podávat samotné nebo v kombinaci s jednou nebo více přídavnými sloučeninami podle vynálezu ve formě farmaceuticky vhodných orálních, injekčních nebo topických přípravků. Při podávání se bude používat takových dávek, aby se u pacienta dosáhlo množství účinné sloučeniny, které je schopno účinně modifikovat biologickou funkci, kterou hTNF muteiny mají.

Dalším předmětem tohoto vynálezu jsou proto přípravky, obsahující hTNF muteiny podle tohoto vynálezu ve spojení s kompatibilními farmaceuticky vhodnými nosičovými látkami. Může se používat jakýchkoliv vhodných nosičových látek. Jako nosičové látky přicházejí v úvahu organické nebo anorganické látky, které se hodí pro enterální, perkutánní nebo parenterální podávání. Jako vhodné nosiče je možno uvést vodu, želatinu, arabskou gumu, laktózu, škrob, stearan hořečnatý, mastek, rostlinné oleje, polyalkylenglykoly, vazelinu apod. Farmaceutické přípravky mohou kromě toho obsahovat také jiné farmaceuticky účinné látky. V souladu s obvyklou praxí výroby farmaceutických přípravků je také možno přidávat další přísady, jako jsou ochucovadla, konzervační látky, stabilizátory, emulgátory, puify apod.

Farmaceutické přípravky je možno upravovat na jakékoliv obvyklé formy, včetně a) pevných forem pro orální podávání, jako jsou tablety, kapsle, pilule, prášky, granule apod.; b) kapalných forem pro orální podávání, jako jsou roztoky, sirupy, suspenze, elixíry apod.; c) přípravků pro parenterální podávání, jako jsou sterilní roztoky, suspenze nebo emulze; a d) přípravků pro topické podávání, jako jsou roztoky, suspenze, masti, krémy, gely, mikronizované prášky, aerosoly apod. Farmaceutické přípravky je možno sterilizovat a/nebo mohou obsahovat pomocné přísady, jako jsou konzervační látky, stabilizátory, smáčedla, emulgátory, soli pro změnu osmotického tlaku a/nebo puify.

Z parenterálních dávkovacích forem přicházejí v úvahu infuzní roztoky nebo injekční roztoky. Injekce je možno podávat intravenózně nebo intramuskulárně. Přípravky podle vynálezu mohou také obsahovat jiné terapeuticky účinné látky. V souladu s běžnou praxí farmaceutické výroby je také možno k nim přidávat konzervační látky, stabilizátory, emulgátory, puify apod.

Proti hTNF muteinům podle vynálezu je konečně možno vypěstovat protilátky. Těchto protilátek se může používat dobře známým způsobem k diagnostickým nebo terapeutickým účelům, jakož i k purifikačním účelům. Protilátky je možno získat tak, že se savcům nebo ptákům injikuje dostatečné množství vakcínového přípravku, obsahujícího hTNF mutein podle vynálezu, a kompatibilní farmaceutický nosič, aby se vyvolala produkce protilátek proti tomuto hTNF muteinu. Vhodné množství hTNF muteinu, kterého je v tomto případě zapotřebí, je odborníkům v tomto oboru známé, nebo je lze stanovit rutinním experimentováním. Pod označením "farmaceutický nosič", jak se ho používá v kontextu tohoto vynálezu, se rozumějí standardní látky, které je možno podávat lidem, nebo typické pomocné látky, používané v očkovacích látkách pro zvířata.

TNF je silným pleiotropickým cytokinem. Jeho četné různé účinnosti, jako je například účinnost růstového faktoru na imunní buňky, účinnost mediátoru při zánětech nebo účinnost induktoru specifických genů v endotheliu, je možno spatřovat v kontextu obrany hostitele vůči infekci a poranění. TNF také vykazuje vysokou systemickou toxicitu. Škodlivé účinky bakteriemie a septického šoku nebo bakteriální meningitis jsou do značné míry mediovány endogenními cytokiny, mezi nimiž hraje TNF časnou a důležitou úlohu. Kromě toho mnohé buňky a buněčné linie jsou citlivé vůči přímé cytotoxické účinnosti TNF. V protinádorové účinnosti TNF, jak vyplývá ze studií na zvířatech, se pravděpodobně spojují různé systemické účinky s celulární toxicitou.

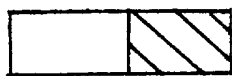
Tato fakta tvoří racionální základ pro vývoj nových terapeutických strategií za použití hTNF muteinů podle tohoto vynálezu. Při těchto strategiích se zejména plně využívá možnosti rozdělení mnoha různých účinností hTNF na žádoucí a nežádoucí. Jedním příkladem je použití hTNF muteinů podle tohoto vynálezu ve vysokých dávkách, jako protinádorových činidel, což je umožněno sníženou systemickou toxicitou těchto látek. Tak lze obejít striktní omezení dávky hTNF divokého typu při léčbě pacientů, trpících rakovinou, které je vnuceno vysokou toxicitou hTNF. Potenciální použití hTNF muteinů podle tohoto vynálezu se však neomezuje na léčbu rakoviny. Při léčbě jakékoliv choroby, při níž hraje TNF prospěšnou úlohu jako obranný faktor hostitele proti bakteriální infekci [viz například Kindler V. a další Cell 56, 731 až 740 (1989); Nakano Y. a další J. Immunol. 144, 1935 (1990)], nebo jako mediátor při zánětech, se může dosáhnout užitku za použití léčiva, které je specifické vůči receptorům 55kDa TNF typu, jako jsou hTNF muteiny podle tohoto vynálezu. Bylo již také ukázáno, že TNF má svou úlohu při kachexii [například Beutler B. a Cerami, viz výše uvedená publikace], a TNF muteinů podle tohoto vynálezu, které mají nízkou systemickou toxicitu, by bylo možno používat pro antiobezitní terapii. I při léčbě chorob, které jsou charakteristické toxickými účinnostmi nadměrného uvolňování TNF, které vedou k septickému šoku nebo bakteriální meningitis, se může dosáhnout užitku za použití 55kDa TNF receptor-specifických agonistů, jako jsou muteiny podle tohoto vynálezu, popřípadě v kombinaci s antagonisty TNF.

Obširný přehled nově se objevující role TNF při nových terapiích, při nichž je možno očekávat, že bude velmi výhodný specifický charakter TNF agonistů p55-receptorového typu, které mají sníženou systemickou toxicitu a jsou schopny spustit pouze některé z mnoha různých účinností TNF ve srovnání s TNF divokého typu, byl publikován v Tumor Necrosis Factors, The Molecules and their Emerging Role in Medicine, B. Beutler red. Raven Press, 1992, ISBN 0-88167-852-X. Tento přehled zahrnuje také využití účinnosti TNF při modulaci endotheliálních buněčných homeostatických vlastností a neurofilní adheze, ischemii tkání a poškození reperfuzí, při působení na osteoblasty a osteoklasty při resorpci kostí, při působení jako růstového faktoru obecně na mnohé tkáně a při hematopoiesi, jakož i při působení na metabolismus a výživu. Indukce specifických genů, zajišťujících mechanismy buněčné ochrany, jako je indukce Mn₂O₇-dismutázy, o níž je známo, že je pod kontrolou p55-TNF-R [Lewis a další Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 2830 (1991); Tartaglia a další Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 9292 (1991)], nebo přímá cytotoxicita TNF u některých buněk, to všechno poskytuje racionální základ pro nové možnosti terapeutických strategií za použití TNF agonistů, které specificky působí na určité receptory. Vlastnosti TNF, jakožto faktoru růstu/diferenciace při vytváření lymfokinem aktivovaných zabíječských buněk (LAK), zřejmě přispívají k protinádorovým účinnostem TNF.

Důležitým aspektem je, že všechny tyto účinnosti je možno posílit nebo modulovat kombinací s jinými rekombinantními cytokiny, jako je například interferon-gamma.

Vynález je podrobněji popsán v následujících příkladech provedení. Tyto příklady mají výhradně ilustrativní charakter a v žádném směru neomezuji rozsah vynálezu. V příkladech se používá odkazu na připojené obrázky.

Jsou zavedeny následující zkratky: Symboly B, E, H, S, Xb a X označují štěpicí místa pro restriční enzymy BglI, EcoRI, HindIII, Sall, XbaI a XhoI.



představuje regulovatelný prvek promotor/operá-

tor N25OPSN25OP29,



představuje syntetické ribosomální vazebné

místo RBSII, SphI,



představuje geny pro TNF α (TNF α), β -laktamázu

(bla), chloramfenikol acetyltransferasu (cat), lac represor (lacI) a neomycin fosfotransferasu (neo),



představuje transkripční terminátory t_0 fagu

lambda (t_0) a T1 rrnB operonu E. coli (T1),



představuje replikační oblasti plazmidů pBR322

a pREP4 (repl.)



představuje kódovací oblast pod kontrolou

N25OPSN25OP29 a RBSII, SphI.

5

Přehled obrázků na výkrese

10 Na obr. 1a je znázorněna schematická kresba plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNF α .

Na obr. 1b je uvedena úplná nukleotidová sekvence plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNF α . V této sekvenci jsou označeny sekvence, rozpoznané restričními enzymy z obr. 1a. Znázorněná aminokyselinová sekvence představuje v třípísmenovém kódu sekvenci maturovaného TNF α (157 aminokyselin).

15

Na obr. 2a je uvedena schematická kresba plazmidu pREP4.

Na obr. 2b je uvedena úplná nukleotidová sekvence plazmidu pREP4. V této sekvenci jsou označeny sekvence, rozpoznané restričními enzymy z obr. 2a.

20

Na obr. 3 je znázorněna příprava fragmentu EcoRI-HindIII, kódujícího TNF α muteiny Thr⁸⁶-TNF α .

Na obr. 4 je znázorněna nukleotidová sekvence fragmentu 1 plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNF α (Trp32).

Na obr. 5 je znázorněna nukleotidová sekvence fragmentu 1 plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNF α (Ser29).

Na obr. 6 je znázorněna nukleotidová sekvence fragmentu 1 plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNF α (Ser29Trp32).

Na obr. 7 je znázorněna kompetitivní vazba humánního TNF α divokého typu a Thr⁸⁶, Trp³²-Thr⁸⁶ a Ser²⁹-Trp³²-Thr⁸⁶ muteinů k rekombinantním humánním TNF receptorům p-75 a p-55.

Mikrotitrové plotny, povlečené rekombinantním humánním fúzovaným proteinem p-75TNF-R-IgGgamma3 (okénko A) a rekombinantním humánním fúzovaným proteinem p-55TNF-R-IgGgamma3 (okénko B), se inkubují s radioznačeným humánním TNF α za přítomnosti různých koncentrací TNF α divokého typu (plné kroužky), Thr⁸⁶ muteinu (prázdné kroužky), Trp³²-Thr⁸⁶ muteinu (prázdné čtverečky) a Ser²⁹-Trp³²-Thr⁸⁶ muteinu (prázdné trojúhelníčky). Po 3 hodinách při teplotě místnosti se stanovuje vázaná radioaktivita v počítači gamma rozpadů.

Na obr. 8 je znázorněna kompetitivní vazba humánního TNF α divokého typu a Ser²⁹-Thr⁸⁶, Glu³¹-Thr⁸⁶ a Asn³¹-Thr³²-Thr⁸⁶ muteinů k rekombinantním TNF receptorům p-75 a p-55.

Mikrotitrové plotny, povlečené rekombinantním humánním fúzovaným proteinem p-75TNF-R-IgGgamma3 (okénko A) a rekombinantním humánním fúzovaným proteinem p-55TNF-R-IgGgamma3 (okénko B), se inkubují s radioznačeným humánním TNF α za přítomnosti různých koncentrací TNF α divokého typu (plné kroužky), Ser²⁹-Thr⁸⁶ muteinu (prázdné kroužky), Asn³¹-Thr³²-Thr⁸⁶ muteinu (prázdné čtverečky) a Glu³¹-Thr⁸⁶ muteinu (prázdné trojúhelníčky). Po 3 hodinách při teplotě místnosti se stanovuje vázaná radioaktivita v počítači gamma rozpadů.

Pokud není uvedeno jinak, rozumí se pod procentickými údaji u pevných látek v pevných směsích údaje hmotnostní, u kapalných látek v kapalných směsích údaje objemové a u pevných látek v kapalných směsích údaje typu hmotnost/objem, které lze vynásobením deseti přepočítat na údaje g/l.

35

Příklady provedení vynálezu

Příklad I

40

Výroba Thr⁸⁶-TNF α

Plazmid pDS56/RBSII, SphI-TNF α

45

Humánní TNF α expresní plazmid pDS56/RBSII, SphI-TNF α (viz obr. 1) je zdrojem TNF α genu pro přípravu různých TNF α muteinů podle tohoto vynálezu. Transformovaný kmen E. coli M15 [pREP4;DS56/RBSII, SphI-TNF α] byl v souladu s Budapešťskou dohodou o ukládání mikroorganismů pro patentové účely uložen ve sbírce Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) v Brunschweigu. SRN, dne 8. září 1991 pod přírůstkovým číslem DSM 6713.

50

Mutagenese TNF α genu za použití PCR

Provedou se dvě PCR reakce s plazmidem pDS56/RBSII, SphI-TNF α (obr. 1), jako templátovou DNA, za použití soupravy Perkin-Elmer Cetus GeneAmp(R) DNA Amplification Reagent Kit s AmpliTaq(R) Recombinant Taq DNA Polymerase [viz obr. 3].

5

Reakce se provádí s primery 17/F (5'-GGCGTATCACGAGGCCCTTTTCG-3'; primer 17/F obsahuje nukleotidy 3949-3970 plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNF α), a 29/M22 (5'-GTAGGTGACGGCGATGCGGCTGATGGT-3'; primer 29/M22 obsahuje nukleotidy, které jsou komplementární vůči nukleotidům 378-352 plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNF α mutovaná báze je podtržena).

10

Reakce II se provádí s primery 29/MR1 (5'-CAGACCAAGGTCAACCTCCTC-3'; primer 29/MR1 obsahuje nukleotidy 379-399 plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNF α), a 17/O (5'-CATTACTGGATCTATCAACAGG-3'; primer 17/O obsahuje nukleotidy, které jsou komplementární vůči nukleotidům 748-727 plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNF α).

15

Při typickém experimentu 10 μ l templátu DNA (long), 5 μ l jednoho a 5 μ l druhého primeru (vždy 100 pmol), 16 μ l dNTP směsi (1,25 mM dATP, dGTP, dCTP a dTTP), 10 μ l 10x reakčního pufru (100 mM Tris-Hcl o pH 8,3, 500 mM chloridu draselného, 15 mM chloridu hořečnatého a 0,1 % želatiny), 1 μ l (5 jednotek), AmpliTaq^(R) DNA polymerázy a 53 μ l vody se smíchá v Eppendorfově trubici a překryje 80 ml minerálního oleje (Perkin-Elmer Cetus). Trubice se přenesou do termálního cyklovače pro DNA (TRIO-Thermoblock. Biometra), udržují 1 minutu při 94 °C, potom se provede 35 cyklů tavení DNA (1 minuta při 94 °C), hybridizace primerů (1 minuta při 50 °C) a prodlužování primerů (3 minuty při 72 °C). Po dalších dvou minutách při 72 °C se reakční směs ochladí na teplotu místnosti a extrahují chloroformem. DNA, která je přítomna ve vodné fázi, se srazí ethanolem a podrobí elektroforéze na 6% polyakrylamidovém gelu (Sambrook a další, 1989). Po obarvení DNA ethidiumbromidem se z gelu izolují fragmenty I a II (viz obr. 3) a přečistí (Sambrook a další, 1989).

20

25

30 Výroba DNA fragmentu, kódujícího Thr⁸⁶-TNF- α

Fragmenty I a II se enzymaticky fosforylují a potom vzájemně ligují (Sambrook a další, 1989). Provede se tepelná inaktivace ligázy a štěpení restričními enzymy EcORI a HindIII a DNA se podrobí elektroforéze na 6% polyakrylamidovém gelu. DNA se obarví ethidiumbromidem a v gelu se izoluje EcORI-HindIII fragment A (viz obr. 3), který se potom přečistí (viz výše).

35

Výroba plazmidu, kódujícího Thr⁸⁶-TNF- α

EcORI-HindIII fragment A se vsune standardními metodami [Sambrook a další 1989] do EcORI-HindIII otevřeného plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNF- α za vzniku plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNF- α (Thr86). Vyrobí se plazmidová DNA (Birnboim a další, 1979) a totožnost kódující oblasti pro TNF- α mutein se potvrdí sekvenováním dvouvláknové DNA (Sambrook a další, 1989).

40

45 Výroba Thr⁸⁶-TNF- α

Plazmid pDS56/RBSII, SphI-TNF- α (Thr86) se transformuje do buněk M15, které již obsahují plazmid pREP34, standardními metodami (viz výše). Transformované buňky se nechají růst při 37 °C v LB médiu (Sambrook a další, 1989), obsahujícím 100 mg/ml ampicilinu a 25 mg/l kanamycinu. Při dosažení optické hustoty asi 0,7 až 1,0 (při 600 nm) se přidá IPTG až do finální koncentrace 2 mM. Po dalších 2,5 až 5 hodinách při 37 °C se buňky sklídí odstředěním.

50

Příklad II

Výroba Glu³¹-TNF- α a Asn³¹Thr³²-TNF- α

5

Principy

10 TNF- α muteiny Glu³¹-TNF- α a Asn³¹Thr³²-TNF- α se vyrobí postupem, který je podrobně popsán v příkladu I pro případ výroby Thr⁸⁶-TNF- α . Proto jsou v popisu výroby TNF- α muteinů, uvedených výše, specifikovány pouze primery, použité při PCR reakci I a II. Kromě toho jsou uvedeny názvy expresních plazmidů, kódujících různé TNF- α muteiny.

Výroba Glu³¹-TNF- α

- 15 PCR reakce se provádí s primery 17/F (5'-GGCGTATCACGAGCCCTTTTCG-3'; primer 17/F obsahuje nukleotidy 3949 plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNF- α), a 21/M5 (5'-ATTGGCCCGCTCGTTCAGCCACTGGAGCTGCCCCCTC-3'; primer 21/M5 obsahuje nukleotidy, které jsou komplementární vůči nukleotidům 219-184 plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNF- α , mutovaně báze jsou podtrženy. PCR reakce II se provádí s primery 21/MR (5'-GCCCTCCTGGCCAATGGCGTGG-3'; primer 21/MR obsahuje nukleotidy 220-241 plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNF- α), a 17/O (5'-CATTACTGGATCTATCAACAGG-3', primer 17/O obsahuje nukleotidy, které jsou komplementární vůči nukleotidům 748-727 plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNF- α).
- 25 Výsledného expresního plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNF- α (Glu31) se použije pro produkci Glu³¹-TNF- α a při konstrukci plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNF- α (Glu31Thr86) (viz příklad IV).

Výroba Asn³¹Thr³²-TNF- α

30

- PCR reakce se provádí s primery 17/F (5'-GGCGTATCACGAGGCCCTTTTCG-3'; primer 17/F obsahuje nukleotidy 3949-3970 plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNF- α), a 21/M6 (5'-ATTGGCAGTGTGTTTCAGCCACTGGAGCTGCCCCCTC-3'; primer 21/M6 obsahuje nukleotidy, které jsou komplementární vůči nukleotidům 219-184 plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNF- α , mutované báze jsou podtrženy. PCR reakce se provádí s primery 21/MR (5'-GCCCTCCTGGCCAATGGCGTGG-3'; primer 21/MR obsahuje nukleotidy 220-241 plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNF- α), a 17/O (5'-CATTACTGGATCTATCAACAGG-3'; primer 17/O obsahuje nukleotidy, které jsou komplementární vůči nukleotidům 748-727 plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNF- α).

40

Výsledného expresního plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNF- α (Asn31Thr32) se použije na produkci Asn³¹-Thr³²-TNF- α a při konstrukci plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNF- α (Asn31Thr32Thr86) (viz příklad IV)

45

Příklad III

Výroba Trp³²Thr⁸⁶-TNF- α

Principy

Pro výrobu $\text{Trp}^{32}\text{Thr}^{86}\text{-TNF-}\alpha$ se zkonstruuje expresní plazmid pDS56/RBSII, SphI-TNF- α (Trp32Thr86), kterého se potom použije pro $\text{Trp}^{32}\text{-Thr}^{86}\text{-TNF-}\alpha$ v E. coli.

Konstrukce plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNF- α (Trp32Thr86)

Všechny expresní plazmidy, popsané v příkladech I a II, obsahují stejná dvě místa pro restriční enzym BglI, jako plazmid pDS56/RBSII, SphI-TNF- α (viz obrázek 1). Jedno z těchto míst je umístěno v β -laktamázovém genu, zatímco druhé je umístěno v TNF- α genu. Toto druhé místo rozděluje kódující oblast pro TNF- α na dvě části: jedna část kóduje aminokyseliny 1 až 36 TNF- α , zatímco druhá část kóduje aminokyseliny 37 až 157 TNF- α (viz obr. 1b).

Při konstrukci plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNF- α (Trp32Thr86) se standardními metodami (Sambrook a další, 1989) vyrobí fragmenty DNA 1 a 2. Fragment 1 (sekvence jsou uvedeny na obr. 4) je malý BglI fragment plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNF- α (Trp32) s regulovatelnou promotorovou a kódující oblastí pro $\text{Trp}^{32}\text{-TNF-}\alpha$ až do aminokyseliny 36. Fragment 2 je velký BglI fragment plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNF- α (Thr86) s kódující oblastí pro $\text{Thr}^{86}\text{-TNF-}\alpha$, počínaje aminokyselinou 37 a replikační oblastí plazmidu. Fragment 1 se liguje s enzymaticky defosforylovaným fragmentem 2 (Sambrook a další, 1989) za vzniku plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNF- α (Trp32Thr86).

M15(pREP4;pDS56/RBSII, SphI-TNF- α (Trp32)) buňky byly uloženy v souladu s Budapešťskou dohodou o ukládání mikroorganismů pro účely patentového řízení ve sbírce Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) v Braunschweigu, SRN, 19. listopadu 1990 pod přírůstkovým číslem DSM 6241.

Produkce $\text{Trp}^{32}\text{Thr}^{86}\text{-TNF-}\alpha$

Plazmid pDS56/RBSII, SphI-TNF- α (Trp32Thr86) se transformuje do buněk E. coli M15, které již obsahují plazmid pREP4, standardními metodami. Transformované buňky se nechají růst při 37 °C v LB médiu (Sambrook a další, 1989), obsahujícím 100 mg/ml ampicilinu a 25 mg/l kanamycinu. Při dosažení optické hustoty asi 0,7 až 1,0 (při 600 nm) se přidá IPTG až do finální koncentrace 2 mM. Po dalších 2,5 až 5 hodinách při 37 °C se buňky sklídí odstředěním.

Příklad IV

Výroba $\text{Ser}^{29}\text{Thr}^{86}\text{-TNF-}\alpha$. $\text{Ser}^{29}\text{Trp}^{32}\text{Thr}^{86}\text{-TNF-}\alpha$. $\text{Glu}^{31}\text{Thr}^{86}\text{-TNF-}\alpha$ a $\text{Asn}^{31}\text{Thr}^{32}\text{Thr}^{86}\text{-TNF-}\alpha$

Principy

TNF- α muteiny $\text{Ser}^{29}\text{Thr}^{86}\text{-TNF-}\alpha$. $\text{Ser}^{29}\text{Trp}^{32}\text{Thr}^{86}\text{-TNF-}\alpha$. $\text{Glu}^{31}\text{Thr}^{86}\text{-TNF-}\alpha$ a $\text{Asn}^{31}\text{Thr}^{32}\text{Thr}^{86}\text{-TNF-}\alpha$ se vyrobí způsobem, který je podrobně popsán v příkladu III pro případ výroby $\text{Trp}^{32}\text{Thr}^{86}\text{-TNF-}\alpha$. Proto jsou v popisu výroby TNF- α muteinů, uvedených výše, specifikovány pouze fragmenty DNA, odpovídající fragmentu 1 z příkladu III. Dále jsou zde uvedeny názvy expresních plazmidů, kódujících různé TNF- α muteiny.

Výroba Ser²⁹Thr⁸⁶-TNF-α

Fragment 1 (sekvence jsou na obr. 5) je malý BglI fragment plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNF-α (Ser29) s regulovatelnou promotorovou a kódující oblastí pro Ser²⁹-TNF-α až do aminokyseliny 36. Fragment 1 se liguje s enzymaticky defosforylovaným fragmentem 2 (viz příklad 3) (Sambrook a další, 1989) za vzniku plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNFα(Ser29Thr86), kterého se potom použije pro produkci Ser²⁹Thr⁸⁶-TNF-α v E. coli.

M15 (pREP4;pDS56/RBSII, SphI-TNF-α(Ser29)) buňky byly uloženy v souladu s Budapešťskou dohodou o ukládání mikroorganismů pro účely patentového řízení ve sbírce Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) v Braunschweigu, SRN, 19. listopadu 1990 pod přírůstkovým číslem DSM 6240.

Výroba Ser²⁹Trp³²Thr⁸⁶-TNFα

Fragment 1 (sekvence jsou na obr. 6) je malý bglI fragment plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNFα(Ser29Trp32) s regulovatelnou promotorovou a kódující oblastí pro Ser²⁹Trp³²-TNFα až do aminokyseliny 36. Fragment 1 se liguje s enzymaticky defosforylovaným fragmentem 2 (viz příklad III) (Sambrook a další, 1989) za vzniku plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNFα-(Ser29Trp32Thr86), kterého se potom použije pro produkci Ser²⁹Trp³²Thr⁸⁶-TNFα v E. coli.

Výroba Glu³¹Thr⁸⁶-TNFα

Fragment 1 je malý BglI fragment plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNFα(Glu31) s regulovatelnou promotorovou a kódující oblastí pro Glu³¹-TNFα až do aminokyseliny 36. Fragment 1 se liguje s enzymaticky defosforylovaným fragmentem 2 (viz příklad III) (Sambrook a další, 1989) za vzniku plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNFα(Glu31Thr86), kterého se potom použije pro produkci Glu³¹Thr⁸⁶-TNFα v E. coli.

Výroba Asn³¹Thr³²Thr⁸⁶-TNFα

Fragment 1 je malý BglI fragment plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNFα(Asn31Thr32) s regulovatelnou promotorovou a kódující oblastí pro Asn³¹Thr³²-TNFα až do aminokyseliny 36. Fragment 1 se liguje s enzymaticky defosforylovaným fragmentem 2 (Sambrook a další, 1989) za vzniku plazmidu pDS56/RBSII, SphI-TNFα(Asn31Thr32Thr86), kterého se potom použije pro produkci Asn³¹Thr³²Thr⁸⁶-TNFα v E. coli.

Příklad V

Purifikace humánních TNFα muteinů

Jeden litr noční kultury buněk E. coli, které byly transformovány a indukovány výše popsaným způsobem, se izoluje centrifugací a potom resuspenduje ve 20 ml 50mM Tris, pH 7,2, 200mM chloridu draselného, 50mM chloridu hořečnatého a 5% glycerolu. Buňky se rozbíjí ve Francouzském lisu za tlaku 137,4 MPa. Po vyčerpání centrifugací (70 000 x g, 30 min, 4 °C) se přidá pevný síran amonný až do výsledné koncentrace 30 %. Roztok se 1 hodinu míchá při teplotě místnosti a potom se 20 minut odstředí při 10 000 x g a teplotě 4 °C. Supernatant se přefiltruje přes filtr s póry 0,45 μm a koncentrace síranu amonného v něm se upraví na 70 %. Vysrážené proteiny se odstředí, rozpustí ve 20 ml 20mM Tris o pH 9,0 a roztok se dialyzuje proti stejnému pufru přes noc při 4 °C. Vzorek dialyzovaného produktu o objemu 1 ml se nanese na sloupec MonoQ (HR 5/5, LKB-Pharmacia), který je ekvilibrován ve 20mM Tris o pH 9,0. Eluce

se provádí lineárním gradientem chloridu sodného (0 až 400mM ve 20mM Tris o pH 9,0) při průtokové rychlosti 0,5 ml/min. Zachycené frakce o objemu 0,5 ml se analyzují na přítomnost TNF α muteinů elektroforézou na polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE). Pozitivní frakce se spojí, dialyzují proti 20mM 2-morfolinethansulfonové kyselině (MES) o pH 6,0 a nanesou na sloupec MonoS (HR 5/5, LKB-Pharmacia), ekvilibrovaný ve 20mM MES o pH 6,0. Proteiny se eluují lineárním gradientem chloridu sodného (0 až 400mM ve 20mM MES o pH 6,0) při průtokové rychlosti 0,5 ml/min. V rozmezí od 250mM do 350mM roztoku chloridu sodného se eluují různé TNF α muteiny ve formě elektroforeticky čistých proteinů. Po dialýze proti roztoku chloridu sodného, pufovanému fosfátem (PBS), se stanoví koncentrace proteinu pomocí stanovení proteinů BCA (Pierce Chemical Company) za použití humánního TNF α divokého typu jako standardu.

Příklad VI

Kompetitivní vazba humánního TNF α a muteinů k rekombinantním humánním receptorům p75-TNF-R a p55-TNF-R

Pro zkoušku kompetitivní vazby se mikrotitrové plotny povlečou rekombinantními fúzovanými proteiny humánní p75-TNF-R-humánní IgGgamma3 a humánní p55-TNF-R-humánní IgGgamma3, rozpuštěnými v PBS na koncentraci 0,3 μ g/ml a 0,1 μ g/ml (100 μ l/jamka, přes noc při 4 °C) [Loetscher H. a další J. Biol. Chem. 266, 18324 až 18329 (1991); Lesslauer W. a další, Eur. J. Immunol. 21, 2883 až 2886 (1991)]. Po blokování blokovacím puforem (50mM Tris, pH 7,4; 140mM chlorid sodný; 5mM kyselina ethylendiamintetraoctová, 0,02% azid sodný, 1% netučné sušené mléko) se mikrotitrové plotny opláchnou PBS a inkubují s 10 ng/ml humánního 125I-TNF α , značeného Iodogenovou metodou (Pierce Chemical Company), až do dosažení aktivity asi 30 μ Ci/ μ g, za přítomnosti různých koncentrací muteinů. Objem činí 100 μ l/jamka a každá koncentrace se zkouší 3 x. Po 3 hodinách při teplotě místnosti se jamky důkladně opláchnou PBS a stanoví se radioaktivita v počítací gamma rozpadů.

PATENTOVÉ NÁROKY

5

1. Mutein humánního faktoru nekrózy nádorů, vykazující selektivní vazebnou afinitu k humánnímu receptoru p55 faktoru nekrózy nádorů, v němž je aminokyselinová sekvence humánního faktoru nekrózy nádorů

10

```

1                               10
VAL ARG SER SER SER ARG THR PRO SER ASP LYS PRO VAL ALA HIS

                               20                               30
VAL VAL ALA ASN PRO GLN ALA GLU GLY GLN LEU GLN TRP LEU ASN

                               40
ARG ARG ALA ASN ALA LEU LEU ALA ASN GLY VAL GLU LEU ARG ASP

                               50                               60
ASN GLN LEU VAL VAL PRO SER GLU GLY LEU TYR LEU ILE TYR SER

                               70
GLN VAL LEU PHE LYS GLY GLN GLY GYS PRO SER THR HIS VAL LEU

                               80                               90
LEU THR HIS THR ILE SER ARG ILE ALA VAL SER TYR GLN THR LYS

                               100
VAL ASN LEU LEU SER ALA ILE LYS SER PRO CYS GLN ARG GLU THR

                               110                               120
PRO GLU GLY ALA GLU ALA LYS PRO TRP TYR GLU PRO ILE TYR LEU

                               130
GLY GLY VAL PHE GLN LEU GLU LYS GLY ASP ARG LEU SER ALA GLU

                               140                               150
ILE ASN ARG PRO ASP TYR LEU ASP PHE ALA GLU SER GLY GLN VAL

                               157
TYR PHE GLY ILE ILE ALA LEU

```

změněna alespoň v poloze 86, kde je přítomen threoninový zbytek místo serinového zbytku, a jeho farmaceuticky vhodné soli.

15

2. Mutein podle nároku 1, v němž je sekvence aminokyselin změněna v jedné nebo více přídatných polohách, přednostně v jedné nebo dvou přídatných polohách, a jeho farmaceuticky vhodné soli.

20

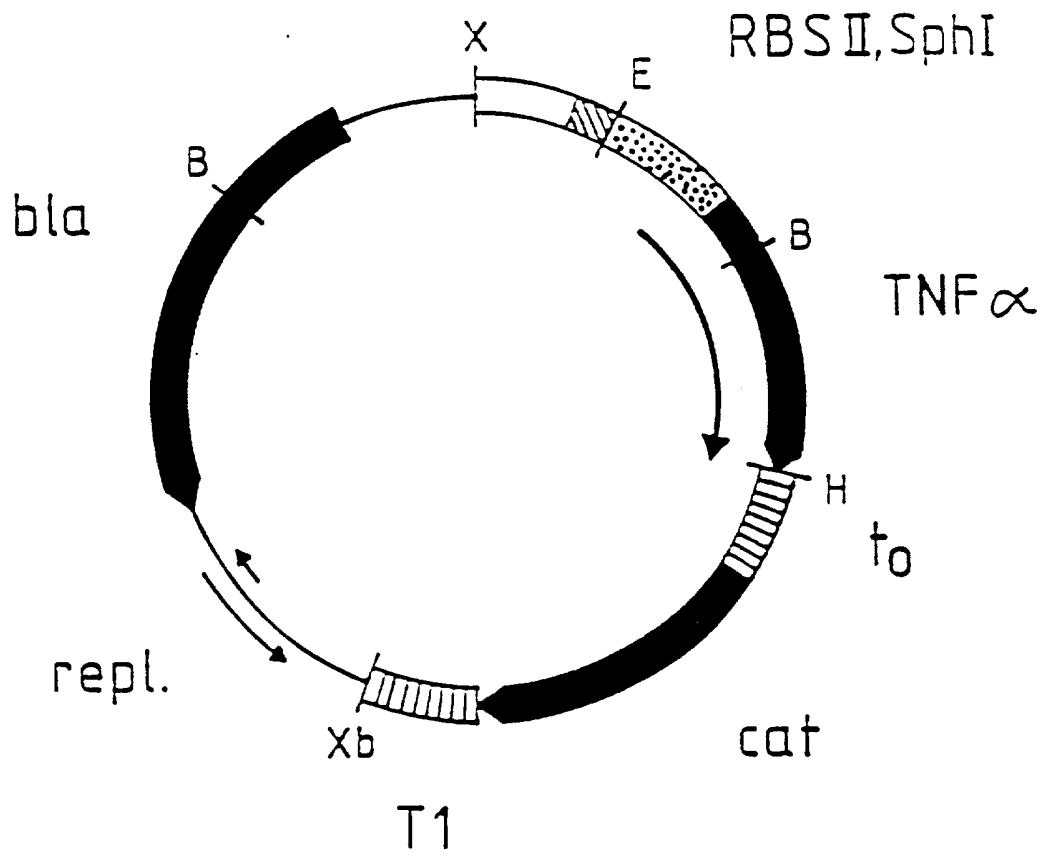
3. Mutein podle nároku 2, v němž je sekvence aminokyselin změněna v polohách 29 a 86; 31 a 86; 32 a 86; 29, 32 a 86; a 31, 32 a 86, a jeho farmaceuticky vhodné soli.

4. Mutein podle nároků 1 až 3, zvolený ze souboru, zahrnujícího $\text{Thr}^{86}\text{-TNF}\alpha$, $\text{Ser}^{29}\text{-Thr}^{86}\text{-TNF}\alpha$, $\text{Glu}^{31}\text{-Thr}^{86}\text{-TNF}\alpha$, $\text{Trp}^{32}\text{-Thr}^{86}\text{-TNF}\alpha$, $\text{Ser}^{29}\text{-Trp}^{32}\text{-Thr}^{86}\text{-TNF}\alpha$ nebo $\text{Asn}^{31}\text{-Thr}^{32}\text{-Thr}^{86}\text{-TNF}\alpha$, a jeho farmaceuticky vhodné soli.
- 5 5. Sekvence DNA, která zahrnuje sekvenci DNA, kódující mutein podle některého z nároku 1 až 4.
6. Mutein podle některého z nároků 1 až 4 pro léčení chorob.
- 10 7. Způsob výroby muteinu podle některého z nároků 1 až 4, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se kultivují hostitelské buňky ve vhodném médiu a ze supernatantu kultury nebo samotných hostitelských buněk se izoluje mutein a tento mutein se popřípadě převede na svou farmaceuticky vhodnou sůl.
- 15 8. Farmaceutický přípravek, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje alespoň jeden mutein podle některého z nároků 1 až 4, popřípadě v kombinaci s přídatnými farmaceuticky vhodnými látkami a/nebo netoxickými, inertními, terapeuticky vhodnými nosičovými látkami.

20

15 výkresů

N250PSN250P29



Obr. 1b

XhoI

1 CTGAGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TCACAATTAT

EcoRI

51 AATAGATTCA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAG

101 AGGAGAAATT AAGCATGGTC AGATCATCTT CTCGAACCCC GAGTGACAAG
 Val ArgSerSerS erArgThrPr oSerAspLys
 1 11

151 CCTGTAGCCC ATGTTGTCCG GAACCTCAA GCTGAGGGGC AGCTCCAGTG
 ProValAlaH isValValAl aAsnProGln AlaGluGlyG lnLeuGlnTr
 21

BglI

201 GCTGAACCGC CGGGCCAATG CCTCTCTGGC CAATGGCGTG GAGCTGAGAG
 pLeuAsnArg ArgAlaAsnA laLeuLeuAl aAsnGlyVal GluLeuArgA
 31 41

251 ATAACCAGCT GGTGGTGCCA TCAGAGGGCC TGTACCTCAT CTACTCCAG
 spAsnGlnLe uValValPro SerGluGlyL euTyrLeuIl eTyrSerGln
 51 51

301 GTCTCTTCA AGGGCCAAGG CTGCCCCCTCC ACCCATGTGC TCCTCACCCA
 ValLeuPheL ysGlyGlnGl yCysProSer ThrHisValL euLeuThrHi
 71

351 CACCATCAGC CGCATCGCCG TCTCTTACCA GACCAAGGTC AACCTCTCTT
 sThrIleSer ArgIleAlaV alSerTyrGl nThrLysVal AsnLeuLeuS
 81 91

401 CTGCCATCAA GAGCCCCCTGC CAGAGGGAGA CCCCAGAGGG GGCTGAGGCC
 erAlaIleLy sSerProCys GlnArgGluT hrProGluGl yAlaGluAla
 101 111

451 AAGCCCTGGT ATGAGCCCAT CTATCTGGGA GGGGTCTTCC AGCTGGAGAA
 LysProTrpT yrGluProIl eTyrLeuGly GlyValPheG lnLeuGluLy
 121

501 GGGTGACCGA CTCAGCGCTG AGATCAATCG GCCCCACTAT CTCGACTTTG
 sGlyAspArg LeuSerAlaG luIleAsnAr gProAspTyr LeuAspPheA
 131 141

551 CCGAGTCTGG GCAGGTCTAC TTTGGGATCA TTGCCCTGTG AGGAGGACGA
 laGluSerGl yGlnValTyr PheGlyIleI leAlaLeu
 151 157

601 ACATCCAACC TTCCCAACG CTTCCCTGCG CCCAATCCCT TTATTACCCC

651 CTCCTTCAGA CACCCTCAAC CTCTTCTGGC TCAAAAGAG AATTGGGGGC

HindIII

701 TTAGGGTCGG AACCCAAGCT TGGACTCCTG TTGATAGATC CAGTAATGAC

751 CTCAGAACTC CATCTGGATT TGTTTCAGAAC GCTCGGTTCG CCCCCGGCGT

Ohr. 1b (pokr.)

801 TTTTATTTGG TGAGATCCA AGCTAGCTTG GCGAGATTTT CAGGAGCTAA
 851 GGAAGCTAAA ATGGAGAAAA AAATCACTGG ATATACCACC GTTGATATAT
 901 CCCAATGGCA TCGTAAAGAA CATTTCAGG CATTTCAGTC AGTTGCTCAA
 951 TGTACCTATA ACCAGACCGT TCAGCTGGAT ATTACGGCCT TTTTAAAGAC
 1001 CGTAAAGAAA AATAAGCACA AGTTTTATCC GGCCTTTATT CACATTCTTG
 1051 CCCGCCGTGAT GAATGCTCAT CCGGAATTTT GTATGGCAAT GAAAGACGGT
 1101 GAGCTGGTGA TATGGGATAG TGTTACCCCT TGTTACACCG TTTTCCATGA
 1151 GCAAAC TGAA ACGTTTTCAT CGCTCTGGAG TGAATACCAC GACGATTTCC
 1201 GGCAGTTTCT ACACATATAT TCGCAAGATG TGGCGTGTTA CCGTGAAAAC
 1251 CTGGCCTATT TCCCTAAAGG GTTATTTGAG AATATGTTTT TCGTCTCAGC
 1301 CAATCCCTGG GTGAGTTTCA CCAGTTTTGA TTTAAACGTG GCCAATATGG
 1351 ACAACTTCTT CGCCCCCGTT TTCACCATGG GCAATATATA TACGCAAGGC
 1401 GACAAGGTGC TGATGCCGCT GCGGATTCAG GTTCATCATG CCGTCTGTGA
 1451 TGGCTTCCAT GTCGGCAGAA TGCTTAATGA ATTACAACAG TACTGCCGATG
 1501 AGTGGCAGGG CGGGGCGTAA TTTTTTTAAG GCAGTTATTG GTGCCCTTAA
 1551 ACGCCTGGGG TAATGACTCT CTAGCTTGAG GCATCAAATA AAACGAAAGG
 1601 CTCAGTCGAA AGACTGGGCC TTTCTTTTTA TCTGTGTGTT GTCCGTGAAC
 1651 GCTCTCTGA GTAGGACAAA TCCGCCGCTC TAGAGCTGCC TCGCGCGTTT
 1701 CCGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA
 1751 CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG
 1801 TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGGCGCA GCCATGACCC AGTCACGTAG
 1851 CGATAGCGGA GTGTATACTG GCTTAACAT GCGGCATCAG AGCAGATTGT
 1901 ACTGAGAGTG CACCATATGC GGTGTGAAAT ACCGCACAGA TCGGTAAGGA
 1951 GAAAATACCG CATCAGGCGC TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGA CTGCTG
 2001 CGCTCGGTCT GTCGGCTGCG GCGAGCGGTA TCAGCTCACT CAAAGGCGGT
 2051 AATACGGTGA TCCACAGAAT CAGGGGATAA CCGAGGAAAG AACATGTGAG
 2101 CAAAGGCCA GCAAAGGCC AGGAACGTA AAAAGGCCGC GTTGCTGGCG

XbaI

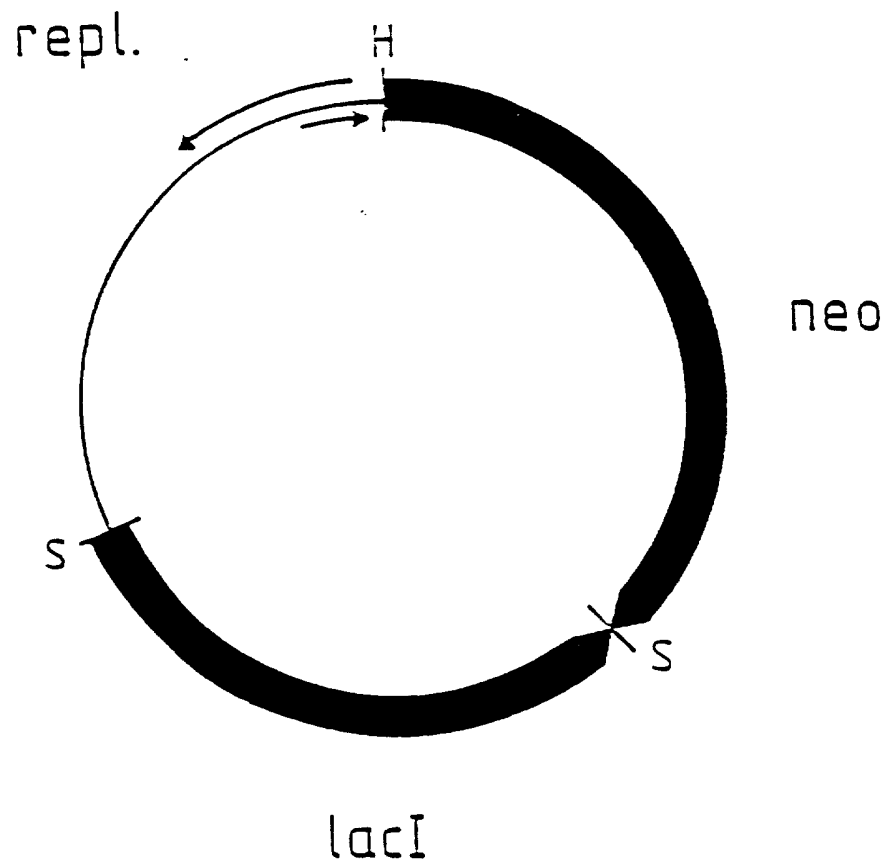
Obj. 1b (pokr.)

1151 TTTTCCATA GGCTCCGCCC CCCTGACGAG CATCACAAA ATCGACGCTC
 1201 AAGTCAGAGG TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTC
 1251 CCCCCTGAAG CTCCCTCGTG CGCTCTCCTG TTCCGACCCT GCGGCTTACC
 1301 CGATACCTGT CCGCCTTTCT CCCTTCGGGA AGCGTGGCGC TTTCTCAATG
 1351 CTCACGCTGT AGGTATCTCA GTTCGGTGTA GGTCGTTCCG TCCAAGCTGG
 1401 GCTGTGTGCA CGAACCCCCG GTTCAGCCCC ACCGCTGCGC CTTATCCGGT
 1451 AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCGGTAAGA CACGACTTAT CGCCACTGGC
 1501 AGCAGCCACT GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GCGGGTGCTA
 1551 CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG CTTACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA
 1601 TTTGGTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG
 1651 TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT GGTTTTTTTG
 1701 TTTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT
 1751 TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG TGGAACGAAA ACTCAGGTA
 1801 AGGGATTTTG GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC TAGATCCTTT
 1851 TAAATTAAAA ATGAAGTTTT AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAAACT
 1901 TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCACCTA TCTCAGCGAT
 1951 CTGTCTATTT CGTTCATCCA TAGCTGCCTG ACTCCCCGTC GTGTAGATAA
 2001 CTACGATACG GGAGGGCTTA CCATCTGGCC CCAGTGCTGC AATGATACCG
 2051 CGAGACCCAC GCTCACCAGC TCCAGATTTA TCAGCAATAA ACCAGCCAGC
 BglI
 3101 CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC AACTTTATCC GCTCCATCC
 3151 AGTCTATTAA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTAAAT
 3201 AGTTTGCGCA ACGTTGTTGC CATTGCTACA GGCATCGTGG TGTCACGCTC
 3251 GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA TCAAGGCGAG
 3301 TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAG CGGTAGCTC CTTCCGGTCTT
 3351 CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTATCAC TCATGGTAT
 3401 GGCAGCACTG CATAATTCTC TTAATGTCAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT
 3451 CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG

Obr. 1b (pokr.)

3501 CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GCGGTCAATA CGGGATAATA CCGCGCCACA
3551 TAGCAGAACT TTAAGAGTGC TCATCATYGG AAAACGTTCT TCGGGGGGAA
3601 AACTCTCAAG GATCTEACCG CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT
3651 CGTGACCCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG
3701 GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA
3751 CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTCAATA TTATGAAGC
3801 ATTATCAGG GTATTTGTCT CATGAGCGGA TACATATTG AATGTATTA
3851 GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGGGCAC ATTTCGCCGA AAAGTGCCAC
3901 CTGACGTCTA AGAAACCATT ATATCATGA CATTAACCTA TAAAAATAGG
3951 CGTATCAGCA GGGCCTTTTCG TCTTCAC

Obr. 2a



Obr. 2b

HindIII

1 AAGCTTCACG CTGCCGCAAG CACTCAGGGC GCAAGGGCTG CTAAGGAAG
 51 CCGAACACGT AGAAAGCCAG TCCGAGAAA CCGTGCTGAC CCGGATGAA
 101 TGTGAGCTAC TGGGCTATCT GCACAAGGA AAACGCAAGC GCAAGAGAA
 151 AGCAGGTAGC TTGCAGTGGG CTTACATGGC CATAGCTAGA CTGGGCGGTT
 201 TTATGGACAG CAAGCGAACC GGAATTGCCA GCTGGGGCGC CTTCTGGTAA
 251 GGTGCGGAAG CCGTGCAAAG TAACTGGAT GGCTTTCTTG CCGCCAAGGA
 301 TCTGATGGCG CAGGGGATCA AGATCTGATC AAGAGACAGG ATGACGGTCC
 351 TTTCGCATGC TTGAACAAGA TGGATTGCAC GCAGGTTCTC CCGCCGCTTG
 401 GGTGGAGAGG CTATTCGGCT ATGACTGGGC ACAACAGACA ATCGGCTGCT
 451 CTGATGCCGC CGTGTTCCCG CTGTCAGCGC AGGGGCGCCC GGTCTTTTTT
 501 GTCAAGACCG ACCGTGCCCG TCCCTGAAT GAACTGCAGG ACCAGGCAGC
 551 CCGGCTATCG TGGGTGGCCA GCACGGGCGT TCGTTCGCA GCTGTGCTCG
 601 ACGTGTGAC TGAAGCGGGA AGGACTGGC TGCTATTGGG CGAAGTGCCG
 651 GGGCAGGATC TCCTGTGATC TCACCTTGCT CCGCCGAGA AAGTATCCAT
 701 CATGGCTGAT GCAATGCCGC GGCTGCATAC GCTTGATCCG GCTACCTGCC
 751 CATTCGACCA CCAAGCGAAA CATCGCATCG AGCGAGCAGC TACTCGGATG
 801 GAAGCCGGTC TTGTGATCA GGATGATCTG GACGAAGAGC ATCAGGGGCT
 851 CCGCCAGCC GAACTGTTCC CAGGCTCAA GCGCGCATG CCGACGGCG
 901 AGGATCTCGT CGTGACCCAT GCGGATGCCCT GCTTGCCGAA TATCATGGTG
 951 GAAATGGCC GCTTTCTGCG ATTCATCGAC TGTGGCCGGC TGGGTGTGGC
 1001 GGACCGCTAT CAGGACATAG CGTTGGCTAC CCGTGATATT GCTGAAGAGC
 1051 TTGGCGGCGA ATGGGCTGAC CGCTTCCTCG TGCTTACGG TATCGCCGCT
 1101 CCGGATTCGC AGCGCATCGC CTTCTATCGC CTTCTTGACG AGTTCTTCTG
 1151 AGCGGGACTC TGGGGTTCGA AATGACCGAC CAAGCGACGC CCAACCTGCC
 1201 ATCACGAGAT TTCGATTCCA CCGCCGCTTT CTATGAAAGG TTGGGCTTCG
 1251 GAATCGTTTT CCGGGACGCC GGCTGGATGA TCCTCCAGCG CCGGGATCTC
 1301 ATGCTGGAGT TCTTCGCCCC CCGCGGCTC GATCCCTCG CGAGTTGGTT

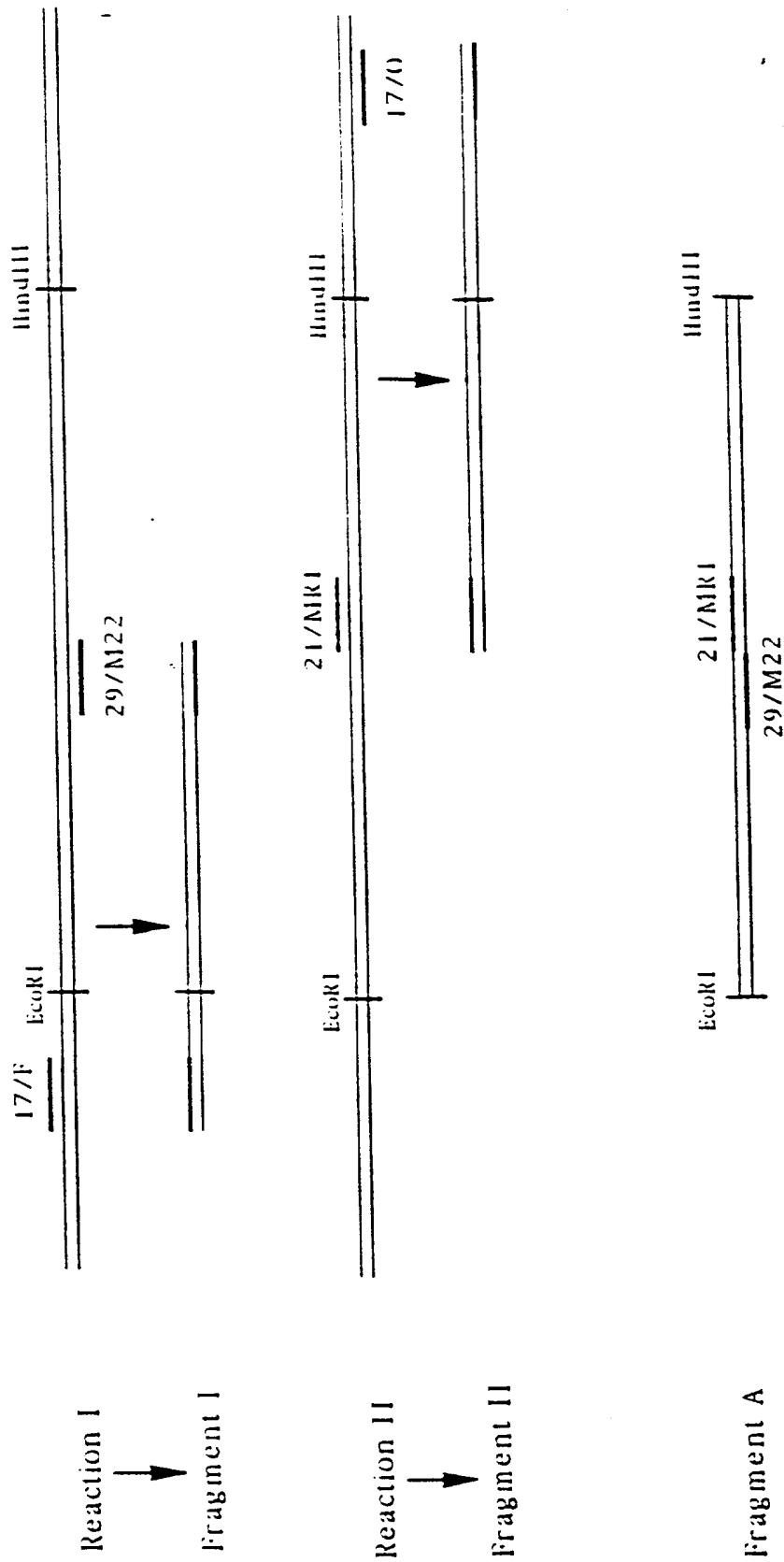
1351 CAGCTGCTGC CTGAGGGTGC AGGACCTCGC GGAGTTCTAC CGGCAGTGCA
 1401 AATCCGTCGG CATCCAGGAA ACCAGCAGCG GCTATCCGCG CATCCATGCC
 1451 CCGCAACTGC AGGAGTGGGG AGGCACGATG CCGGCTTTTCG TCGACAATTC Sali
 1501 CGGCTAACTT ACATTAATTG CGTTGGGCTC ACTGCCCCGT TTCCAGTCCG
 1551 GAAACCTGTC GTGCCAGCTG CATTAATGAA TCGGCCAAGC CGCGGGGAGA
 1601 GCGGGTTTTC GTATTGGGCG CCGAGGTGGT TTTTCTTTTC ACCAGTGAGA
 1651 CGGGCAACAG CTGATTGCCC TTCACCGCCT GGCCTGAGA GAGTTGCAGC
 1701 AAGCGGTCCA CGCTGGTTTG CCGCAGCAGG CGAAAATCCT GTTTGATGGT
 1751 GGTTAACGGC GGGATATAAC ATGAGCTGTC TTCGGTATCG TCGTATCCCA
 1801 CTACCGAGAT ATCCGCACCA ACGCGCAGCC CGGACTCGGT AATGGCGCGC
 1851 ATTGCGCCCA GCGCCATCTG ATCGTTGGCA ACCAGCATCG CAGTGGGAAC
 1901 GATGCCCTCA TTCAGCATTT GCATGGTTTG TTGAAAACCG GACATGGCAC
 1951 TCCAGTCGCC TTCCCGTTCC GCTATCGGCT GAATTGATT GCGAGTGAGA
 2001 TATTATGCC AGCCAGCCAG ACGCAGACGC GCGAGACAG AACTTAATGG
 2051 GCGCGCTAAC AGCGCGATTT GCTGGTGACC CAATGCGACC AGATGCTCCA
 2101 CGCCCAGTCG CGTACCGTCT TCATGGGAGA AAATAATACT GTTGATGGGT
 2151 GTCTGGTCAG AGACATCAAG AAATAACGCC GGAACATTAG TGCAGGCAGC
 2201 TTCCACAGCA ATGGCATCCT GGTATCCAG CGGATAGTTA ATGATCAGCC
 2251 CACTGACGCG TTGCGCGAGA AGATTGTGCA CCGCCGCTTT ACAGGCTTCG
 2301 ACGCCGCTTC GTTCTACCAT CGACACCACC ACGCTGGCAC CCAGTTGATC
 2351 GGCGCGAGAT TTAATCGCCG CGACAATTTG CGACGGCGCG TGCAGGGCCA
 2401 GACTGGAGGT GGCAACGCCA ATCAGCAACG ACTGTTTGCC CGCCAGTTGT
 2451 TGTGCCACGC GGTTCGGAAT GTAATTCAGC TCGGCCATCG CCGCTTCCAC
 2501 TTTTCCCGC GTTTTCGCAG AAACGTGGCT GGCCTGGTTC ACCACGGGGG
 2551 AAACGGTCTG ATAAGAGACA CCGGCATACT CTGCGACATC GTATAACGTT
 2601 ACTGGTTTCA CATTCACCAC CCGAATTGA CTCTTTCCG GCGGCTATCA
 2651 TGGCATACCG CGAAAGGTTT TCGGCCATTC GATGGTGCA ACGTAAATGC

Obr.. 2b (pokr.:)

SalI

2701 ATGCCGCTTC GCGTTCGGCG GCGAATTGTC GACCCGTGCC CTCTGTTC
 2751 GCTACTGACG GGGTGGTGGG TAACGGCAA AGCACCAGCG GACATCAGCG
 2801 CTAGCGGAGT GTATACTGGC TTAATAATGT GGCACGATG AGGGTGTGAG
 2851 TGAAGTGCTT CATGTGGCAG GAGAAAAAG GGTGCACCGG TGGGTGAGCA
 2901 GAATATGTGA TACAGGATAT ATTCCGCTTC CTGGCTCACT GACTCGCTAC
 2951 GCTCGGTGCT TCGACTGCGG CGAGCGGAAA TGGCTTACGA ACGGGGCGGA
 3001 GATTTCCCTGG AAGATGCCAG GAAGATACTT AACAGGGAAG TGAGAGGGCC
 3051 GCGGCAAAGC CGTTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCCTGACA AGCATCAGCA
 3101 AATCTGACGC TCAATCAGT GGTGGCGAAA CCGACAGGA CTATAAAGAT
 3151 ACCAGGCGTT TCCCCTGGCG GCTCCCTCGT GCGCTCTCTT GTTCTGCGT
 3201 TTGGGTTTAC CGGTGTCAAT CCGCTGTAT GCGCGGTTTT GTCTCATTC
 3251 ACGCCTGACA CTCAGTTCCG GGTAGGCAGT TGGCTCCAG CTGGACTGTA
 3301 TGCACGAACC CCGGTTTCAG TCCGACCGCT GCGCCTTATC CGGTAATAT
 3351 CGTCTTGAGT CCAACCCGGA AAGACATGCA AAAGCACCAC TGGCAGCAGC
 3401 CACTGGTAAT TGATTAGAG GAGTATGCT TGAAGTCATG CGCCGGTTAA
 3451 GGCTAAACTG AAAGGACAAG TTTTGGTGAC TGGCTCTCTC CAAGCCAGTT
 3501 ACCTCGGTTT AAAGAGTTGG TAGCTCAGAG AACCTTCGAA AAACCGCCCT
 3551 GCAAGGCGGT TTTTTCGTTT TCAGAGCAAG AGATTACGCG CAGACCAAAA
 3601 CGATCTCAAG AAGATCATCT TATTAATCAG ATAAAATATT TCTAGATTTC
 3651 AGTGCAATTT ATCTCTTCAA ATGTAGCACC TGAAGTCAGC CCCATACGAT
 3701 ATAAGTTGTT AATTCTCATG TTTGACAGCT TATCATCGAT

Obr. 3



Obr. 4

BglI

3102 GGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC AACTTTATCC GCTCCATCC
 3151 AGTCTATTA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT
 3201 AGTTTGGCGA ACGTTGTTGC CATTGCTACA GGCATCGTGG TGTACGGCTC
 3251 GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA TCAAGGCGAG
 3301 TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAG CGGTAGCTC CTTCGGTCTT
 3351 CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTTAT
 3401 GGCAGCACTG CATAATCTC TCACTGTCAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT
 3451 CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG
 3501 CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GCGTCAATA CGGGATAATA CCGCGCCACA
 3551 TAGCAGAACT TTAAGAGTGC TCATCATGG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA
 3601 AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT
 3651 CGTGACCCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG
 3701 GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA
 3751 CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTCAATA TTATTGAAGC
 3801 ATTATCAGG GTTATGTCT CATGAGCGGA TACATATTG AATGTATTTA
 3851 GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCGGA AAAGTGCCAC
 3901 CTGACGTCTA AGAAACCAAT ATTATCATGA CATTAACCTA TAAAAATAGG
 3951 CGTATCACGA GGCCCTTTCT TCTTCAC-

XhoI

1 -CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT

EcoRI

51 AATAGATTCA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG
 101 AGGAGAAATT AAGCATGGTC AGATCATCTT CTCGAACCCC GAGTGACAAG
 Val ArgSerSerS erArgThrPr oSerAspLys
 1 11
 151 CCTGTAGCCC ATGTTGTAGC AAACCTCAA GCTGAGGGGC AGCTCCAGTG
 ProValAlaH isValValAl aAsnProGln AlaGluGlyG lnLeuGlnTr
 21

BglI

201 GCTGAACCGC TGGGCCAATG CCTCTCTGGC
 pLeuAsnArg TrpAlaAsnA laLeu
 31 36

Obr. . 5

BglI

3102 GGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC AACTTTATCC GCCTCCATCC
 3151 AGTCATATA TTGTGCCCG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT
 3201 AGTTTCCGCA ACGTTGTTC CATTCCTACA GGCATCGTGG TGTACCGCTC
 3251 GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCCG TTCCCAACGA TCAAGGCCGAG
 3301 TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAAG CCGTTAGCTC CTTGGTCTCT
 3351 CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTATCAC TCATGGTTAT
 3401 GGCAGCACTG CATAATTCTC TCACTGTTCAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT
 3451 CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG
 3501 CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GCGGTCAATA CCGGATAATA CCGCGCCACA
 3551 TAGCAGAACT TTAAAAGTGC TCATCATTTG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA
 3601 AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTGGAT GTAACCCACT
 3651 CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG
 3701 GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA
 3751 CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTTCATA TTATTGAAGC
 3801 ATTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTTG AATGTATTTA
 3851 GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCCGA AAAGTGCCAC
 3901 CTGACGTCTA AGAAACCATT ATTATCATGA CATTACCTA TAAAAATAGG
 3951 CGTATCACGA GGCCCTTTCC TCTTCAC-

XhoI

1 -CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT

EcoRI

51 AATAGATTCA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG
 101 AGGAGAAATT AAGCATGGTC AGATCATCTT CTGGAACCCC GAGTGACAAG
 Val ArgSerSerS erArgThrPr oSerAspLys
 1 11
 151 CCTGTAGCCC ATGTTGTAGC AAACCCTCAA GCTGAGGGGC AGCTCCAGTG
 ProValAlaH isValValAl aAsnProGln AlaGluGlyG lnLeuGlnTr
 21

BglI

201 GTCCAACCGC CGGGCCAATG CCTTCCTGGC
 pSerAsnArg ArgAlaAsnA laLeu
 31 36

Obr. 6

BglI

3102 CGAAGGGGC GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC AACTTATCC GCCTCCATCC
 3151 AGTCTATTA TGTGTCGGG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT
 3201 AGTTTGGCGA ACGTTGTTGC CATTGCTACA GGCATCGTGG TGTACGGCTC
 3251 GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA TCAAGGCGAG
 3301 TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAG CGGTAGCTC CTTGGTCTCT
 3351 CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGCCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTTAT
 3401 GGCAGCACTG CATAATTCTC TTAGTGTATC GCCATCCGTA AGATGCTTTT
 3451 CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG
 3501 CGACCGAGTT GCTCTTGGCC GCGTCAATA CGGGATAATA CCGCGCCACA
 3551 TAGCAGAACT TTTAAAGTGC TCATCATTGG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA
 3601 AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT
 3651 CGTGACCCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG
 3701 GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA
 3751 CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTCAATA TTATTGAAGC
 3801 ATTEATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTG AATGTATTA
 3851 GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCGA AAAGTCCAC
 3901 CTGACGTCTA AGAAACCATT ATTATCATGA CATTAACCTA TAAAAATAGG
 3951 CGTATCACGA GGCCCTTTTCG TCTTCAC-

XhoI

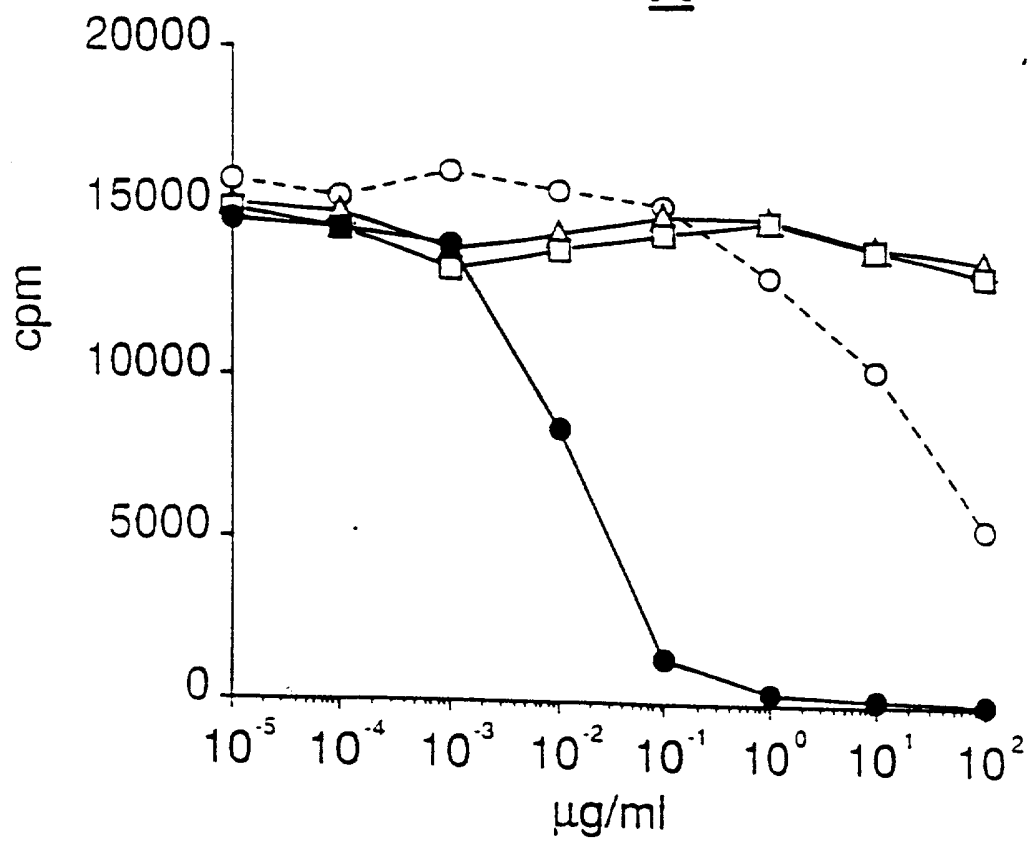
1 -CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT

EcoRI

51 AATAGATTCA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG
 101 AGGAGAAATT AAGCATGGTC AGATCATCTT CTCGAACCCC GAGTGACAAG
 Val ArgSerSerS erArgThrPr oSerAspLys
 1 11
 151 CCTGTAGCCC ATGTTGTAGC AAACCCTCAA GCTGAGGGGC AGCTCCAGTG
 ProValAlaH isValValAl aAsnProGln AlaGluGlyG lnLeuGlnTr
 21

BglI

201 GTCCAACCGC TGGGCCAATG CCTCCTGGC
 pSerAsnArg TrpAlaAsnA laLeu
 31 36

A**B**