PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:
2000 - 3308

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7]:
C 12 N 15/56
C 12 N 15/62
C 12 N 9/24
C 07 K 16/40
A 61 K 38/47
G 01 N 33/58

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **12.03.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **12.03.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/039198**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11.07.2001**
(Věstník č. 7/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/US99/05343**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/46390**

(71) Přihlašovatel:
ICOS CORPORATION, Bothell, WA, US;

(72) Původce:
Gray Patrick W., Seattle, WA, US;
Tjoelker Larry W., Kirkland, WA, US;

(74) Zástupce:
Čermák Karel Dr., Národní třída 32, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Chitin-vazebné fragmenty chitinázy

(57) Anotace:

Polypeptid s chitin-vazebnou aktivitou, ale postrádající chitinázovou aktivitu, který zahrnuje chitin-vazebný fragment 54 C-koncových aminokyselin lidské chitinázy.

CZ 2000 - 3308 A3

06.03.01

PV 2000-3308

17767

Chitin-vazebné fragmenty chitinázy

Oblast techniky

Obecně lze říci, že vynález popisuje materiály zahrnující chitin-vazebné fragmenty lidské chitinázy a analogy těchto fragmentů. Přesněji pak, vynález popisuje nově purifikované a izolované polynukleotidy kódující tyto fragmenty, dále fragmenty chitinázy kódované těmito polynukleotidy, materiály a způsoby přípravy těchto fragmentů chitinázy rekombinantními technikami a terapeutické a diagnostické využití těchto fragmentů chitinázy.

Dosavadní stav techniky

Chitin je lineární homopolymer tvořený N-acetylglukosaminovými zbytky spojenými β-(1,4) vazbou. Tento polysacharid je po celulóze druhou nejčastěji se vyskytující organickou látkou. Z chitinu je například exoskelet členovců. Chitin je rovněž obsažen v buněčných stěnách cizopasných hub a jiných patogenů, kde hraje významnou strukturní a ochrannou roli. Narušení buněčné stěny a membrány cizopasných hub je účinnou terapeutickou strategií používanou proti těmto cizopasným houbám a patogenům. Antifungální aktivita amfotericinu B a flukonazolu je například založena na ovlivnění steroidů v membránách buněk. I přesto, že existují antifungální terapeutika, plísňové infekce jsou v poslední době zodpovědné za výskyt poruch ohrožujících životy lidí (viz. Georgopapadakou a další, Trends Microbiol., 3:98 až 104, 1995). Mezi patogeny vyvolávající výše zmíněná onemocnění patří především zástupci rodů Candida, Aspergillus, Cryptococcus, Histoplasma, Coccidiodides a Pneumocystis. Tito patogenové jsou zvláště nebezpeční pro jedince s oslabeným imunitním systémem, jako například pro pacienty

postižené AIDS, pacienty podstupující léčbu chemoterapeutiky a imunosuprimované pacienty po transplantaci orgánů.

Chitin může být degradován chitinázou. Chitinázy jsou produkovány rostlinami, mikroorganizmy i živočichy. Bakteriální chitináza například pomáhá dodávat zdroj uhlíku nezbytný pro růst baktérií. Hmyz produkuje chitinázu za účelem degradace kutikuly při růstu. U rostlin pravděpodobně hraje chitináza důležitou úlohu při ochraně proti patogenním houbám. Chitinázy byly klonovány z velkého počtu různých druhů bakterií (například Serratia marcescens, Heitz a další, EMBO J., 5:467 až 473, 1986), rostlin (například tabáku, Heitz a další, Mol. Gen. Genet., 245:246 až 254, 1994) a hmyzu (například vos, Krishnan a další, J. Biol. Chem., 269:20971 až 20976, 1994) a na základě sekvenční analogie byly rozděleny do dvou skupin označovaných jako rodina 18 a rodina 19 (Henrissat a Bairoch, Biochem. J., 293:781 až 788, 1993). Ačkoliv je katalytická oblast mezi zástupci rodiny 18 mezidruhově konzervována, mezidruhová sekvenční homologie v chitin-vazebné doméně je minimální. Jediným znakem společným pro chitin-vazebné domény u chitináz rodiny 18 je výskyt několika cysteinových zbytků.

U savců bylo identifikováno několik proteinů s nízkým stupněm homologie k bakteriálním, hmyzím a rostlinným chitinázám (méně než 40% identita aminokyselin). Takovými proteiny jsou například lidský gp-39 chrupavek (C-gp-39; Hakala a další, J. Biol. Chem., 268:25803 až 25810, 1993), lidský glykoprotein YKL-40 (Johansen a další, Eur. J. Cancer, 31A:1437 až 1442, 1995), estrogenem indukovaný protein specificky exprimovaný ve vejcovodech ovcí, hovězího dobytka a lidí (DeSouza a další, Endocrinology, 136:2485 až 2496, 1995) a sekretovaný protein aktivovaných myších makrofágů (Chang a další, Genbank M94584). U těchto proteinů nebyla nicméně popsána schopnost degradovat chitin. Funkce těchto

proteinů není známa, ale předpokládá se, že hrají úlohu při remodelingu tkání. Hakala a další (viz. výše) popsali, že protein C-gp39 lze detekovat ve vzorcích synovia a chrupavek pacientů postižených revmatickou arthritidou, ale ne ve vzorcích odebraných z organizmu zdravých jedinců. Recklies a další (Arthritis Rheumatism, 36(9Suppl.):S190, 1993) popisují lokalizaci C-gp39 v jednotlivých buňkách tvořících povrchovou vrstvu chrupavky. Johansen a další (viz. výše) udávají, že sérová koncentrace YKL-40 může sloužit jako prognostický marker rozsahu metastáz a přežívání pacientů s recidivujícími nádory prsu.

Escott a další (Infec. Immun., 63:4770 až 4773, 1995) prokázali chitinázovou aktivitu v lidských leukocytech a v séru. Overdijk a další (Glycobiology, 4:797 až 803, 1994) popisují izolaci chitinázy (hydrolázy methylumbelliferyl-tetra-N-acetylchitotetraosidu) z lidského séra a potkaních jater. Renkema a další (J. Biol. Chem., 270:2198 až 2202, únor 1995) izolovali lidskou chitotriosidázu ze sleziny pacientů postižených Gaucherovým onemocněním. Tento izolát vykazoval chitinázovou aktivitu a ve zmíněném článku je uvedena část aminokyselinové sekvence proteinové složky izolátu (22 koncových aminokyselin a 21 aminokyselinových zbytků z fragmentu získaného štěpením trypsinem). Funkce lidské chitinázy je rovněž neznámá, ale v tomto článku byla naznačena možná souvislost s patofyziologií Gaucherova onemocnění. Pozdější práce publikovaná stejnou skupinou (Boot a další, J. Biol. Chem., 270(44):26252 až 26256, listopad 1995) popisuje klonování cDNA z lidských makrofágů kódující produkt s chitinázovou aktivitou. Částečná aminokyselinová sekvence uvedená v publikaci této skupiny z února 1995 (viz. výše) se shoduje s částí předpokládané aminokyselinové sekvence produktu cDNA z lidských makrofágů. Rovněž mezinárodní přihláška WO96/40940 popisuje dvě rozdílné lidské

cDNA kódující produkty s chitotriosidázovou aktivitou o velikosti 50 kDa a 39 kDa, kde oba tyto produkty jsou enzymaticky aktivní. Renkema a další (Eur. J. Biochem., 244:279 až 285, 1997) popisuje skutečnost, že lidská chitináza je v makrofázích nejprve produkována jako 50 kDa protein, který je následně z části procesován na 39 kDa formu, která je akumulována v lysozymech. V této publikaci je rovněž uvedeno, že alternativním sestřihem je produkována mRNA kódující chitinázu o velikosti 40 kDa. Jak 39 kDa, tak 40 kDa izoformy jsou pravděpodobně zkrácené na C-konci a vyznačují se úplnou chitinázovou aktivitou, ale pouze slabou vazbou chitinu.

Vzhledem ke zvyšujícímu se výskytu plísňových onemocnění ohrožujících život jedinců s oslabeným imunitním systémem je žádoucí identifikovat nové látky a způsoby použitelné k diagnostice a léčbě těchto onemocnění.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález popisuje nově purifikované a izolované polynukleotidy (t. j. DNA a RNA, jak kódující tak antikódující vlákna) kódující fragmenty lidské chitinázy a jejich analogy, kde tyto fragmenty nebo analogy mají chitin-vazebnou aktivitu, ale postrádají chitinázovou aktivitu. Vynález dále popisuje přípravu takových fragmentů rekombinantními technikami, farmaceutické přípravky zahrnující tyto fragmenty a diagnostické a terapeutické látky konjugované s těmito fragmenty. Předpokládá se, že tyto fragmenty konjugované s diagnostickými nebo terapeutickými látkami budou použitelné k detekci chitinu, vazbě chitinu a léčbě plísňových infekcí nebo k vývoji produktů využitelných k léčbě plísňových onemocnění.

Nukleotidové sekvence dvou lidských cDNA kódujících předpokládané alelické varianty lidské chitinázy, včetně

nekódujících 5´ a 3´ sekvencí, jsou uvedeny jako SEK. ID. Č.: 1 a SEK. ID. Č.: 3. Kódující oblast pro lidskou chitinázu odpovídá v SEK. ID. Č.: 1 nukleotidům 2 až 1399 a v SEK. ID. Č.: 3 nukleotidům 27 až 1424. Předpokládaná kódující sekvence maturní lidské sekretované chitinázy bez signální sekvence odpovídá nukleotidům 65 až 1399 v SEK. ID. Č.: 1 a nukleotidům 90 až 1424 v SEK. ID. Č.: 3. Aminokyselinové sekvence polypeptidů kódovaných DNA popsanými SEK. ID. Č.: 1 a SEK. ID. Č.: 3 jsou uvedeny jako SEK. ID. Č.: 2, respektive SEK. ID. Č.: 4. Dvacet jedna N-koncových aminokyselin (v SEK. ID. Č.: 2 a 4 na pozicích -21 až -1) tvoří signální peptid, který je odštěpen za vzniku maturní lidské chitinázy (v SEK. ID. Č.: 2 a 4 odpovídá aminokyselinám 1 až 445). Bylo zjištěno, že 72 C-koncových aminokyselinových zbytků v lidské chitináze není nezbytných pro chitinázovou aktivitu. Příklad 5 popisuje produkci N-koncového fragmentu lidské chitinázy, který je na C-konci zkrácen o 72 aminokyselin. Důsledkem zavedení stop kodonu za kodon pro aminokyselinu 373 je produkce rekombinantního fragmentu chitinázy o velikosti 39 kDa, který si, vzhledem nezkrácené k rekombinantní lidské chitináze, zachovává podobnou specifickou chitinázovou aktivitu. Klonování cDNA kódující lidskou chitinázu a její exprese a biologické aktivity rekombinantní lidské chitinázy jsou detailně popsány v přihlášce US 08/877599, podané 16. června, 1997, která navazuje na přihlášku US 08/663618, podanou 14. června, 1996. Obě tyto přihlášky jsou zde uvedeny záměnou za přenesení jejich celého obsahu do popisu tohoto vynálezu.

Podstatou předkládaného vynálezu je neočekávané zjištění, že téměř veškerá chitin-vazebná aktivita lidské chitinázy je situována v 99 C-koncových aminokyselinách ze 445 aminokyselin intaktního enzymu. Vynález specificky popisuje polypeptidové produkty vážící chitin, ale postrádající chi-

tinázovou aktivitu. Ve výhodném provedení vynálezu se jedná o fragmenty obsahující chitin-vazebnou část, která zahrnuje 54 aminokyselin na C-konci lidské chitinázy. Takovými fragmenty jsou například fragment zahrnující přibližně 99 aminokyselin z C-konce lidské chitinázy (přibližně aminokyselinové zbytky 347 až 445 v SEK. ID. Č.: 2), fragment zahrnující přibližně 72 aminokyselin z C-konce lidské chitinázy (přibližně aminokyselinové zbytky 374 až 445 v SEK. ID. Č.: 2), fragment zahrnující přibližně 54 aminokyselin z C-konce lidské chitinázy (přibližně aminokyselinové zbytky 392 až 445 v SEK. ID. Č.: 2) a fragment zahrnující přibližně 49 aminokyselin z C-konce lidské chitinázy (přibližně aminokyselinové zbytky 397 až 445 v SEK. ID. Č.: 2). Vynález rovněž popisuje purifikované, izolované polynukleotidy včetně DNA kódující výše uvedené polypeptidové fragmenty; vektory zahrnující takové DNA, zvláště pak expresívní vektory, kde jsou tyto DNA funkčně spojeny se sekvencí umožňující jejich expresi; hostitelské buňky stabilně transformované nebo transfekované výše zmíněnými DNA tak, že v těchto hostitelských buňkách je umožněna exprese fragmentů lidské chitinázy; způsoby produkce polypeptidových fragmentů lidské chitinázy zahrnující kultivaci zmíněných hostitelských buněk v živném médiu a izolaci uvedených polypeptidů z hostitelských buněk nebo kultivačního média; purifikované, izolované polypeptidy produkované tímto způsobem; fúzní proteiny zahrnující výše zmíněné polypeptidy spojené s nějakým heterelogním peptidem nebo polypeptidem, včetně nějakého enzymu jako například sekretované alkalické fosfatázy (SEAP); přípravky zahrnující výše zmíněné lidské polypeptidové fragmenty; přípravky zahrnující polypeptidové fragmenty lidské chitinázy konjugované s nějakou antifungální látkou a způsoby léčby plísňových onemocnění aplikací těchto přípravků, volitelně aplikací spolu s antifungálními látkami neobsahu-

jícími fragmenty chitinázy; přípravky zahrnující polypeptidové fragmenty chitinázy konjugované s detekovatelnou značkou (včetně radioizotopů, fluoroforů, barviv, elektrondenzních sloučenin a enzymů); způsoby použití těchto přípravků k detekci výskytu a množství chitinu v nějakém vzorku, kde tyto způsoby zahrnují následující kroky: (a) kontakt zmíněného vzorku s polypeptidovým fragmentem lidské chitinázy konjugovaným s detekovatelnou značkou a (b) stanovení množství značeného fragmentu navázaného na chitin; soupravy pro diagnostiku přítomnosti chitinu ve vzorcích; monoklonální protilátky, které specificky interagují s chitin-vazebným fragmentem lidské chitinázy postrádajícím chitinázovou aktivitu, včetně protilátek specificky interagujících s epitopem v oblasti 54 C-koncových aminokyselinových zbytků lidské chitinázy o sekvenci uvedené jako SEK. ID. Č.: 2; a výhodně používané monoklonální protilátky 243Q a 243M a protilátky, které kompetují s nebo se vážou ke stejným epitopům jako protilátky 243Q a 243M.

Polypeptidové fragmenty chitinázy podle vynálezu zahrnují fragmenty lidské chitinázy nebo jejich alelické varianty, které se vyznačují tím, že si zachovávají chitin-vazebnou aktivitu, ale postrádají chitinázovou aktivitu, analogy těchto fragmentů a fúzní proteiny zahrnující tyto fragmenty nebo analogy. Polypeptidové fragmenty chitinázy jsou využitelné v terapeutických a diagnostických aplikacích popsaných v dalším textu.

Fragmenty "chitin-vazebné domény", které spadají do rozsahu vynálezu, jsou v SEK. ID. Č.: 2 reprezentovány aminokyselinovými zbytky od X po Y, kde X zahrnuje všechna celá čísla v intervalu 347 až 397 a Y je 445. Do rozsahu vynálezu rovněž spadají části výše uvedených fragmentů, které si uchovávají chitin-vazebnou aktivitu. Jedním z výhodně používaných fragmentů je fragment zahrnující 99 C-koncových ami-

nokyselin lidské chitinázy (aminokyselinové zbytky 347 až 445 v SEK. ID. Č.: 2); v příkladu 7 (viz. níže) bylo prokázáno, že tento fragment si zachovává 80% chitin-vazebné aktivity maturní chitinázy. Výhodněji používanými fragmenty jsou pak fragment zahrnující 54 C-koncových aminokyselin lidské chitinázy (aminokyselinové zbytky 392 až 445 v SEK. ID. Č.: 2) a fragment zahrnující 49 C-koncových aminokyselin lidské chitinázy (aminokyselinové zbytky 397 až 445 v SEK. ID. Č.: 2), které mají rovněž zachovanou chitin-vazebnou aktivitu (viz. příklad 7). Příklad 7 ukazuje, že fúzní protein zahrnující 99 C-koncových aminokyselin lidské chitinázy obsahuje doménu odpovědnou za vazbu chitinu. Hranice této chitin-vázající domény byly přesněji definovány zkracováním zmíněné 99-ti aminokyselinové oblasti jak z N-konce, tak z C-konce, a měřením chitin-vazebné aktivity fúzních proteinů zahrnujících takto zkrácené úseky. Mezi tyto zkrácené úseky patří aminokyselinové řetězce s N-koncem začínajícím aminokyselinovým zbytkem 347, 374, 392, 395, 397, 400 nebo 409 a na C-konci ukončené aminokyselinovým zbytkem 431, 443 nebo 445.

Analogy mohou zahrnovat analogy fragmentů chitinázy, u kterých je jedna nebo více specifikovaných (t.j přirozeně se vyskytující) aminokyselin odstraněno nebo nahrazeno, nebo do nichž je přidána jedna nebo více nespecifikovaných aminokyselin: (1) bez ztráty jedné nebo více biologických aktivit (včetně schopnosti vázat chitin) nebo imunologických charakteristik specifických pro chitinázu; nebo (2) za účelem potlačení (odstranění) příslušné biologické aktivity chitinázy. Předpokládá se, že konzervativní aminokyselinové záměny (jak jsou v současnosti chápány) mohou být provedeny bez jakéhokoliv ovlivnění biologické aktivity příslušného fragmentu.

Výhodně používanými sekvencemi DNA podle vynálezu jsou sekvence genomové DNA nebo cDNA a rovněž sekvence DNA zcela nebo částečně připravené chemickou syntézou, které kódují fragmenty lidské chitinázy s chitin-vazebnou aktivitou, ale postrádající chitinázovou aktivitu, jejich analogy a fúzní proteiny zahrnující tyto fragmenty nebo analogy. Jednou z výhodně používaných nukleotidových sekvencí je sekvence kódující v SEK. ID. Č.: 2 aminokyselinové zbytky od X po Y, kde X zahrnuje všechna celá čísla v intervalu 347 až 397 a Y je 445. Zvláště výhodnou sekvencí DNA je sekvence nukleotidů 1238 až 1399 v SEK. ID. Č.: 1 (kódující aminokyselinové zbytky 92 až 445 v SEK. ID. Č.: 2). Do rozsahu vynálezu spadá výše zmíněná sekvence DNA a další sekvence DNA, které za standardních podmínek hybridizují s antikódujícím vláknem výše uvedené sekvence DNA, nebo které v důsledku degenerace genetického kódu s touto sekvencí nehybridizují, a které kódují fragmenty chitinázy s chitin-vazebnou aktivitou. Příkladem standardních hybridizačních podmínek jsou podmínky: hybridizace při 42°C v 50% formamidu a promytí při 60°C roztokem 0,1 x SSC, 0,1% SDS. Odborníkům je zřejmé, že uvedené hybridizační podmínky mohou být změněny v závislosti na délce hybridizovaných sekvencí a zastoupení CG párů. Vzorce pro výpočet standardních hybridizačních podmínek jsou uvedeny například v publikaci Sambrook a další, 9.47 až 9.51, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

Polynukleotidy podle vynálezu mohou být použity jako hybridizační sondy k identifikaci a izolaci genomových DNA a cDNA kódujících chitin-vázající oblasti proteinů homologních k lidské chitináze; a k identifikaci buněk exprimující chitin-vázající části takových proteinů a biologických podmínek, při kterých jsou tyto proteiny exprimovány.

Další stránka vynálezu se týká biologických replik (tj. kopií izolovaných sekvencí DNA připravených in vitro nebo in vivo) sekvencí DNA podle vynálezu. Vynález popisuje autonomně se replikující rekombinantní konstrukty jako například plazmidy a virové vektory zahrnující polynukleotidy kódující fragmenty lidské chitinázy s chitin-vazebnou aktivitou, včetně jakékoliv z DNA popsaných výše. Mezi výhodně používané vektory patří expresívní vektory, které obsahují cDNA kódující fragmenty chitinázy funkčně spojené s nějakou endogenní nebo heterologní sekvencí řídící expresi a nějakým terminátorem transkripce. Tyto expresívní vektory mohou dále obsahovat sekvence DNA kódující polypeptidy, kde tyto sekvence DNA jsou funkčně spojeny se sekvencemi DNA kódujícími fragmenty chitinázy tak, že s využitím těchto vektorů je možné exprimovat nějaký fúzní protein obsahující požadovaný polypeptid.

Další stránka vynálezu se týká prokaryotických nebo eukaryotických hostitelských buněk stabilně transfekovaných nebo transformovaných polynukleotidovými sekvencemi podle vynálezu tak, že tyto buňky umožňují expresi požadovaného produktu zahrnujícího fragment chitinázy. Hostitelské buňky exprimující fragmenty chitinázy mohou být použity ke mnoha účelům. Tyto buňky jsou cenným zdrojem imunogenů použitelných k přípravě protilátek specificky reagujících s chitinázou. Hostitelské buňky podle vynálezu jsou použitelné pro produkci fragmentů chitinázy ve velkém měřítku tím, že tyto buňky jsou kultivovány ve vhodném kultivačním médiu a požadované polypeptidové produkty jsou z buněk nebo kultivačního média izolovány například imunoafinitní purifikací.

Znalost sekvencí DNA kódujících část lidské chitinázy vážící chitin umožňuje modifikaci buněk tak, aby exprimovaly tyto chitin-vazebné části nebo aby byla exprese těchto částí zvýšena. Vložením části nebo kompletního heterologní-

ho promotoru do vhodného místa uvnitř genu pro chitinázu může být u takto modifikovaných buněk (například homologní rekombinací) dosaženo zvýšení exprese chitin-vazebné části lidské chitinázy. Tento heterologní promotor je do genu vložen tak, aby byl funkčně spojen se sekvencí kódující chitin-vazebné části lidské chitinázy. Viz. například mezinárodní přihlášky WO94/12650, WO92/20808 a WO91/09955. Spolu se zmíněným heterologním promotorem může být do genu vložen amplifikovatelný marker a/nebo intron.

Fragmenty chitinázy mohou být získány ve formě izolátů z přirozených zdrojů nebo mohou být syntetizovány chemickou cestou, ale ve výhodném provedení jsou produkovány rekombinantními technikami využívajícími prokaryotické nebo eukaryotické hostitelské buňky podle vynálezu. Předpokládá se, že při použití savčích hostitelských buněk bude produkt posttranslačně modifikován (například myristilován, glykosylován, částečně štěpen, fosforylován na tyrosinu, serinu nebo threoninu nebo modifikován kovalentním připojením lipidů). Tyto posttranslační modifikace mohou být nezbytné pro optimální biologickou aktivitu rekombinantních produktů podle vynálezu.

Do rozsahu vynálezu dále spadá použití fragmentů chitinázy při screeningu proteinů nebo jiných molekul (například malých molekul), které se specificky vážou na chitin-vazebnou doménu lidské chitinázy, nebo které modulují vazbu lidské chitinázy k chitinu nebo k proteinům extracelulární matrix, jako například kyselině hyaluronové. Pomocí fragmentů chitinázy izolovaných z plazmy, rekombinantních fragmentů chitinázy nebo buněk exprimujících tyto produkty mohou být identifikovány proteiny nebo jiné molekuly (například malé molekuly), které se specificky vážou k chitináze. Proteiny nebo jiné molekuly, které se váží k chitin-vazebné doméně chitinázy mohu být využity k modulaci aktivity chi-

tinázy. Proteiny, které se specificky vážou k chitin-vazebné doméně chitinázy rovněž spadají do rozsahu vynálezu a zahrnují protilátky (například monoklonální nebo polyklonální protilátky, jednotlivé řetězce protilátek, chimérické protilátky, humanizované protilátky, lidské protilátky a protilátky s vloženými CDR sekvencemi včetně sloučenin zahrnujících sekvence CDR, které specificky rozpoznávají nějaký polypeptid podle vynálezu). Slovní spojení "specificky se vážou k chitin-vazebné doméně chitinázy" označuje skutečnost, že zmíněný vazebný protein rozpoznává výlučně chitin-vazebnou doménu chitinázy a ne katalyticky aktivní část chitinázy. Tyto vazebné proteiny jsou například použitelné v přípravcích pro imunizaci, jakož i pro purifikaci chitinázy, a jsou použitelné k detekci nebo kvantifikaci chitinázy ve vzorcích tkání nebo tělních tekutin pomocí známých imunologických metod. Do rozsahu vynálezu rovněž spadají anti-idiotypické protilátky specificky reagující s protilátkami proti chitináze.

Protilátky specificky interagující s chitin-vazebnou doménou jsou použitelné k detekci nebo kvantifikaci přítomnosti chitinázy, například při sandwich ELISA, a k detekci nebo kvantifikaci výskytu kvasinek nebo cizopasných hub, například přidáním chitin-vazebné domény interagující s kvasinkami nebo cizopasnými houbami a následným přidáním značené protilátky specificky interagující s touto chitin-vazebnou doménou. Detekce chitin-vazebné domény ve vzorcích lidské krve (plazmě nebo séru) může být korelována s nějakým standardním diagnostickým markerem onemocnění zahrnujícím chitinázu, například Gaucherovým onemocněním. V současnosti jsou výhodně používány protilátky 243Q a 243M produkované hybridomy 243Q (přístupové číslo _____) a 243M (přístupové číslo _____) a monoklonální protilátky, které kom-

petují s nebo se vážou do stejného epitopu rozpoznávaného protilátkami 243Q a 243M.

Vědecká hodnota informací vyplývající z uvedení sekvencí DNA a sekvencí aminokyselin podle vynálezu je zřejmá. Znalost sekvence cDNA pro chitinázu například umožňuje izolaci sekvencí genomových DNA kódujících jiné savčí chitinázy (a jim podobné proteiny) s využitím hybridizace DNA/DNA nebo polymerázovou řetězcovou reakcí (PCR). Je velmi pravděpodobné, že hybridizací DNA/DNA nebo PCR využívajících sekvence DNA podle vynálezu prováděných za standardních podmínek, bude možné izolovat DNA kódující alelické varianty lidské chitinázy, jiné strukturně příbuzné lidské proteiny vyznačující se chitin-vazebnou aktivitou podobnou chitináze a chitin-vazebné oblasti proteinů homologních k chitináze z jiných živočišných druhů. Sekvence DNA popsané v této přihlášce rovněž umožňují (homologní rekombinací nebo knockoutováním genů; viz. například Kapecchi, Science, 244:1288 až 1292, 1989) získání živočichů, kteří neexprimují funkční chitinázu, chitinázu exprimují nadměrně nebo exprimují různé varianty chitinázy. Tito živočichové mohou sloužit jako modely ke studiu aktivity chitinázy in vivo nebo ke studiu modulátorů chitinázy in vivo.

Vhodně značené polynukleotidy podle vynálezu mohou být použity při hybridizačních reakcích k detekci schopnosti buněk syntetizovat chitinázu. Polynukleotidy podle vynálezu mohou být rovněž základem diagnostických metod použitelných k identifikaci genetických změn v oblasti chitinázy, kde tyto změny jsou příčinou onemocnění. Vynález rovněž umožňuje přípravu antisense polynukleotidů použitelných k regulaci exprese chitinázy v buňkách, které chitinázu exprimují.

Vynález rovněž předpokládá, že chitin-vazebné fragmenty mohou být připojeny k nějakému heterologním peptidu. Připojení těchto fragmentů k nějaké části imunoglobulinu, na-

příklad ke konstantní oblasti, může být například využito terapeuticky. Jiným příkladem je připojení těchto fragmentů k polypeptidu použitelnému jako detekční značka nebo marker, jako například polypeptidu s enzymatickou aktivitou nebo polypeptidu zahrnujícímu nějaký detekovatelný epitop jako například epitop myc nebo epitop FLAG (Eastman Kodak).

Chitin-vazebné fragmenty mohou být rovněž připojeny k nějakému jinému proteinu a tím usnadnit purifikaci tohoto proteinu afinitní vazbou na chitinovou matrici. Tyto fúzní proteiny mohou být následně z kolony eluovány nebo mohou být od chitin-vazebné domény odštěpeny a odštěpený protein pak eluován (viz. například Chong a další, Gene, 192:271 až 281, 1997).

Fragmenty lidské chitinázy podle vynálezu mohou být rovněž využity jako látky specificky interagující s chitinem a to k identifikaci výskytu chitinu v biologických vzorcích. Další stránka vynálezu popisuje chitin-vazebné fragmenty chitinázy konjugované s nějakou detekovatelnou značkou jako například radioizotopem, fluoroforem, barvou, elektrondenzní sloučeninou nebo enzymem, které jsou uvedeny do kontaktu s testovaným vzorkem a přítomnost chitinu je analyzována kvalitativně nebo kvantitativně. Termín "konjugovaný" znamená "spojený kovalentní vazbou". Tyto techniky jsou v současnosti známé a jsou například ilustrovány v přihlášce US 5587292, která je zde uvedena záměnou za přenesení jejího celého obsahu do popisu tohoto vynálezu. Množství tímto způsobem detekovaného chitinu může indikovat množství patogenních hub v organizmu infikovaného pacienta. Dvěma fragmenty výhodně používanými při těchto stanoveních jsou chitin-vazebná doména o velikosti 54 aminokyselin zahrnující v lidské chitináze popsané v SEK. ID. Č.: 2 aminokyselinové zbytky 392 až 445 a chitin-vazebná doména o velikosti 49

aminokyselin zahrnující v lidské chitináze popsané v SEK. ID. Č.: 2 aminokyselinové zbytky 397 až 445.

Vynález rovněž popisuje konjugáty zahrnující chitin-vazebné fragmenty chitinázy a nějakou sloučeninu vhodnou pro diagnostiku jako například radioizotopy emitující gama záření nebo pozitronové záření pro radionukleární diagnostiku (například 157Gd, 55Mn, 162Dy, 52Cr, 56Fe, 111In, 97Ru, 67Ga, 68Ga, 72As, 89Zr, 201Tl, 99Tn, 90Y); cheláty paramagnetických kovů, sloučeniny značené nitroxylovou spinovou značkou a jiné látky (například Gd(III), Eu(III), Dy(III), Pr(III), Pa(IV), Mn(II), Cr(III), Co(III), Fe(III), Cu(II), Ni(II), Ti(III) a V(IV), GdDT-PA/dimeglumin[Magnevist™]) pro diagnostiku MRI; kontrastní látky pro diagnostiku založenou na rentgenovém záření, včetně CT (například sloučeniny obsahující brom nebo jod); a další látky v současnosti známé. Předpokládá se, že tyto konjugáty se budou vázat na chitin buněčné stěny kvasinek a budou tudíž využitelné ve stanoveních k detekci nebo lokalizaci kvasinek in vivo v organizmu savců.

Do rozsahu vynálezu rovněž spadá aplikace fragmentů chitinázy a terapeutických látek obsahujících tyto fragmenty do organizmu savců, zvláště pak lidí, za účelem léčby onemocnění vyvolaných patogeny obsahujícími chitin jako například plísněmi. Infekce plísněmi (mykózy) jako například kandidóza, aspergilóza, kokcidioidomykóza, blastomykóza, parakokcidioidomykóza, histoplasmóza, kryptokokóza, chromoblastomykóza, sporotrichóza, mukormykóza a dermatofytózy mohou být buď chronické nebo akutní. V organizmu hostitelů s oslabenou imunitou způsobují patogenní houby vážná, často smrtelná onemocnění. Pacienti s rakovinou podstupující chemoterapii, imunosuprimovaní jedinci a jedinci infikovaní virem HIV jsou náchylní k mykózám způsobených mikroorganizmy Candida, Aspergilus, Pneumocystis carnii a jinými. K

léčbě mykóz jsou používány amfotericin B a flukonazol, ale jejich použitelnost je limitována nepříznivými vedlejšími účinky, které jsou důsledkem toxicity těchto sloučenin. I přes léčbu amfotericinem B je úmrtnost na systemickou kandidózu vyšší než 50%. V současnosti známé živočišné modely plísňových onemocnění jsou popsány v příkladech 9 až 15.

Do rozsahu vynálezu rovněž spadají přípravky zahrnující fragmenty chitinázy používané k léčbě savců náchylných k nebo postižených plísňovými onemocněními. Vynález předpokládá, že fragmenty chitinázy mohou být konjugovány s dalšími konvenčními antifungálními sloučeninami včetně amfotericinu B a strukturně podobnými sloučeninami nystatinem a pimaricinem; 5-fluorcytosinu; derivátů azolu jako například flukonazolem, ketokonazolem, klotrimazolem, mikonazolem, ekonazolem, butokonazolem, oxikonazolem, sulkonazolem, terkonazolem, itrakonazolem a tiokonazolem; allylaminů-thiokarbamátů jako například tolnaftátem, naftifinem a terbinafinem; griseofulvinu; ciklopirox olaminu; haloproginu; kyseliny undecylenové; a kyseliny benzoové (viz. například Goodman a Gilman, The Farmacological Basis of Therapeutics, 9. vydání, McGraw-Hill, NY, 1996). Podle této stránky vynálezu slouží chitin-vazebné fragmenty jako vektory ke směrování známých fungicidních nebo fungistatických sloučenin k patogenním houbám obsahujícím chitin a mohou tudíž zefektivnit účinek těchto anti-fungálních látek pravděpodobně tím, že u zmíněných patogenních hub vyvolají větší citlivost vůči použitým sloučeninám. Snížení množství běžně používaných anti-fungálních sloučenin potřebného k dosažení požadovaného terapeutického účinku může umožnit použití těchto léčiv v méně toxických hladinách. Schopnost selektivního směrování na patogenní houby nebo kvasinky s využitím fragmentů chitin-vazebné domény rovněž umožňuje aplikaci těchto fragmentů konjugovaných s cytotoxickými sloučeni-

nami, které sami o sobě nejsou selektivně anti-fungální. Tato stránka vynálezu se týká konjugace chitin-vazebných fragmentů chitinázy k jakékoliv cytotoxické látce v současnosti známé, včetně radioizotopů (jako například 90Y, 188Re, 186Re, 199Au, 64Cu, 67Cu, 131I), toxinů a chemoterapeutik, která bude účinná vůči kvasinkám. Postupy v současnosti známými mohou být vhodné cytotoxické látky snadno identifikovány. Oproti použití chitin-vazebných domén chitináz z jiných organizmů je použití chitin-vazebné domény lidské chitinázy v těchto případech výhodnější, protože se předpokládá, že lidské polypeptidy budou v organizmu lidí neimunogenní.

Fragmenty chitin-vazebné domény mohou sami o sobě vykazovat antifungální aktivitu, a to narušením tvorby příčných vazeb v buněčné stěně kvasinek. Tyto fragmenty mohou být aplikovány samostatně nebo v kombinaci s jinými antifungálními látkami. Do rozsahu vynálezu rovněž spadají multimerní fragmenty chitin-vazebných domén, které jsou k tomuto účelu zvláště vhodné. Mezi tyto multimerní fragmenty patří fragmenty, které byly kovalentně zesíťovány chemicky nebo rekombinantně produkované polypeptidy zahrnující větší počet chitin-vazebných domén tandemově spojených. Aplikace fragmentů chitin-vazebných domén, buď monomerních nebo multimerních, může snížit množství současně aplikovaných antifungálních látek nezbytné k dosažení požadovaného terapeutického účinku.

Do rozsahu vynálezu tudíž spadá použití fragmentů chitinázy při přípravě léčiv k profylaxi nebo léčbě mykóz.

Terapeutické/farmaceutické přípravky spadající do rozsahu vynálezu zahrnují fragmenty chitinázy, které mohou být konjugovány s jinou terapeutickou látkou a fyziologicky přijatelným rozpouštědlem nebo nosičem a mohou rovněž zahrnovat jiné antifungální látky. Naznačená podávaná množství

by dostačovala k nahrazení endogenní chitinázové aktivity. Obecně přijímané dávkovací režimy jsou uvedeny v publikaci Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19. vydání, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. Podávané dávky se budou pohybovat v intervalu 1 µg/kg až 100 mg/kg tělesné hmotnosti a ve výhodném provedení pak v rozmezí přibližně 0,1 až přibližně 20 mg chitinázy na kilogram tělesné hmotnosti. Terapeutické přípravky podle vynálezu mohou být v závislosti na typu léčené infekce aplikovány různými způsoby, včetně aplikace subkutánní, intramuskulární, intravenózní, intrapulmonární, transdermální, intrathekální, lokální, orální nebo prostřednictvím čípků.

Vynález rovněž předpokládá, že nadměrná exprese chitinázy při Gaucherově onemocnění nebo v místech zánětu (jako například při revmatické arthritidě) může mít škodlivý vliv na extracelulární matrix a v těchto případech mohou být inhibitory chitinázové aktivity, včetně fragmentů chitinázy nebo inhibitorů vazby na chitin identifikované způsoby popsanými výše, terapeuticky účinné, například redukcí remodelace nebo destrukce extracelulární matrix.

cDNA kódující lidskou chitinázu byla izolovaná z cDNA knihovny makrofágů. Je známo, že makrofágy mají blízký vztah k lézím revmatické arthritidy (Feldman a další, Cell, 85:307 až 310, 1996) a produkty makrofágů jako například TNF-α mají na svědomí progresi tohoto onemocnění. V synoviu a chrupavkách pacientů postižených revmatickou arthritidou byl identifikován protein C-gp39, homologní k lidské chitináze. Ačkoliv přirozeným substrátem lidské chitinázy je pravděpodobně chitin z patogenních organizmů, tento enzym může rovněž působit na endogenní makromolekuly, které jsou přirozenou součástí extracelulární matrix. Předpokládá se například, že kyselina hyaluronová, hlavní složka extracelulární matrix, obsahuje jádro z oligomerů chitinu (Semino

a další, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:4548 až 4553, 1996; Varki, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:4523 až 4525, 1996). Chitináza se tudíž může účastnit degradace extracelulární matrix u onemocnění jakým je například revmatická arthritida. Tato úloha chitinázy může být stanovena měřením množství chitinázy a/nebo účinků aplikace chitinázy nebo inhibice chitinázy v synoviální tekutině izolované z kloubů pacientů postižených arthritidou. Množství endogenní chitinázy může být stanovováno enzymaticky nebo s využitím protilátek. Viskozita synoviální tekutiny může být měřena před a po vystavení působení chitinázy; snížení viskozity asociované s chitinázovou aktivitou by ukazovalo na přítomnost endogenního substrátu pro chitinázu. Modulace aktivity chitinázy tudíž může modulovat progresi poškození kloubů při revmatické arthritidě.

Do rozsahu vynálezu rovněž spadají způsoby screeningu inhibitorů chitinázové aktivity, které mohou být použitelné v případech popsaných v předchozím odstavci. Způsoby screeningu vzorků použitelné k identifikaci látek inhibujících chitinázu jsou například popsány v přihlášce WO95/34638, publikované 21. prosince 1995.

Příklady provedení vynálezu

Další stránky a výhody předkládaného vynálezu budou lépe srozumitelné po přečtení následujících ilustrativních příkladů. Příklad 1 popisuje izolaci cDNA klonů lidské chitinázy z cDNA knihovny lidských makrofágů. V příkladu 2 je uvedena topologie exprese genu pro chitinázu v různých lidských tkáních. Příklad 3 popisuje rekombinantní expresi genu pro lidskou chitinázu v prokaryotických buňkách a purifikaci vzniklého produktu. V příkladu 4 je uveden postup rekombinantní produkce lidské chitinázy v kvasinkách. Příklad 5 popisuje rekombinantní expresi genu pro lidskou chi-

tinázu v savčích buňkách a purifikaci vzniklého produktu. Příklad 6 popisuje produkci polypeptidových analogů a fragmentů lidské chitinázy peptidovou syntézou nebo rekombinantními technikami. Příklad 7 popisuje produkci fragmentů a analogů lidské chitinázy vykazující chitin-vazebnou aktivitu. V příkladu 8 je uveden postup přípravy monoklonálních protilátek specificky reagujících s lidskou chitinázou. Příklad 9 popisuje stanovení použitelné k měření katalytické aktivity chitinázy. Příklad 10 popisuje stanovení antifungální aktivity testovaných látek in vitro. Příklad 11 popisuje stanovení antifungální aktivity testovaných látek in vivo na myším modelu a příklady 12 až 15 popisují králičí modely invazivní aspergilózy, diseminované kandidózy, oftalmitidy vyvolané zástupci rodu Candida a endokarditidy vyvolané zástupci rodu Candida. Příklad 16 uvádí srovnání chitin-vazebných a hydrolytických aktivit kompletní lidské chitinázy a jejích C-koncového fragmentu. Příklad 17 popisuje konjugaci chitin-vazebných fragmentů k jiným sloučeninám.

Příklad 1

Izolace klonů cDNA kódujících chitinázu

cDNA knihovna byla připravena z makrofágů monocytární linie z periferní krve postupem popsaným v publikaci Tjoelker a další, Nature, 374:549 až 552, 1995. Klony z této knihovny byly vybrány náhodně a z jednotlivých klonů byla izolována plazmidová DNA. S využitím primeru JHSP6, který je komplementární k sekvenci přiléhající ve vektoru pRc/CMV (Invitrogen, San Diego, CA) ke klonovacímu místu pro cDNA, byla automatickým sekvenátorem (model 373, Applied Biosystems, Foster City, CA) u každého klonu stanovena sekvence přibližně 300 až 500 bází od konce DNA.

JHSP6: 5´-GACACTATAGAATAGGGC-3´ (SEK. ID. Č.: 5)

Za účelem nalezení podobnosti se známými geny byly nukleotidová a odvozená aminokyselinová sekvence těchto cDNA klonů porovnány se sekvencemi v databázích nukleotidů a peptidů. Srovnání sekvencí bylo provedeno službou BLAST Národního centra pro biotechnologické informace s využitím přiřazovacího algoritmu podle Altschul a další, J. Mol. Biol., 215:403 až 410, 1990. Klon MO-119 vykazoval vysokou míru homologie s několika různými sekvencemi, včetně prekurzoru proteinu YM-1 sekretovaného myšími makrofágy (v databázi Genbank pod přístupovým číslem M94584), gp-39 z lidských chrupavek (Hakala a další, viz. výše), glykoproteinu vejcovodů ovcí, hovězího dobytka a lidí (DeSouza a další, viz. výše) a chitináz parazitů (Oncocerce, v databázi Genbank pod přístupovým číslem U1469), vos (Chelonus, v databázi Genbank pod přístupovým číslem U10422), rostlin (Nicotiana, v databázi Genbank pod přístupovým číslem X77111) a baktérií (Serratia, v databázi Genbank pod přístupovým číslem Z36295). Nejvyšší míra homologie byla pozorována u savčích genů kódujících proteiny homologní k chitináze, ale postrádající chitinázovou aktivitu. Další sekvenční analýza klonu MO-911 podporuje domněnku, že tento klon zahrnuje část kódující oblasti homologu lidské chitinázy.

DNA sekvence klonu pMO-218 (v souladu Budapešťskou úmluvou s ATCC, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852, USA, uložena 7. června, 1996, pod přístupovým číslem 98077) je uvedena jako SEK. ID. Č.: 1 a kóduje aminokyselinovou sekvenci uvedenou jako SEK. ID. Č.: 2. Zdá se, že MO-218 zahrnuje celou kódující oblast cDNA lidské chitinázy (nukleotidy 2 až 1399 v SEK. ID. Č.: 1), včetně předpokládané signální sekvence o délce 21 aminokyselin následované 445 kódovanými aminokyselinami (aminokyselinové zbytky 1 až 445 v SEK. ID. Č.: 2). Dvacet jedna aminokyselin následujících po předpokládané signální sekvenci se přesně shoduje s N-

koncovou sekvencí purifikované lidské chitotriosidázy popsané v publikaci Renkema a další, viz. výše. Renkema a další rovněž popisují sekvenci 21 aminokyselin fragmentu získaného štěpením lidské chitotriosidázy trypsinem, která se dokonale shodují se sekvencí aminokyselin 157 až 177 v klonu MO-218 (SEK. ID. Č.: 2). Boot a další publikovali klonování cDNA lidské chitotriosidázy, kde tato cDNA kóduje sekvenci v podstatě identickou se sekvencí MO-218. Sekvence MO-218 zahrnuje ve srovnání se sekvencí popsanou v publikaci Boot a další navíc 14 nukleotidů na 5´ konci a další odlišnost je v nukleotidu 330 v kódující oblasti.

Za účelem, potvrzení, že MO-218 skutečně zahrnuje celou kódující oblast připravené cDNA byla syntetizována sonda P1 značená ^{32}P (TGGGATCATCAGCAGGACCATGAAACCTGCCCAGGCCACAGACCGCACCAT, SEK. ID. Č.: 6), která je komplementární k nukleotidům 2 až 52 v klonu MO-218 (SEK. ID. Č.: 2). Sonda P1 byla navržena tak, aby hybridizovala s klony, které jsou na 5´ konci přinejmenším tak dlouhé jako klon MO-218. Tato sonda byla přes noc při 42°C hybridizována s částí (přibližně 30000 klonů) knihovny cDNA z lidských makrofágů popsané v předchozím textu ve 40% formamidu a hybridizačním pufru (5 x SSPE, 10 x Denhardtův roztok, 100 µg/ml denaturované DNA ze spermií lososa a 2% SDS). Po promytí filtrů byly vybrány tři klony poskytující pozitivní hybridizační signál a tyto klony byly osekvenovány. Nejdelší klon byl označen pMO-13B (v souladu Budapešťskou úmluvou s ATCC, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852, USA, uložen 7. června, 1996, pod přístupovým číslem 12301). DNA sekvence klonu pMO-13B je uvedena jako SEK. ID. Č.: 3 a kóduje aminokyselinovou sekvenci uvedenou jako SEK. ID. Č.: 4. Ve srovnání s klonem MO-218 obsahuje klon pMO-13B navíc na 5´ konci 25 nukleotidů. Další změnou oproti klonu MO-218 je záměna nukleotidu 330 (odpo-

vídá nukleotidu 305 klonu MO-218 popsaného sekvencí SEK. ID. Č.: 1) v klonu MO-13B (SEK. ID. Č.: 3), kde tato záměna mění aminokyselinu na pozici 80 v maturním proteinu z glycinu (v SEK. ID. Č.: 2) na serin (v SEK. ID. Č.: 4).

Příklad 2

Lokalizace exprese genu pro chitinázu v lidských tkáních

Identifikace tkání, ve kterých je exprimována lidská chitináza, byla provedena metodou Northern blot. Za standardních podmínek (podle doporučení výrobce) byl Northern blot se vzorky mRNA z různých lidských tkání (Clontech, Palo Alto, CA) hybridizován z celou kódující oblastí klonu MO-218. Maximální hybridizace byla pozorována v plicní tkáni (+++) a vaječnících (+++), menší intenzita (+) pak thymu a placentě. Velikost hybridizujících mRNA z plic, vaječníků a thymu byla 2,0 kb, což je v dobré shodě s velikostí klonované cDNA (1,6 kb nebo přibližně 1,8 kb včetně polyA konce). Velikost hybridizujících mRNA z placenty byla podstatně menší - přibližně 1,3 kb. Hybridizace nebyla pozorována ve slezině, prostatě, varlatech, tenkém střevu, tlustém střevu, leukocytech periferní krve, srdci, mozku, játrech, kosterních svalech, ledvinách nebo slinivce. Exprese chitinázy v plicích odpovídá její ochranné roli vůči patogenním organizmům obsahujícím chitin, jelikož plíce jsou primární cestou vstupu fungálních patogenů do organizmu.

Příklad 3

Produkce rekombinantní lidské chitinázy v bakteriálních buňkách

Maturní kódující oblast z klonu MO-218 byla upravena tak, aby mohla být v E.coli exprimována ve formě analogu zkráceného z N-konce. S využitím primeru o sekvenci odpovídající nukleotidům 65 až 88 v cDNA klonu chitinázy MO-218,

kde před tuto sekvenci byl předřazen kodon pro methionin a restrikční místo XbaI (5´-TACATCTAGAATTATGGCAAAACTGGTCTGCTACTTCACC-3´, SEK. ID. Č.: 7) a reverzního primeru v klonu MO-218 komplementárního k nukleotidům 1163 až 1183 a následovaného stop kodonem a restrikčním místem HindIII (5´-AGATCTAACCTTAGGTGCCTGAAGACAAGTATGG-3´, SEK. ID. Č.: 8) byl PCR vytvořen fragment chitinázy použitelný pro expresi. V reverzním primeru je na pozici 25 adenin, zatímco v sekvenci MO-218 se na tomto místě vyskytuje guanin. Z toho vyplývá, že ve fragmentu vytvořeném s využitím tohoto primeru bude na pozici 1172 v sekvenci MO-218 místo cytosinu thymidin. Důsledkem této skutečnosti rovněž je, že fragment chitinázy kódovaný zmíněnou sekvencí bude v pozici 370 (počítáno v maturním proteinu) obsahovat serin namísto prolinu, jak je tomu v klonu MO-218. Získaný fragment DNA byl rozštěpen enzymy XbaI a HindIII a zaklonován do plazmidu pAraBAD (rovněž označovaného jako pAraCB).

Plazmid pAraCB byl připraven následovně. Plazmid pUC19 byl upraven tak, aby obsahoval arabinózový promotor a kódující sekvence AKAP 79. Arabinózový promotor (Wilcox a další, Gene, 34:123 až 128, 1985; Wilcox a další, Gene, 18:157 až 163, 1982) a gen araC byly metodou PCR amplifikovány z arabinózového operonu BAD Salmonella typhimurium ve formě fragmentu ohraničeného restrikčními místy EcoRI/XbaI. Při tomto postupu byly využity primery araC-2 (SEK. ID. Č.: 9) a arab-1 (SEK. ID. Č.: 10):

SEK. ID. Č.: 9

araC-2TACAGAATTCTTATTCACATCCGGCCCTG

SEK. ID. Č.: 10

arab-1TACATCTAGACTCCATCCAGAAAAACAGGTATGG

Primer araC-2 kóduje restrikční místo EcoRI a stop kodon pro produkt genu araC. Primer arab-1 kóduje doménu vážící se na ribozom a restrikční místo XbaI. PCR provedenou s těmito primery byl získán fragment o velikosti 1,2 kb, který byl po štěpení restrikčními enzymy EcoRI a XbaI zaklonován do vektoru pUC19 (New England Biolabs, Beverly, MA) rovněž štěpeného zmíněnými enzymy. Takto připravený plazmid byl označen pAraCB a obsahoval polyklonovací místo (SEK. ID. Č.: 11) ohraničené na 5´ konci restrikční místem XbaI a na 3´ konci restrikční místem HindIII.

polyklonovací místo araCB
SEK. ID. Č.: 11
TCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTT

Transformované buňky obsahující takto připravený expresívní plazmid (pAraMO218) byly indukovány přídavkem arabinózy a kultivovány při 37°C. Inkluzní tělíska z těchto buněk obsahovala 39 kDa protein, který je zkrácenou formou chitinázy (konstruován tak, aby byl tvořen 373 namísto 445 aminokyselinami). Tento fragment chitinázy obsahuje 4 cysteinové zbytky, zatímco intaktní chitináza obsahuje těchto zbytků deset. Produkovaná inkluzní tělíska byla oddělena od buněčné kultury E.coli a získané proteiny byly rozděleny elektroforézou na SDS polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE). Proužek o velikosti 39 kDa byl přenesen na PVDF membránu a osekvenován z N-konce. Většina (přibližně dvě třetiny) tohoto materiálu začínala sekvencí odpovídající aminokyselinové sekvenci N-konce lidské chitinázy. Zbylý materiál odpovídal kontaminujícímu proteinu z E.coli, kterým byl porin. Takto připravená rekombinantní chitináza byla použita pro přípravu polyklonálních a monoklonálních protilátek (tato příprava je popsána v příkladu 8).

Jestliže byly buňky, transformované expresívním plazmidem Ara-chitináza, kultivovány při 25°C, nebyla pozorována produkce inkluzních tělísek a exprese rekombinantního proteinu byla snížena z původních deseti procent na přibližně jedno procento z celkového buněčného proteinu. Materiál produkovaný při 25°C nicméně vykazoval chitinázovou aktivitu.

Příklad 4

Produkce rekombinantní lidské chitinázy v kvasinkách

V následujícím textu jsou uvedeny ukázky postupů pro rekombinantní expresi lidské chitinázy v kvasinkách a purifikaci produkovaného rekombinantního proteinu. S využitím PCR nebo spojujících oligonukleotidů byla kódující oblast lidské chitinázy zaklonována do vektorů pro expresi v Saccharomyces cerevisiae tak, že k sekvenci kódující N-konec lidské chitinázy byla funkčně připojena vedoucí sekvence (signální peptid). Mezi signální peptidy patří například SUC2 nebo ekvivalentní vedoucí sekvence se štěpícím místem pro signální peptidázu nebo pre-pro-alfa faktor nebo jiné komplexní vedoucí sekvence zahrnující pre-sekvenci nebo signální peptid a pro-sekvenci nebo sekvenci se štěpným místem KEX2. DNA kódující signální sekvenci může být získána PCR nebo oligonukleotidovou syntézou. DNA kódující vedoucí sekvenci pre-pro-alfa faktoru byla připravena PCR s využitím primeru zahrnujícího oligonukleotidy 1 až 20 v sekvenci genu pro alfa faktor a primeru o sekvenci komplementární k nukleotidům 255 až 235 tohoto genu (Kurjan a Herskowitz, Cell, 30:933 až 943, 1982). Tato kódující sekvence signálního peptidu pre-pro-alfa faktoru spolu s fragmenty sekvence kódující lidskou chitinázu byly zaligovány do plazmidu obsahujícího promotor pro alkohol dehydrogenázu kvasinek (ADH2) tak, aby tento promotor řídil expresi výsledného

fúzního proteinu. Jak uvádějí Rose a Broach (Meth. Enz., 185:234 až 279, D. Goeddel, ed., Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1990), tento vektor dále, po směru transkripce za klonovacím místem, obsahuje terminátor transkripce ADH2, počátek replikace 2-μ, nějaký selekční marker například TRP1, CUP1 nebo LEU-2 (nebo LUE2-d) nebo ekvivalentní gen, kvasinkové geny REP1 a REP2, gen pro beta laktamázu z E.coli a počátek replikace pro E.coli. Geny pro beta laktamázu a TRP1 umožňují selekci v baktériích respektive v kvasinkách. Geny REP1 a REP2 kódují proteiny hrající úlohu v udržování počtu kopií plazmidu v buňce.

V kódující oblasti pro chitinázu mohou být rovněž zvolena i jiná místa fúze. Za účelem zvýšení homogenity produktu, zvýšení specifické aktivity nebo změny substrátové specifity mohou být připraveny zkrácené verze kódující oblasti.

S využitím známých postupů, například působení octanu lithného (Sterarns a další, Meth. Enz., viz. výše, strany 280 až 297) a podobně, jsou konstrukty DNA popsanými v předcházejících odstavcích transformovány buňky kvasinek. Po vyčerpání glukózy z kultivačního média je indukován promotor ADH2 (Price a další, Gene, 55:287, 1987). Pre-pro-alfa sekvence nebo jiné vedoucí sekvence umožňují sekreci fúzního proteinu a polypeptidový řetězec maturované lidské chitinázy je uvolňován z buněk. Signální peptid je odštěpen signální peptidázou nebo v případě pre-pro-alfa sekvence proteázou KEX2 (Bittner a další, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:5330 až 5334, 1984).

V aminokyselinové sekvenci maturované lidské chitinázy se nacházejí dvě místa s po sobě jdoucími bazickými aminokyselinami, a to na pozici 107-108 (Lys-Arg) a 209-210 (Arg-Lys), která mohu být v průběhu sekrece proteolyticky štěpena proteázou KEX2. Za účelem stabilizace a/nebo zvýše-

ní množství produktu sekretovaného z buněk mohou být tyto sekvence mutovány tím, že jsou odstraněna potenciální místa proteolýzy (Gillis a další, Behring Inst. Mitt., č. 83:1 až 7, 1988) nebo expresí chitinázy bez provedení takových mutací, ale v hostitelských buňkách deficientních v KEX2 aktivitě. Takové hostitelské buňky mohu být získány buď screeningem mutantů neexprimujících proteázu KEX2 nebo manipulací místa pro KEX2 v genomové DNA a to technikami "nahrazení genu/porušení genu" (Orr-Weaver a další, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:6354 až 6358, 1981).

Rekombinantní chitináza může být ze Saccharomyces cerevisiae sekretována s využitím obdobných vektorů obsahujících alternativní promotory, jako například PRB1, GAL4, TPI nebo jiné vhodné silné promotory, nebo jako fúzní protein s množstvím jiných vedoucích sekvencí (Sleep a další, Bio/Technol., 8:42 až 46, 1990).

Mezi jiné hostitelské buňky vhodné pro expresi patří Kluyveromyces lactis, Schizosaccharomyces plombe, Pichia pastoris a zástupci rodů Hansenula nebo Aspergillus. Tyto systémy pro expresi rekombinantních proteinů zahrnují příslušný hostitelský organizmus a vhodný, autonomně se replikující vektor (například Falcone a další, Plasmid, 15:248 až 252, 1988), nebo expresívní kazety schopné mnohonásobné integrace do genomové DNA. Tyto systémy rovněž využívají k sekreci do kultivačního média stejné typy signálních sekvencí nebo vedoucích peptidů popsaných v předchozím textu.

Sekretovaná lidská chitináza je z kultivačního média purifikována například postupy použitými při purifikaci chitinázy z bakteriálních supernatantů nebo supernatantů savčích buněk (viz. příklady 3 a 5).

Jinou možností je expresę rekombinantní chitinázy v cytoplazmě Saccharomyces cerevisiae nebo podobných hostitelských buněk a následná purifikace z těchto lyzovaných bu-

něk. V průběhu purifikaci může být protein refoldován tak, aby bylo dosaženo dostatečné specifické aktivity.

Příklad 5

Produkce rekombinantní lidské chitinázy v savčích buňkách

A. Exprese v buňkách COS

Byly izolovány klony MO-218 a MO-13B. Oba tyto klony obsahují cDNA kódující nezkrácenou lidskou chitinázu připojenou na 3´ konec promotoru CMV v plazmidu pRc/CMV. Třetí plazmid, který odpovídá C-koncovému fragmentu exprimovanému v bakteriálních buňkách z příkladu 3, byl připraven následujícím postupem. S využitím oligonukleotidového primeru 218-1 (CGCAAGCTTGAGAGCTCCGTTCCGCCACATGGTGCGGTCTGTGGCCTGGG, SEK. ID. Č.: 12) zahrnujícího restrikční místo HindIII a sekvenci odpovídající nukleotidům 2 až 23 v cDNA klonu chitinázy MO-218 (SEK. ID. Č.: 1) a reverzního primeru T-END (GACTCTAGACTAGGTGCCTGAAGGCAAGTATG, SEK. ID. Č.: 13) v klonu MO-218 komplementárního k nukleotidům 1164 až 1183 a následovaného stop kodonem a restrikčním místem XbaI, byl klon MO-218 amplifikován PCR. Amplifikovaná DNA byla elektroforeticky purifikována, štěpena restrikčními enzymy XbaI a HindIII a zaklonována do vektoru pRc/CMV (Invitrogen, San Diego, CA) štěpeného stejnými restrikčními enzymy. Místa spojení výsledného klonu byla sekvenována s využitím sekvenátoru model 737 (Applied Biosystems, Foster City, CA) a bylo potvrzeno, že tento klon kóduje sekvenci odpovídající sekvenci uvedené jako SEK. ID. Č.: 14.

Všechny tři plazmidy byly použity k transientní transfekci buněk COS metodou využívající DEAE dextran (viz. například Sambrook a další, Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2. vydání, Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989). Po třech dnech kultivace

při 37°C byla, postupem popsaným v příkladu 9, in vitro v kultivačních médiích stanovena chitinázová aktivita. V každé z kultur byla detekována významná hladina chitinázové aktivity (600 až 800 mU/ml/min) a u každého z konstruktů byla pozorována srovnatelná množství exprimovaného produktu.

Rekombinantní lidská chitináza byla purifikována následujícím způsobem. Pět dní po transfekci COS buněk plazmidem pRc/CMV-MO-13B bylo kultivační médium separováno a zředěno stejným objemem vody. Takto zředěné médium bylo aplikováno na kolonu Q-Sepharózy Fast Flow (Pharmacia Biotech, Uppsala, Švédsko) ekvilibrovanou pufrem o složení 25 mM Tris, 10 mM chlorid sodný, 1 mM EDTA, pH 8,0. Přibližně 95% chitinázové aktivity proteklo přes kolonu bez navázání. Tento vzorek (frakce proteklá přes Q-Sepharózu) byl upraven na 1,2 M koncentraci síranu amonného v 25 mM Trisu, pH 8,0. Při nízké koncentraci soli byla eluována jedna frakce (měřeno absorbancí při 280 nm) s chitinázovou aktivitou. Čistota tohoto materiálu byla vyšší než 85% (stanoveno SDS-PAGE) o tato frakce obsahovala přibližně 60% chitinázové aktivity. S využitím membrány s MWCO 10000 (Ultrafree™ 10K, Millipore Corp., Bedford, MA) byl vzorek zakoncentrován a převeden do pufru o složení 20 mM Tris, 150 mM chlorid sodný, pH 8,0. U takto připraveného vzorku byla následně in vitro testována enzymatická a anti-fungální aktivita postupy popsanými v příkladech 9 a 10. Chitotriosidázová aktivita takto připraveného vzorku byla 90 nmol/min na mg proteinu.

B. Exprese v buňkách CHO

Gen pro chitinázu byl vložen do vektoru pDEF1 (tento je popsán v příkladu 4 v přihlášce US 08/847218, podané 1. května, 1997, která je zde uvedena záměnou za přenesení jejího celého obsahu do popisu tohoto vynálezu) tak, že z

plazmidu pRc/CMV/MO-13B byl restrikčními enzymy HindIII/XbaI vyštěpen 1,77 kb fragment genu kódující nezkrácenou chitinázu a tento fragment byl zaligován do vektoru pDEF1 štěpeného stejnými dvěma enzymy. Takto připravený plazmid byl označen pDEF1/CTN.1. Zmíněný HindIII/XbaI fragment o velikosti 1,77 kb byl rovněž zaligován do vektoru pHDEF1 štěpeného restrikčními enzymy HindIII/XbaI a výsledný konstrukt byl označen pHDEF1/CTN.1. Plazmid pHDEF1 se od plazmidu pDEF1 liší pouze ve dvou částech: 1) v plazmidu pHDEF1 nahrazuje EheI/SalI fragment o velikost 2 kb odvozený z plazmidu pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA) obsahující gen pro rezistenci vůči hygromycinu fragment PmeI/SalI o velikosti 19 bp z pDEF1; 2) v plazmidu pHDEF1 je exprese genu pro dihydrofolát reduktázu (DHFR) řízena zkráceným promotorem SV40 umístěným na NheI/Asp718 fragmentu o velikosti 120 bp. Tento fragment nahrazuje odpovídající NheI/Asp718 fragment o velikosti 212 bp z pDEF1 a byl připraven PCR amplifikací 171 bp fragmentu s využitím primerů 94-26 (5´-TGATACGGTACCGCCCCATGGCTGACTA-3´, SEK. ID. Č.: 16, obsahuje nově zavedené restrikční místo Asp718) a 94-27 (5´-GCAAGTTTGGCGCGAAATCG-3´, SEK. ID. Č.: 17). Při této reakci byla jako templát použita DNA z plazmidu pDC1 (popsán v příkladu 4 v přihlášce US 08/847218, podané 1. května, 1997), který obsahuje kazetu SV40-DHFR. Získaný produkt PCR reakce o velikosti 171 bp byl následně štěpen restrikčními enzymy NheI a Asp718.

Buněčná linie DG44 odvozená z ovarií čínského křečka (CHO), která neexprimuje DHFR, byla transfekována plazmidem pDEF1/CTN.1 postupem popsaným v příkladu 5 v přihlášce US 08/847218, podané 1. května, 1997. Tato linie buněk CHO DG44 byla rovněž transfekována plazmidem pHDEF1/CTN.1 a následně pak selektována následujícím upraveným postupem. Nejprve byly v médiu DMEM/F-12 doplněném 2 až 10% FBS obsa-

hujícím hygromycin (Calbiochem, San Diego, CA) v koncentraci 800 mg/ml a rovněž obsahujícím hypoxanthin a thymidin (toto médium nebylo tudíž selektivní pro gen kódující DHFR) selektovány pouze buňky rezistentní vůči hygromycinu. Po selekci transfektantů rezistentních vůči hygromycinu byly tyto buňky následně selektovány kultivací v médiu postrádajícím hypoxanthin a thymidin. Takto vyselektované CHO buňky exprimující DHFR a rezistentní vůči hygromycinu byly dále selektovány v médiu obsahujícím nejprve 10 nM, poté 20 nM a nakonec 50 nM methotrexát, čímž bylo dosaženo selekce buněk exprimujících větší množství chitinázy.

Rekombinantní lidská chitináza (rH-chitináza) byla ze supernatantu z kultivace buněk CHO transfekovaných pHDEF1/CTN.1 purifikována následujícím způsobem. Při přípravě na chromatografii na anexu byl supernatant zředěn v poměru 1:3 pufrem o složení 20 mM Tris, pH 7,0 (pufr A). Kolona pro anexovou chromatografii, naplněná Q-Sepharózou Fast Flow (Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ), byla ekvilibrována pufrem A a na 1 litr nosiče bylo aplikována 15 litrů zředěného supernatantu. rH-chitináza byla zachycena ve frakci proteklé přes sloupec Q-Sepharózy a složení této frakce bylo upraveno na výsledné koncentrace 5% polyethylenglykol (PEG) 400 (Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, NJ), 30 mM octan sodný, pH 4,3. Kolona pro katexovou chromatografii, naplněná CM-Sepharózou Fast Flow (Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ) byla ekvilibrována pufrem o složení 30 mM octan sodný, 5% PEG 400, pH 4,3 (pufr B). Vzorek rH-chitinázy byl na sloupec CM-Sepharózy nanesen v množství 1 mg na ml nosiče a rH-chitináza byla z nosiče eluována pufrem o složení 40 mM Tris, 5% PEG 400, pH 7,5 (pufr C). Následně byl vzorek rH-chitinázy pro hydrofobní chromatografii upraven přídavkem $(NH_4)_2SO_4$ na výslednou koncentraci 1,5 M. Kolona naplněná nosičem Macro-Prep Methyl

H1C Support (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) byla ekvilibrována pufrem o složení 20 mM Tris, 5% PEG 400, pH 7,0 (pufr D). Vzorek rH-chitinázy byl na sloupec nosiče Macro-Prep Methyl H1C nanesen v množství 1 mg na ml nosiče. Kolona byla promyta pufrem D obsahujícím 1,1 M $(NH_4)_2SO_4$ a rH-chitináza byla z nosiče eluována pufrem D obsahujícím 0,2 M $(NH_4)_2SO_4$. Filtrací přes membránu byl purifikovaný eluát převeden do pufru o složení 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,0 (pufr E).

Příklad 6

Produkce analogů a fragmentů lidské chitinázy

Polypeptidové analogy a fragmenty lidské chitinázy byly připraveny technikami popsanými v předchozích příkladech. Přesněji řečeno, polynukleotidy kódující lidskou chitinázu byly známými metodami, například cílenou mutagenezí a polymerázovou řetězcovou reakcí, modifikovány tak, aby kódovaly požadované peptidové analogy. Byly rovněž připraveny C-koncové a N-koncové delece, například odstraněním vhodné části polynukleotidové kódující sekvence (například Sambrook a další, viz. výše, kapitola 15). Takto modifikované polynukleotidy jsou exprimovány a analogy nebo fragmenty rekombinantních polypeptidů jsou purifikovány postupy popsanými v předchozích příkladech.

Aminokyselinové zbytky důležité pro aktivitu lidské chitinázy jsou identifikovány například podle homologie s jinými chitinázami nebo náhradou aminokyselinových zbytků v nativní lidské chitináze alaniny. Vzhledem ke schopnosti vytvářet disulfidické můstky a stabilizovat sekundární struktury jsou cysteiny často kritické pro udržení funkční integrity proteinů. Za účelem zjištění, které z cysteinů v lidské chitináze jsou nepostradatelné pro enzymovou aktivitu, byl každý cystein jednotlivě mutován na serin.

Postupem popsaným v příkladech 3 a 5, tj. zavedením stop kodonu za kodon pro aminokyselinu 373, byl připraven fragment maturované lidské chitinázy o velikosti 39 kDa zkrácený z C-konce. Tento 39 kDa fragment postrádá, ve srovnání s nezkráceným proteinem, 72 C-koncových aminokyselin, včetně šesti cysteinů, a přesto si ve srovnání s nezkrácenou rekombinantní lidskou chitinázou zachovává podobnou specifickou aktivitu. Tento výsledek naznačuje, že chybějících 72 C-koncových aminokyselinových zbytků, včetně šesti cysteinů, není pro enzymatickou aktivitu nezbytných.

Mohou být připraveny další delece C-koncových aminokyselin, například štěpením 3´ konce sekvence kódující zkrácenou lidskou chitinázu popsané v příkladu 3 exonukleázou III v různých časových intervalech a následnou ligací takto zkrácených kódujících sekvencí do plazmidové DNA kódující stop kodony ve všech třech čtecích rámcích. N-koncové delece jsou připraveny podobným postupem štěpením 5´ konce zmíněné kódující sekvence a následnou ligací štěpených fragmentů do plazmidu obsahujícího proti směru transkripce od těchto fragmentů promotorovou sekvenci a startovní methionin. Tyto N-koncové deleční analogy nebo fragmenty mohou být rovněž exprimovány ve formě fúzních proteinů.

Jinou možností je příprava polypeptidových analog lidské chitinázy celkovou nebo částečnou chemickou syntézou peptidů s využitím technik v současnosti známých (viz. například syntéza IL-8 v publikaci Clark-Lewis a další, J. Biol. Chem., 266:23128 až 23134, 1991; syntéza IL-3 v publikaci Clark-Lewis a další, Science, 231:134 až 139, 1986; a syntéza ligací popsaná v publikaci Dawson a další, Science, 266:776 až 779, 1994). Tyto postupy syntézy rovněž umožňují zavedení nových, přirozeně se nevyskytujících aminokyselin a jiných modifikací.

Biologické aktivity polypeptidových analogů lidské chitinázy, včetně aktivity enzymatické, anti-fungální a remodelingu extracelulární matrix, jsou stanovovány v současnosti používanými technikami, jako například postupy popsanými v příkladech 9 až 15 uvedených v dalším textu.

Příklad 7

Produkce chitin-vazebných fragmentů a analogů lidské chitinázy

Umístění chitin-vazebné domény v lidské chitináze bylo určováno tak, že byly konstruovány fúzní proteiny obsahující část lidské chitinázy zkrácenou z N-konce a u těchto produktů byla testována chitin-vazebná aktivita. Následujícím postupem byl nejprve vytvořen chimérický protein zahrnující nezkrácenou sekretovanou alkalickou fosfatázu (SEAP; na N-konci tohoto chimérického konstruktu) (Berger a další, Gene, 66:1 až 10, 1988) připojenou k 99 C-koncovým aminokyselinám lidské chitinázy (na C-konci tohoto chimérického konstruktu). SEAP slouží v tomto chimérickém produktu jako detekovatelná značka.

S využitím primerů SEAP Start (SEK. ID. Č.: 18) a SEAP Stop (SEK. ID. Č.: 19), které zavádějí na 5´ konec restrikční místo HindIII a na 3´ konec polyklonovací místo, byla z kontrolního plazmidu pSEAP2 (Clontech, Palo Alto, CA) PCR reakcí amplifikována DNA kódující SEAP. Při PCR bylo použito 100 ng templátové DNA, 1 µg každého z primerů, 0,125 mM jednotlivé dNTP, 10 mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM $MgCl_2$ a 2,5 jednotky polymerázy Taq. Prvním krokem byla denaturace při 94°C po dobu 4 minut a poté následovalo 30 cyklů amplifikace: 1 minuta při 94°C, 1 minuta při 60°C a 2 minuty při 72°C. Takto připravená DNA byla zaklonována do míst HindIII a ApaI ve vektoru pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA) a vzniklý produkt byl označen pcDNA-SEAP. DNA kódující

99 C-koncových aminokyselin lidské chitinázy (aminokyselinové zbytky 347 až 445) byla amplifikována PCR za podmínek uvedených výše a s využitím primerů popsaných v tabulce uvedené dále v textu (tyto primery zavádějí na 5´ konec a 3´ konec restrikční místa EcoRI respektive XbaI). Tato DNA kódující chitinázu byla zaklonována do míst EcoRI a XbaI v polyklonovací oblasti plazmidu pcDNA-SEAP.

Výsledným konstruktem kódujícím uvedený chimérický protein byly tranzientně transfekovány buňky COS7 1,5 hodinovou inkubací v DMEM (Dulbecco´s modified Eagle medium) obsahujícím 0,5 mg/ml DEAE dextranu, 0,1 mM chloroquin a 10 µg plazmidové DNA. Následně byly buňky na 45 sekund vystaveny působení 10% DMSO ve fyziologickém roztoku pufrovaném fosfátovým pufrem, promyty bezsérovým médiem a inkubovány v DMEM doplněném 1 mM glutaminem, 100 U/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu a 10% fetálním telecím sérem. Po čtyřech dnech byla postupem popsaným v publikaci Flanagan a Leder (Cell, 63:185 až 194, 1990) v kultivačním médiu stanovena aktivita SEAP. Tato aktivita byla dobře detekovatelná. Inkubace tohoto kultivačního média obsahujícího zmíněný fúzní protein s nerozpustným chitinem (Sigma, St. Louis, MO) po dobu 1 hodiny při 4°C měla za následek precipitaci více než 80% aktivity SEAP. Tento výsledek ukazuje, že celá chitin-vazebná doména spadá do oblasti 99 C-koncových aminokyselin lidské chitinázy.

PCR byly připraveny další zkrácené verze DNA kódující chitin-vazebné domény a tyto byly exprimovány jako fúzní proteiny s SEAP, jak je uvedeno v předchozím textu. U těchto fúzních proteinů byla stanovována chitin-vazebná aktivita a získané výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1

Testované zkrácené konstrukty	Použité primery	Chitin-vazebná aktivita
Aminokyseliny 347 až 445	SEAP CBD 1149 (SEK. ID. Č.: 20) a Hu Chit Stop (SEK. ID. Č.: 26)	+
Aminokyseliny 374 až 445	SEAP CBD 1231 (SEK. ID. Č.: 21) a Hu Chit Stop (SEK. ID. Č.: 26)	+
Aminokyseliny 392 až 445	SEAP CBD 1285 (SEK. ID. Č.: 22) a Hu Chit Stop (SEK. ID. Č.: 26)	+
Aminokyseliny 400 až 445	SEAP CBD 1309B (SEK. ID. Č.: 23) a Hu Chit Stop (SEK. ID. Č.: 26)	-
Aminokyseliny 409 až 445	SEAP CBD 1338 (SEK. ID. Č.: 24) a Hu Chit Stop (SEK. ID. Č.: 26)	-
Aminokyseliny 347 až 431	SEAP CBD 1149 (SEK. ID. Č.: 20) a SEAP CBD 1357 (SEK. ID. Č.: 25)	-
Aminokyseliny 374 až 431	SEAP CBD 1231 (SEK. ID. Č.: 21) a SEAP CBD 1357 (SEK. ID. Č.: 25)	-
Aminokyseliny 392 až 431	SEAP CBD 1285 (SEK. ID. Č.: 22) a SEAP CBD 1357 (SEK. ID. Č.: 25)	-
Aminokyseliny 395 až 445	SEAP CBD 1296 (SEK. ID. Č.: 35) a Hu Chit Stop (SEK. ID. Č.: 26)	+
Aminokyseliny 397 až 445	SEAP CBD 1300 (SEK. ID. Č.: 36) a Hu Chit Stop (SEK. ID. Č.: 26)	+
Aminokyseliny 392 až 443	SEAP CBD 1285 (SEK. ID. Č.: 22) a Hu Chit Stop 7 (SEK. ID. Č.: 7)	-

B. Příprava analogů s mutovanými cysteiny

Za účelem zjištění, je-li nějaký z šesti cysteinových zbytků přítomných v sekvenci 99 C-koncových aminokyselin lidské chitinázy nezbytný pro vazbu chitinu, byly připraveny analogy fragmentů chitinázy, kde byl každý jednotlivý cystein mutován na serin. S využitím primerů popsaných v tabulce 2 bylo PCR přístupem vytvořeno šest produktů, kde v každém z nich byl mutován jeden z přítomných cysteinů na serin. Tyto produkty byly postupem uvedeným v předchozím textu připojeny k cDNA kódující SEAP. Chitin-vazebná aktivita chimérických proteinů produkovaných transientně transfekovanými buňkami COS byla stanovována postupem popsaným výše. Získané výsledky ukazují, že každý z těchto šesti cysteinových aminokyselinových zbytků je nezbytný pro chitin-vazebnou aktivitu.

Tabulka 2

Testovaný analog	Použité primery	Chitin-vazebná aktivita
C399S	SEAP CBD dC1 (SEK. ID. Č.: 27) a Hu Chit Stop (SEK. ID. Č.: 26)	-
C419S	SEAP CBD dC2 (SEK. ID. Č.: 28) a Hu Chit Stop (SEK. ID. Č.: 26)	-
C429S	SEAP CBD 1285 (SEK. ID. Č.: 22) a SEAP CBD dC3 (SEK. ID. Č.: 29)	-
C439S	SEAP CBD 1285 (SEK. ID. Č.: 22) a SEAP CBD dC4 (SEK. ID. Č.: 30)	-
C441S	SEAP CBD 1285 (SEK. ID. Č.: 22) a SEAP CBD dC5 (SEK. ID. Č.: 31)	-
C442S	SEAP CBD 1285 (SEK. ID. Č.: 22) a SEAP CBD dC6 (SEK. ID. Č.: 32)	-

Jak je popsáno v příkladu 6, rekombinantními technikami nebo částečnou nebo totální chemickou syntézou mohou být připraveny další chitin-vazebné fragmenty a jejich analogy.

C. Exprese chitin-vazebných fragmentů v kvasinkách

Fragment chitin-vazebné domény zahrnující aminokyselinové zbytky 392 až 445 (v SEK. ID. Č.: 2) byl ve velkém množství exprimován v kvasinkách Saccharomyces cerevisiae. Expresívní konstrukt α-FLAG-CBD byl připraven tak, že nukleotidová sekvence odpovídající v SEK. ID. Č.: 2 aminokyselinovým zbytkům 392 až 445 byla připojena ke 3´ konci sekvence kódující pre-pro-sekvenci α-faktoru S. cerevisiae (Brake a další, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:4642 až 4646, 1984) a epitopu FLAG (Eastman Kodak). Za tímto účelem byl DNA templát nezkrácené lidské chitinázy PCR amplifikován s využitím primerů CBDaaxFLAG (přímý, SEK. ID. Č.: 33) a Hu Chit Stop 5 (reverzní, SEK. ID. Č.: 34). Sekvence primeru CBDaaxFLAG obsahuje ve směru proti směru transkripce od oblasti kódující FLAG epitop restrikční místo Asp718 a FLAG epitop je ve stejném čtecím rámci se sekvencí kódující prvních osm aminokyselin chitin-vazebné domény fragmentu 392 až 445. Primer Hu Chit Stop 5 kóduje sedm C-koncových aminokyselin zmíněného fragmentu chitin-vazebné domény a dále sekvenci Gly-Ala-Gly připojenou k šesti histidinovým zbytkům (His_6), za níž následuje segment tří aminokyselin a kodon pro ukončení translace. Sekvence His_6 je zavedena za účelem usnadnění purifikace exprimovaného produktu afinitní chromatografií na imobilizovaném kovu (popsána v publikaci Nilsson a další, Prot. Expr. Purification, 11:1 až 16, 1997). Ihned za stop kodon bylo zavedeno restrikční místo NotI.

Produkt amplifikovaný s využitím zmíněných primerů byl štěpen restrikčními enzymy NotI a Asp718 a zaklonován do

odpovídajících míst v expresívní kazetě plazmidu pAYE/VEC, který je odvozen od plazmidu pAYE674 (Delta Biotechnology Limited; Sleep a další, Bio/Technology, 9:183 až 187, 1991). Takto byla rovněž zavedena restrikční místa usnadňující inkorporaci expresívních kazet do vektoru pSAC/VEC (viz. níže). Expresívní kazeta v připraveném konstruktu, označeném pAYE/AF/CBD, zahrnuje fúzi nukleotidů (ve stejném čtecím rámci) kódujících pre-pro-sekvenci α-faktoru S. cerevisiae a fragment chitin-vazebné domény. Po syntéze je tento fúzní protein směrován k buněčné membráně, kde je peptid FLAG-fragment chitin-vazebné domény-His_6 činností proteázy KEX2 odštěpen od pre-pro-sekvence α-faktoru. Transkripce fúzního proteinu pre-pro-CBD je řízena silným promotorem PRB1 a transkripce je ukončena terminátorem transkripce ADH1.

Zmíněná expresívní kazeta byla z plazmidu pAYE/AF/CBD vyštěpena restrikčními enzymy SfiI a PacI a zaklonována do odpovídajících míst ve vektoru pSAC/VEC, který je odvozen od vektoru pSAC35 (Delta Biotechnology Limited; Sleep a další, viz. výše) začleněním polyklonovacího místa. Člunkový vektor pSAC35 zahrnuje kompletní plazmid 2 μ se selekčním markerem LEU2 a dvě repetitivní sekvence ohraničující počátek replikace pro expresi v E.coli a gen pro β-laktamázu, odvozené od vektoru pUC. Výsledným plazmidem pSAC2/AF/CBD byl postupem podle Ito a další, J. Bacteriol., 153:163 až 168, 1983, transformován hostitelský kmen Saccharomyces cerevisiae IE41 (cir°leu2 pep4::URA3 L261, Sleep a další, viz, výše) a rezistentní buňky byly selektovány na médiu postrádajícím leucin. Po transformaci plazmidu pSAC2/AF/CBD do hostitelského kmene dojde k rekombinaci repetitivních sekvencí, čímž je eliminována sekvence pUC. Vzniklý vektor je autonomně replikován, velmi stabilní a umožňuje vysokou hladinu exprese kódovaného produktu při

kultivaci hostitelských buněk jak v selekčním, tak neselekčním médiu (Sleep a další, viz. výše).

Po klonální selekci byly čtyři ze získaných klonů kvasinek kultivovány 16 hodin při 30°C ve 2 ml selekčního média. Tyto kultury byly následně přeneseny do 18 ml média YEPD a kultivovány při 30°C dalších 40 hodin. Kultivační média byla oddělena od buněk a exprese rekombinantního proteinu byla stanovena SDS-PAGE. Z gelu bylo zřejmé, že rekombinantní fragment chitin-vazebné domény (aminokyseliny 392 až 445) byl sekretován všemi čtyřmi klony, ale ne buňkami transformovanými prázdným kontrolním vektorem. Metodou Western blot, s využitím monoklonální protilátky 243Q namířené proti chitin-vazebné doméně, bylo prokázáno, že sekretovaným proteinem je vskutku fragment chitin-vazebné domény.

Médium je fragmentem chitin-vázající domény velmi nabohaceno, ale tento protein zde není v čisté formě. Nejprve byla provedena pilotní purifikace malého množství proteinu afinitní chromatografií na nosiči s imobilizovaným kovem, čímž byl získán čistý preparát. Do kolony o objemu 12 ml (BioRad) byly umístěny 2 ml chelatační Sepharózy Fast Flow (Pharmacia). Poté byl nosič "nabit" ionty niklu aplikací 10 ml 50 mM roztoku síranu nikelnatého. Následovalo promytí 10 ml destilované vody a kolona byla ekvilibrována 10 ml pufru A (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 M NaCl). Před nanáškou na kolonu bylo pH kultivačního média (kultivace klonu 34A) upraveno přídavkem Trisového pufru na hodnotu 8 a výslednou koncentraci 20 mM Tris. Na kolonu bylo aplikováno 14 ml takto upraveného média a následovalo promytí 10 ml pufru A. Rekombinantní protein byl následně eluován pufrem A obsahujícím 10 (2 ml), 50 (2 ml) a 100 mM (3 ml) imidazol. Deset mikrolitrů z každé frakce při purifikaci bylo analyzováno SDS-PAGE. Z gelu bylo patrné, že rekombinantní fragment chitin-vazebné domény (aminokyseliny 392 až 445) byl v pod-

statě v čisté formě eluován 100 mM imidazolem. Frakce 2 a 3 získané elucí 100 mM imidazolem byly spojeny. Tyto spojené frakce obsahovaly purifikovaný protein v koncentraci přibližně 0,4 mg/ml.

Funkčnost rekombinantního proteinu byla analyzována inkubací 25 µl roztoku fragmentu chitin-vazebné domény (aminokyseliny 392 až 445) s 1 mg práškového chitinu po dobu 1 hodiny při 4°C. Po ukončení inkubace byl nerozpustný chitin odstraněn centrifugací a množství proteinu zůstavšího v supernatantu bylo (SDS-PAGE) srovnáno s množstvím přítomným v kontrolním médiu bez přídavku chitinu. V médiu s přídavkem chitinu bylo pozorováno přibližně 50% snížení množství rekombinantního proteinu. To ukazuje, že alespoň signifikantní frakce tohoto rekombinantního proteinu si uchovává schopnost vázat chitin.

Za účelem exprese fragmentu chitin-vazebné domény zahrnující aminokyselinové zbytky 392 až 445 (v SEK. ID. Č.: 2) bez epitopů FLAG a His_6 byl vytvořen druhý konstrukt pro expresi v kvasinkách. Tento konstrukt byl vytvořen postupem obdobným postupu popsaném v předchozím textu s tím rozdílem, že k amplifikaci oblasti chitin-vazebné domény byly použity primery CBDα (přímý, SEK. ID. Č.: 38) a Hu Chit Stop 4 (reverzní, SEK. ID. Č.: 39). Buňky byly transformovány a selektovány postupem popsaným výše.

Transformované klony kvasinek exprimující rekombinantní chitin-vazebnou doménu byly při 30°C kultivovány přes noc v 10 ml média SC-leu-ura (Bio101, Vista, CA) obsahujícího 2% glukózu. Jedním mililitrem této kultury bylo inokulováno 100 ml totožného média a inkubace dále pokračovala při 30°C za stálého třepání. Po 19 hodinách bylo 65 ml této kultury převedeno do 1,2 litru média YB2V (0,2% glukóza, 0,008% $FeCl_3$, 1 g/l citrátu trisodného, 25 g/l casamino kyselin, 13,5 g/l KH_2PO_4, 3,8 g/l $(NH_4)_2SO_4$, 4 mM $MgSO_4$, 0,0004% thiamin,

stopové prvky a vitamíny) ve fermentoru o objemu 3 litry. Fermentace probíhala při 30°C, pH 5,5, rychlosti třepání 1200 otáček za minutu a proudění vzduchu 3 l/min. pH kultivačního média bylo udržováno pomocí kyseliny fosforečné a hydroxidu amonného. Prvních 13 hodin byl fermentor ve vsádkovém režimu a poté začalo přidávání dalších živin. Nejprve bylo do fermentoru po dobu 4 hodin přidáváno médium YFV6.1 (50% glukóza, 0,02% $FeCl_3$, 1 g/l citrátu trisodného, 50 g/l casamino kyselin, 2,9 g/l KH_2PO_4, 5 g/l $(NH_4)_2SO_4$, 15,2 mM $MgSO_4$, 0,001% thiamin, stopové prvky a vitamíny) konstantní rychlostí 3,6 ml/hod a poté byla rychlost nástřiku zvyšována exponenciálně s dobou zdvojení 5 hodin na maximum 9,38 ml/hodina. Po ukončení kultivace po 93 hodinách byly buňky zcentrifugovány. 1,6 litrů kultivačního média bylo centrifugováno 40 minut při 5000 x g a teplotě 4°C. Buněčná pelety byla odstraněna a supernatant zfiltrován přes 0,2 μm filtr.

Rekombinantní chitin-vazebná doména byla z kultivačního média z fermentoru purifikována na sloupci chitinových částic. Do kolony o objemu 50 ml (Amicon) bylo vneseno 25 ml chitinových partikulí (New England Biolabs), kolona byla promyta 250 ml 1% SDS a ekvilibrována 250 ml pufru A (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 M NaCl) při průtoku 2 ml/min. Vyčeřené médium bylo na kolonu aplikováno rychlostí 1 ml/min. Následně byla kolona promyta 250 ml pufru A a protein byl z kolony eluován 50% acetonitrilem, 0,1% trifluoroacetátem a eluát byl sbírán ve frakcích o objemu 4 ml. Acetonitril byl z eluátu odpařen vakuovou centrifugací. Analýzou eluovaných frakcí SDS-PAGE a kvantifikací obsahu proteinu bylo zjištěno, že 94% purifikované chitin-vazebné domény bylo přítomno ve třech po sobě jdoucích frakcích. Celkem bylo ze 130 ml kultivačního média získáno 109 mg chitin-vazebné domény. Analýza purifikovaného proteinu hmotnostní spektrometrií

metodou MALDI (Perseptive Biosystems) ukázala jeden vrchol s molekulovou hmotností 5911,9, což dobře koresponduje s předpovězenou molekulovou hmotností 5909,8. Při testovaní funkční integrity bylo 20 µg purifikované chitin-vazebné domény smícháno s 250 µl chitinových partikulí a výsledkem bylo navázání více než 95% peptidu na nosič.

Příklad 8

Příprava monoklonálních protilátek proti lidské chitinázе

K přípravě monoklonálních protilátek proti lidské chitináze mohou být použity následující dva protokoly (imunizace jednou dávkou a nebo vícenásobná imunizace). Při prvním z postupů byla myš imunizována opakovanými injekcemi rekombinantní lidské chitinázy (například 10 až 20 µg chitinázy emulsifikované v kompletním Freundově adjuvans) získané jakýmkoliv z postupů popsaných v příkladech 3 až 6. 4 dny po poslední posilovací dávce lidské chitinázy v PBS byla myš usmrcena a byla jí odebrána slezina. Slezina byla umístěna do 10 ml bezsérového média RPMI 1640 a suspenze jednotlivých buněk byla vytvořena rozmělněním sleziny mezi konci dvou mikroskopických podložních sklíček v bezsérovém médiu RPMI 1640 doplněném 2 mM L-glutaminem, 1 mM pyruvátem sodným, 100 U/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu (RPMI) (Gibco, Kanada). Buněčná suspenze byla přefiltrována přes sterilní buněčné sítko Nitex (70-mesh, Becton Dickinson, Parsippany, New Yersey) a dvakrát promyta centrifugací při 200 g po dobu 5 minut a následným rozsuspendováním ve 20 ml bezsérového média RPMI. Jako kontrola byly použity splenocyty izolované podobným postupem ze slezin tří neimunizovaných myší Balb/c. Myelomy NS-1, udržované tři dny před fúzí v logaritmické fázi růstu v RPMI doplněném 11% fetálním telecím sérem (FBS) (Hyclone Laboratories, Inc., Logan,

Utah), byly centrifugovány při 200 g po dobu 5 minut a buněčná peleta byla dvakrát promyta.

1 x 10^6 splenocytů bylo smícháno 2 x 10^7 buněk NS-1, tato směs byla zcentrifugována a supernatant odstraněn. Poklepáním na stěnu zkumavky byla buněčná peleta uvolněna a po dobu 1 minuty byl při 37°C za stálého míchání přidáván 1 ml 50% PEGu 1500 (v 75 mM HEPES, pH 8,0) (Boehringer Mannheim). Následovalo přidávání 7 ml bezsérového RPMI v časovém intervalu 7 minut. Bylo přidáno dalších 8 ml RPMI a buňky byly centrifugovány při 200 g po dobu 10 minut. Po odstranění supernatantu byla buněčná peleta rozsuspendována ve 200 ml RPMI obsahujícího 15% FBS, 100 µM hypoxanthin sodný, 0,4 µM aminopterin, 16 µM thymidin (HAT; Gibco), 25U/ml IL-6 (Boehringer Mannheim) a 1,6 x 10^6 splenocytů/ml a směs byla vyseta do deseti 96-ti jamkových destiček pro tkáňové kultury s plochým dnem (Corning, Corning New York).

Druhý, čtvrtý a šestý den po fúzi bylo 100 µl média z každé jamky nahrazeno médiem čerstvým. Osmý den po fúzi byla v médiu metodou ELISA testována přítomnost myších IgG schopných vázat lidskou chitinázu. Toto testování bylo provedeno následujícím způsobem. Destičky Immulon 4 (Dynatech, Cambridge, MA) byly potaženy 100 ng/jamka lidské chitinázy ve 25 mM Trisu, pH 7,5. Potahování probíhalo 2 hodiny při 37°C. Potahovací roztok byl odstraněn a do misek bylo na 30 minut při 37°C přidáno 200 µl/jamka blokovacího roztoku (0.5% želatina z rybí kůže (Sigma) rozpuštěna v CMF-PBS). Destičky byly třikrát promyty PBS s 0,05% Tweenem 20 (PBST) a do každé jamky bylo přidáno 50 µl supernatantů. Po 30-ti minutové inkubaci při 37°C a promytí popsaném výše bylo přidáno 50 µl kozí protilátky proti myším IgG(fc) konjugované s křenovou peroxidázou (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania) ředěné v poměru 1:3500 v PBST. Inkubace probíhala 30 minut při 37°C a po čtyřech promytích PBST

bylo přidáno 100 µl substrátu, tj. 1 mg/ml o-fenylen diaminu (Sigma) a 0,1 µl/ml 30% H_2O_2 ve 100 mM citrátovém pufru, pH 4,5. Barevná reakce byla zastavena po 5 minutách přídavkem 50 µl 15% kyseliny sírové a na čtečce destiček (Dynatech) byla změřena absorbance při 490 nm. Zvolené jamky s hybridomy byly dvakrát klonovány zředěním do 96-jamkových destiček a vizuálním vyhodnocením počtu kolonií v jedné jamce po pěti dnech. Izotypizace monoklonálních protilátek produkovaných hybridomy byla provedena pomocí systému Isostrip (Boehringer Mannheim, Indianopolis, IN).

Druhý protokol využívá intraslezinnou imunizaci jednou dávkou tak, jak je obecně popsána v publikaci Spitz, Methods Enzymol., 121:33 až 41, 1986). Do obnažené sleziny byla injikována rekombinantní lidská chitináza (například 10 až 20 µg v PBS v koncentraci přibližně 0,02% až 0,04%, s nebo bez adjuvans) připravená postupy popsanými v příkladech 3 až 6. Po této injikaci byla slezina vrácena zpět do peritoneální dutiny a zvířata byla zašita. Po třech dnech byla myš usmrcena a byla jí odejmuta slezina. Připravená suspenze splenocytů byla dvakrát promyta RPMI 1640 doplněným 3% fetálním telecím sérem (FCS) a rozsuspendována ve 25 ml tohoto média. Myelomy NS-O byly sebrány v logaritmické fázi růstu, jednou promyty a v 50 ml zkumavce přidány k suspenzi splenocytů v poměru 3:1 nebo 2:1 (splenocyty:myelomy). Tato směs byla centrifugována při přibližně 400 x g (1500 otáček za minutu), supernatant byl odstraněn a buněčná peleta byla uvolněna poklepem na stěnu zkumavky. Fúze byla provedena při pokojové teplotě přídavkem 1 ml polyethylenglykolu 1500 (PEG 1500) po dobu 1 minuty za stálého míchání. Tato směs byla inkubována další jednu minutu, poté bylo po dobu 1 minuty přidáváno teplé médium RPMI (1 ml, 30 až 37°C). Následoval přídavek 5 ml RPMI v intervalu 3 minut a další přídavek 10 ml RPMI během dalších tří mi-

nut. Tato buněčná suspenze byla zcentrifugována a rozsuspendována v přibližně 200 ml selekčního média HAT obsahujícího RPMI 1640 doplněné 100 U/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu, 20% FCS, 100 µM hypoxanthinem sodným, 0,4 µM aminopterinem, 16 µM thymidinem. Tato buněčná suspenze byla v objemech 1 ml rozdělena do destiček pro tkáňové kultury a při 37°C kultivována po dobu 8 až 10 dnů ve vlhké atmosféře s obsahem CO_2 5%. V závislosti na růstu buněk byly supernatanty v jednotlivých jamkách odstraňovány a nahrazovány 1 ml média HAT každé 2 až 3 dny. V supernatantech z jamek s konfluentní vrstvou buněk byla zjišťována přítomnost specifických protilátek a buňky z pozitivních jamek byly klonovány.

S využitím protokolů uvedených v předchozím textu bylo připraveno několik monoklonálních protilátek specificky reagujících s lidskou chitinázou. U fúze 243 bylo každé z pěti myší Balb/c ve stáří 6 až 12 týdnů nejprve před imunizací odebráno malé množství krve a poté byly myši imunizovány subkutánní injekcí 10 až 20 µg rekombinantní lidské chitinázy připravené postupem uvedeným v příkladu 5, emulsifikované v kompletním Freudově adjuvans. Ve dnech 21, 42 a 60 po první imunizaci byla myším aplikována posilovací dávka 50 µg rekombinantní lidské chitinázy v nekompletním Freundově adjuvans. Myši 2483 bylo navíc ve dnech 216 až 219 denně aplikováno 20 µg rekombinantní lidské chitinázy. 220. den po první imunizaci byla myši 2483 sterilně odebrána slezina a zpracována postupem uvedeným výše. Stručně řečeno, nejprve byla, rozmělněním sleziny mezi konci dvou mikroskopických podložních sklíček v bezsérovém médiu RPMI 1640 doplněném 2 mM L-glutaminem, 1 mM pyruvátem sodným, 100 U/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu (RPMI) (Gibco, Kanada), připravena suspenze jednotlivých buněk. Tato suspenze byla přefiltrována přes sterilní buněčné sítko

(Becton Dickinson, Parsippany, New Yersey) a dvakrát promyta centrifugací při 200 g po dobu 5 minut a následným rozsuspendováním ve 20 ml bezsérového média RPMI. Thymocyty získané z neimunizovaných myší Balb/c byly připraveny podobným způsobem.

Myelomy NS-1, udržované tři dny před fúzí v logaritmické fázi růstu v RPMI doplněném 10% fetálním telecím sérem (FBS) (Hyclone Laboratories, Inc., Logan, Utah), byly centrifugovány při 200 g po dobu 5 minut a buněčná peleta byla dvakrát promyta a rozsuspendována v 10 ml bezsérového média RPMI.

Slezinné buňky byly smíchány s buňkami NS-1 v poměru 1:5, tato směs byla zcentrifugována při 200 x g a supernatant odstraněn. Poklepáním na stěnu zkumavky byla buněčná peleta uvolněna a po dobu 1 minuty byly při 37°C za stálého míchání přidávány 2 ml 50% PEGu 1500 (v 75 mM HEPES, pH 8,0) (Boehringer Mannheim). Následovalo přidávání 14 ml bezsérového RPMI v časovém intervalu 7 minut. Bylo přidáno dalších 16 ml RPMI a buňky byly centrifugovány při 200 g po dobu 10 minut. Po odstranění supernatantu byla buněčná peleta rozsuspendována ve 200 ml RPMI obsahujícího 15% FBS, 100 µM hypoxanthin sodný, 0,4 µM aminopterin, 16 µM thymidin (HAT; Gibco), 25U/ml rekombinantního lidského IL-6 (Boehringer Mannheim) a 1,5 x 10^6 thymocytů/ml. Tato suspenze byla vyseta do deseti 96-ti jamkových destiček pro tkáňové kultury s plochým dnem (Corning, Spojené království) v objemu 200 µl/jamka. Před screeningem bylo buňkám 3 až 5-krát vyměněno přibližně 100 µl média nahrazením stejným médiem popsaným výše, ale obsahujícím 10U/ml IL-6 a neobsahujícím thymocyty.

Supernatanty z fúze 243 byly nejprve testovány metodou ELISA (jako imunogen byla použita nezkrácená forma lidské chitinázy), kde jako sekundární protilátka byl použit kon-

jugát kozí protilátky proti myším IgG(fc) s křenovou peroxidázou. Buňky z pozitivně reagujících jamek byly 4-krát subklonovány limitním ředěním v médiu bez aminopterinu. Klonováním byly získány buněčné linie 243K, 243M a 243Q.

Monoklonální protilátky produkované dvěmi buněčnými liniemi byly izotypizovány buď soupravou Isostrip (Boehringer Mannheim) nebo metodou ELISA s využitím činidel specificky reagujících s jednotlivými izotypy (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA). Všechny protilátky jsou izotypu IgG1.

Testování, jestli některá z těchto protilátek specificky interaguje s chitin-vazebnou doménou, bylo provedeno tak, že každá z protilátek byla použita při Western blotu s nezkrácenou chitinázou, chitinázou zkrácenou z C-konce (aminokyseliny 1 až 373) a rekombinantní chitin-vazebnou doménou (aminokyseliny 392 až 445) produkovanými v kvasinkách. Všechny tři protilátky 243K, 243M a 243Q se vážou na nezkrácenou chitinázu a na chitin-vazebnou doménou, ale ne na konstrukt zkrácený z C-konce.

Všechny kombinace všech tří protilátek byly testovány pro použití v sendvičové ELISA. Destičky Nunc-Immuno Module byly přes noc při 4°C inkubovány se 125 µl první protilátky v koncentraci 2 µg/ml. Následně byl roztok protilátky nahrazen blokovacím roztokem v objemu 300 µl/jamka (5% Teleostean želatina, 0,05% Proclin 300 v CMF-PBS). Po 30 minutách inkubace při pokojové teplotě byl blokující roztok nahrazen 20 ng/ml rekombinantní chitin-vazebné domény v Omni Diluent (5% Teleostean želatina, 0,05% Tween 20, 0,05% Proclin 300 v CMF-PBS) a inkubace pokrčovala 30 minut při 37°C. Jamky byly 5-krát promyty promývacím pufrem (145 mM NaCl, 1,5% Tween 20) a následně byla aplikována biotinylovaná sekundární protilátka v koncentraci 0,25 µg/ml. Po 30 minutách inkubace při 37°C byly jamky opět 5-krát promyty

poté 30 minut při 37°C inkubovány se 100 µl křenové peroxidázy konjugované se streptavidinem (Pierce). Po dalším pětinásobném promytí bylo do jamek naneseno 100 µl substrátu (0,01 g/ml tetramethylbenzidinu v dimethylsulfoxidu zředěného 1:100 do 100 mM trihydrátu octanu sodného, pH 5,5, 0,015% H_2O_2) a inkubace probíhala ve tmě při pokojové teplotě. Po 30 minutách byla reakce zastavena přídavkem 1N H_2SO_4 a byly stanoveny absorbance při vlnových délkách 450 a 630 nm. Při tomto experimentu bylo zjištěno, že nejsilnější signál byl získán použitím kombinace protilátek 243Q (primární protilátka) a 243M (sekundární protilátka). Hybridom 243Q produkující protilátku 243Q byl uložen _____ (datum) v American Type Culture Collection, 10801 Univesity Blvd., Manassas, VA 20110-2209 a bylo mu přiděleno přístupové číslo _____. Hybridom 243M produkující protilátku 243M byl uložen _____ (datum) v American Type Culture Collection, 10801 Univesity Blvd., Manassas, VA 20110-2209 a bylo mu přiděleno přístupové číslo _____.

Příklad 9

Katalytická aktivita rekombinantní chitinázy

Chitotriosidázová (chitinázová) aktivita byla stanovována pomocí fluorogenního substrátu 4-methylumbelliferyl-β-N,N´,N´´-triacetylchitotriózy (4-MU-chitotriosid, Sigma Chemical, St. Louis, MO) v McIlvainově pufru (Holak a další, viz. výše). Deset mikrolitrů vzorků rekombinantního proteinu popsaného v příkladu 5A bylo smícháno s 10 µl bovinního sérového albuminu (10 mg/ml), 15 µl fluorogenního substrátu (2,71 mM) a 65 µl pufru (0,1 M kyselina citrónová, 0,2 M fosforečnan sodný, pH 5,2) v celkovém objemu 100 µl. Reakce probíhala 15 minut při 37°C a byla zastavena přídavkem 2 ml 0,3 M pufru glycin/NaOH (pH 10,6). Fluorescenční produkt štěpení (4-methylumbelliferon) byl detekován

na fluorimetru (SLM-AMINCO Instruments, Inc., Rochester, NY) při 450 nm. Standardní křivka byla získána štěpením několika koncentrací substrátu nadbytkem bakteriální chitinázy; tento poměr substrát chitináza zaručoval, že bude substrát kompletně rozštěpen. Známé množství 4-MU bylo následně korelováno s naměřeným fluorescenčním signálem a byla vytvořena standardní křivka. Intenzita fluorescence změřené při stanovením se zředěnou rekombinantní chitinázou byla následně interpolována, čímž bylo získáno množství substrátu (v nmolech) rozštěpené enzymem za daný čas. Toto číslo bylo následně vyděleno koncentrací proteinu, čímž byla získána aktivita v jednotkách nmol/min/mg proteinu (množství proteinu bylo stanoveno měřením při A_{280} a z vypočítaného molárního extinkčního koeficientu).

Chitotriosidázová aktivita rekombinantní lidské chitinázy produkované v COS buňkách (postupem popsaným v příkladu 5A) byla 90 nmol/min/mg proteinu. Tímto způsobem byla rovněž testována chitinázová aktivita každého z fragmentů chitinázy podle vynálezu.

Příklad 10

Antifungální aktivita fragmentů chitinázy in vitro

Inhibice fungálního růstu běžně používanými antifungálními sloučeninami konjugovanými s fragmenty lidské chitinázy podle vynálezu může být testována in vitro. Candida albicans a Aspergillus fumigatis jsou nebezpečnými patogeny pro jedince s oslabeným imunitním systémem. Candida i Aspergillus byly kultivovány při 37°C v médiu RPMI do hustoty přibližně 10000 až 50000 jednotek tvořících kolonie (CFU, colony forming unints) na ml. K těmto kulturám jsou v různých ředěních přidávány testované látky a měřením turbidity kultur po 24 hodinách je určována rychlost růstu.

Antifungální aktivita sledovaných látek může být rovněž testována metodou difúze v agaru, stanovením v živném médiu podle National Committee on Clinical Laboratory Standards nebo testováním inhibice syntézy buněčných stěn podle Selitrennikoff a další (Anitimicrob. Agents Chemother., 23:757 až 765, 1983).

Při stanovení metodou difúze v agaru je 1,5% agar (s médiem RPMI pufrovaným kyselinou 2-(N-morpholino)propansulfonovou) (MOPS), pH 7,0) inokulován Candida albicans (ATCC č. 90028) v koncentraci přibližně $1x10^6$ buněk/ml. Na tento agar je umístěn disk obsahující definované množství, například 50 µg, testované látky a je sledována oblast inhibice růstu.

Při stanovení v živném médiu je definované množství, například 50 µg, testované látky nebo kontrolní látky spolu s určitou koncentrací testovaného organizmu umístěno do média RPMI 1640 pufrovaného MOPSem, pH 7,0. Tyto vzorky jsou za stálého třepaní (120 otáček za minutu) po dobu 48 hodin inkubovány při 35°C a růst kultur je následně stanovován měřením turbidity suspenze. Vhodnými koncentracemi testovaných organizmů jsou: $2,5x10^4$ buněk/ml Candida albicans (ATCC č. 90028); $5x10^4$ buněk/ml Candida albicans rezistentních vůči polyenům (ATCC č. 38247); $1x10^4$ buněk/ml Aspergillus fumigatis (ATCC č. 16424); $1x10^4$ buněk/ml Neurospora crassa (ATCC č. 18889); a $1x10^4$ buněk/ml Saccharomyces cerevisiae (ATCC č. 26108).

Stanovení využívající mutanty os-1, pomocí něhož je možné identifikovat inhibitory biosyntézy buněčné stěny, je v podstatě prováděno postupem podle publikace Selitrennikoff a další, viz. výše. Inokulum $1,5x10^5$ protoplastů/ml kultivovaných v agaru (Vogelovo médium N, 7,5% sorbitol, 1,5% sacharóza, 10 µg/ml nikotinamid a 1% agar) je inkubováno 72 hodin při 25°C. Po umístění disku obsahujícího definované

množství, například 50 µg, testované látky nebo kontrolní sloučeniny jsou sledovány změny v růstu a morfologii buněk. Buňky os-1 jsou mutantním kmenem Neurospora crassa, který, je-li kultivován za určitých podmínek při 37°C, rostou ve formě protoplastů, ale za vhodných podmínek a při teplotě 22°C znovu vytvářejí buněčnou stěnu. Vzorky inhibující růst jsou označovány jako inhibitory růstu plísní, zatímco vzorky inhibující regeneraci buněčné stěny, ale nezabíjející buňky, jsou inhibitory specificky blokující syntézu buněčné stěny.

Příklad 11

Antifungální aktivita rekombinantní chitinázy in vivo na myším modelu

Farmakokinetické parametry rekombinantní lidské chitinázy v organizmu myší byly stanoveny následujícím způsobem. Intravenózní injekcí do ocasní žíly bylo samicím myší Balb/c, ve stáří 6 až 8 týdnů, aplikováno 0,5 mg/kg, 5 mg/kg a 50 mg/kg rekombinantní lidské chitinázy. 0,01, 0,25, 1, 8 a 24 hodin po injekcích byly myši dekapitovány (dvě zvířata v daném čase a pro danou dávku). Ve vzorcích séra byla následně stanovena chitinázová aktivita a koncentrace chitinázy. Získané výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3

Dávka (mg/kg)	AUC (µg/ml/h)	Vss (ml/kg)	cL (ml/h/kg)	MRT (h)	Biologický poločas (h)	Cmax (µg)
0,5	31,24	12,03	16,01	0,75	0,74	22,30
5,0	278,50	13,61	17,95	0,76	1,38	162,84
50,0	2505,83	52,92	19,95	2,65	2,33	1179,19

AUC: plocha pod křivkou do nekonečna

Vss: distribuční objem

cL: clearence

MRT: průměrná doba setrvání v organizmu

Cmax: maximální sérová koncentrace

Farmakokinetické parametry fragmentů chitinázy podle vynálezu nebo terapeutických sloučenin zahrnujících tyto fragmenty chitinázy mohou být testovány stejným způsobem.

Za účelem testování anti-fungálních sloučenin bylo vyvinuto několik živočišných modelů (viz. Louie a další, Infect. Immun., 62:2761 až 2772, 1994; Kinsman a další, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 37:1243 až 1246, 1993; Nakajima a další, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 39:1517 až 1521, 1995; Tonetti a další, Eur. J. Immunol., 25:1559 až 1565, 1995; Denning a Stevens. Anitimicrob. Agents Chemother., 35:1329 až 1333, 1991; Stevens, J. Mycol. Med., 6(Suppl. I):7 až 10, 1996). Stručně řečeno, pokusná zvířata jsou infikována patogenními houbami a následně jsou jim aplikovány různé dávky testovaných sloučenin a je sledována délka přežívání. Mohou být provedeny srovnávací experimenty, při nichž je aplikována antifungální látka samostatně nebo tatáž látka konjugovaná s nějakým fragmentem chitinázy. Tímto způsobem je možné stanovit, zda konjugace dané látky s chitin-vazebným fragmentem vylepšuje účinnost této antifungální látky. Akutní systemická kandidóza u myší je například vyvolána intraperitoneální nebo intravenózní aplikací Candida albicans v množství 10 x 10^6 CFU. Terapeutické látky jsou aplikovány před nebo v intervalu 1 až 5 hodin po infikaci a po pěti dnech je stanoven počet přeživších jedinců. Myši mohou být rovněž usmrceny a v jednotlivých orgánech jako například mozku, ledvinách, plicích, játrech a slezině může být stanoveno množství infekčních agens. V jiném případě mohou být myši infikovány nižší dávkou patogenních hub, například Aspergillus (8 až

10 x 10^6 CFU) nebo Candida (1 x 10^6 CFU), a přežívání může být stanovováno v delším časovém intervalu, například za 45 dní. Dlouhodobá fungicidní/fungistatická aktivita testovaných sloučenin může být testována pokračováním terapie po dobu jednoho týdne nebo déle, například 11 dní, a sledováním pokusných zvířat v časovém horizontu několika týdnů, například 18 dní až jednoho měsíce. Účinné antifungální látky zlepšují dlouhodobé přežívání pokusných živočichů a snižují počet infekčních agens v krvi a vnitřních orgánech.

Příklad 12

Aktivita chitinázy in vivo na králičím modelu invazivní aspergilózy

Účinnost terapeutických látek zahrnujících fragmenty chitinázy může být sledována na modelu invazivní aspergilózy imunosuprimovaných králíků, který je po více než deset let používán k testování množství nejrůznějších antifungálních terapií (viz. například Andriole a další, Clin. Infect. Dis., 14(Suppl. 1):S134 až 138, 1992). Tyto studie jsou obvykle prováděny postupy podle Patterson a další, Anitimicrob. Agents Chemother., 37:2307 až 2310, 1993 nebo George a další, J. Infect. Dis., 168:692 až 698, 1993. Stručně vzato, první den je králíkům intravenózně podán cyklofosfamid (200 mg), čímž se stanou leupenickými, a během experimentu je jim každý den subkutánně aplikován triamcinolon acetonid (10 mg). Druhý den, tj. 24 hodin po imunosupresi, je pokusným zvířatům intravenózně aplikováno přibližně 10^6 (letální dávka) nebo přibližně 10^5 (subletální dávka) konidií A. fumigatus. Antifungální terapie s testovanou sloučeninou je započata 24 hodin po infikaci nebo 48 hodin před infikací (prevence) a pokračuje 5 až 6 dnů nebo do úmrtí pokusného zvířete. Dávky běžně používaných antifungálních sloučenin se pohybují v intervalu 1,5 nebo 0,5

mg/kg/den pro intravenózně podávaný amfotericin B, 60 nebo 120 mg/kg/den pro orálně podávaný flukonazol a 100 mg/kg/den pro orálně podávaný 5-fluorcytosin. Kontrolní skupině králíků není podávána žádná antifungální sloučenina.

Po úhynu nebo autopsií jsou vzorky jater, plic, sleziny, ledvin a mozku sledovány histopatologicky a v těchto orgánech je rovněž sledováno množství CFU infekčního agens. Rovněž mohou být prováděny kultivace infekčních agens ze vzorků srdce, moči a krve. V časových intervalech jsou odebírány vzorky krve a v těchto je stanovován počet bílých krvinek a množství sacharidového antigenu z Aspergillus (metodou ELISA). Vliv léčby testovanou sloučeninou je vyhodnocen třemi parametry: snížením mortality, snížením počtu mikroorganizmů Aspergillus kultivovaných z jednotlivých orgánu (mikrobiální nálož) a snížení množství antigenu z Aspergillus v cirkulaci. Účinné antifungální látky snižují mortalitu a/nebo mikrobiální nálož.

Na tomto modelu může být rovněž testována pulmonální aspergilóza postupem podle Chilvers a další, Mycopathologia, 108:163 až 171, 1989). Imunosuprimovaní králíci jsou intratracheální instilací infikováni konidiemi Aspergillus fumigatus a ve dnech 1, 2, 4, 7 a 10 po infikaci následuje bronchoalveolární výplach. Mikrobiální nálož v plicích je kvantifikována kultivací infekčních agens, stanovením chitinu, počtem bílých krvinek a histopatologií. Účinné antifungální látky snižují mikrobiální nálož nebo rozsah zánětu v plicích.

Příklad 13

Aktivita chitinázy in vivo na králičím modelu diseminované kandidózy

06.03.01

Účinnost terapeutických látek zahrnujících fragmenty chitinázy může být sledována na modelu diseminované kandidózy postupem popsaným v publikaci Rouse a další, Anitimicrob. Agents Chemother., 36:56 až 58, 1992. Novozélandští bílý králíci byli systemicky infikováni přibližně 3 x 10^6 blastosporami Candida albicans. Antifungální terapie testovanými sloučeninami byla zahájena 48 hodin po infikaci kandidami (nebo před infekcí při prevenci) a pokračovala například 4 dny. Přeživší jedinci byli usmrceni a z chlopně aorty, plic, ledvin a sleziny byly kultivovány infekční agens. Tyto kultivace a histopatologická pozorování mohou být rovněž provedeny u jiných orgánů jako například jater, mozku nebo srdce. Kultivace mohou být rovněž provedeny ze vzorků krve a moči. Je stanovován vliv antifungální terapie na úmrtnost a mikrobiální nálož v krevním oběhu nebo tkáních. Bayer a další, Anitimicrob. Agents Chemother., 19:179 až 184, 1981, popisuje model, ve kterém jsou králíci intraperitoneálně infikováni přibližně 5 x 10^8 CFU Candida albicans. Čtyři dny po této infikaci je králíkům odebrán vzorek intraperitoneální tekutiny a kultivací je zjišťována přítomnost infekčních agens. Pokusná zvířata, u kterých je tímto způsobem prokázán výskyt patogenních hub, jsou náhodně rozdělena do dvou skupin - kontrolní a léčené. Antifungální léčba testovanými látkami je zahájena sedm dnů po infikaci. Oči všech králíků jsou sledovány nepřímou oftalmoskopií, protože diseminovaná kandidóza může vést k endoftalmitidě způsobené Candidami. Po 7, 11 a 14 dnech od zahájení terapie jsou zvířata usmrcena a v břišní dutině jsou sledovány známky peritonitidy a tvorba intraabdominálních abscesů. V očích je sledován výskyt makroskopických lézí. Vzorky tkání z peritoneálních abscesů, všech dalších viditelných abscesů, ledvin, jater, sleziny a očí jsou zváženy, homogenizovány v živném bujónu z hovězího srdce, postupně

ředěny a kultivací je v nich stanoven počet CFU na gram tkáně. Renální a peritoneální abscesy jsou rovněž fixovány 10% neutrálním formaldehydem a podrobeny histopatologické analýze. Fungální nálož a morfologie patogenních hub jsou v těchto řezech stanovovány barvením kyselinou jodistou-Schiffovým činidlem. Je sledováno zlepšení přežívání a snížení fungální nálože jako důsledku aplikace testovaných látek.

Příklad 14

Aktivita chitinázy in vivo na králičím modelu fungální endoftalmitidy

Účinnost terapeutických látek zahrnujících fragmenty chitinázy může být sledována na modelu fungální endoftalmitidy vyvolané Candidami postupem popsaným v publikaci Park a další, Anitimicrob. Agents Chemother., 39:958 až 963, 1995. Novozélandští bílý králíci (2 až 2,5 kg) byli intravitreálně infikováni přibližně 1000 CFU Candida albicans. Pět dní po infikaci byla endoftalmitida potvrzena nepřímou oftalmoskopií a byla definována jako průměrný až těžký zákal sklivce s částečným nebo úplným zastíněním vaskulatury retiny a choroidei vyšší než 50%. Zákal sklivce je klasifikován podle definované stupnice a vzhled očního pozadí může být klasifikován a dokumentován fotograficky. Králíci byli následně léčeni podáváním testovaných látek po dobu 2 až 4 týdnů. Tradičně používané antifungální látky jsou obvykle aplikovány v dávkách 80 mg/kg/den při orální aplikaci flukonazolu a 100 mg/kg každých dvanáct hodin při orální aplikaci 5-fluorcytosinu.

Účinnost léčby je stanovována 2 až 4 týdny po zahájení a to nepřímou oftalmoskopií, kvantifikací fungální nálože a histopatologií. Fungální nálož je kvantifikována tak, že jsou odebrány a zváženy oči a odvážená část každého vzorku

je homogenizována a kultivována po dobu 48 hodin na brucela agaru-5% koňská krev při 35°C v atmosféře 5 až 10% CO_2. Homogenizované vzorky mohou být před rozetřením na misky rovněž 10x až 100x zředěny sterilním fyziologickým roztokem. Je stanoven počet kolonií na miskách a celkový počet CFU v oku je vypočítán na základě znalosti počtu kolonií získaných z testované části. Účinnost léčby je poté definována snížením fungální nálože v oku. Pro histopatologická pozorování jsou vzorky očí fixovány ve folmalínu, zality a rozkrájeny na plátky o tloušťce 5 μm. Místa zánětu, organizace vazivová tkáně a přítomnost patogenních hub byla stanovována světelnou mikroskopií po obarvení řezů směsí hematoxylin-eosin nebo Gomorovým methenamino stříbrem. Byl vyhodnocen vliv testovaných antifungálních látek na snížení úmrtnosti, snížení fungální nálože nebo zmírnění zánětlivé reakce spojené s infekcí.

Jinou možností je využití králičího modelu endoftalmitidy vyvolané zástupci rodu Aspergillus, a to podle publikace Jain a další, Doc. Ophthalmol., 69:227 až 235, 1988. Do jednoho z očí novozélandských bílých králíků je vpraveno přibližně 40 spora Aspergillus fumigatus. Do kontralatelárního (kontrolního) oka je vpraveno sterilní inokulum. Účinnost léčby prostřednictvím testovaných látek může být stanovena na základě klinického obrazu očí, elektroretinograficky, nepřímou oftalmoskopií, kvantifikací fungální nálože a histopatologií. Klinicky pozorovatelná endoftalmitida začíná přibližně tři až sedm dnů po infikaci.

Příklad 15

Aktivita chitinázy in vivo na králičím modelu fungální endokarditidy

Účinnost terapeutických látek zahrnujících fragmenty chitinázy může být sledována na králičím modelu endokardi-

tidy vyvolané Candidami postupem popsaným v publikacích Witt a Bayer, Anitimicrob. Agents Chemother., 35:2481 až 2485, 1991; nebo Longman a další, Rev. Infect. Dis., 12(Suppl. 3):S294 až S298, 1990. Trombotická endokarditida (sterilní) je u novozélandských bílých králíků vyvolána transaortálním valvulárním zavedením sterilního polyethylenového katetru (vnitřní průměr 0,86 mm). Tento katetr zůstává zaveden po celou dobu trvání experimentu. 48 hodin po zavedení katetru je intravenózní injekcí přibližně 2×10^7 blastospor C. albicans vyvolána infekční endokarditida. K tomuto účelu může být rovněž využita C. parapsilosis. Antifungální terapie testovanými látkami byla zahájena 24 hodin před nebo 24 až 60 hodin po infikaci a terapie pokračovala 9 až 12 dnů. Tradičně používané antifungální látky jsou obvykle aplikovány v dávkách 1 mg/kg/den při intravenózní aplikaci amfotericinu B, 50 nebo 100 mg/kg/den při intravenózní nebo intraperitoneální aplikaci flukonazolu. Kontrolní skupině králíků nebyly podávány žádné antifungální sloučeniny. Po usmrcení byla odebrána srdce a bylo překontrolováno správné umístění katetru. Mikrobiální vegetace ze srdcí usmrcených zvířat byla sebrána, zvážena a homogenizována v 1 ml sterilního fyziologického roztoku. Homogenáty byly postupně ředěny a počet infekčních agens kvantifikován kultivací na kvasničném dextrózovém agaru po dobu 48 hodin při teplotě 35°C. U vegetace, která nedala vzniknou žádné kolonii, se předpokládá, že obsahuje méně než 2 $\log_{10}$ CFU/gram hmotnosti vegetace.

Příklad 16

Chitin-vazebná a chitinázová (chitin-hydrolytická) aktivita fragmentů lidské chitinázy

A. Chitin-vazebná doména je nepostradatelné pro vazbu chitinázy k chitinu

Chitin-vazebná a chitotriosidázová aktivita nezkrácené chitinázy (445 aminokyselin) byly srovnávány s těmito aktivitami u N-koncového fragmentu (aminokyseliny 1 až 373) popsaného v příkladu 5. Nezkrácená chitináza a zmíněný fragment chitinázy byly připraveny následujícím způsobem. Expresívní konstrukty kódující nezkrácenou chitinázu (MO-13B) a fragment o délce 373 aminokyselin zkrácený z C-konce (popsány v příkladu 5) byly transfekovány do buněk COS. Po 24 hodinách bylo kultivační médium (Eaglovo médium modifikované podle Dulbecca (DMEM (Gibco)) + 10% fetální bovinní sérum + 1 mM L-glutamin + 100 U/ml penicilinu + 100 µg/ml streptomycinu) nahrazeno médiem bez fetálního bovinního séra. Buňky byly kultivovány další tři dny, poté bylo médium sebráno a byly v něm stanoveny hydrolytická a chitin-vazebná aktivita.

Chitotriosidázové aktivity, stanovované postupem popsaným v příkladu 9, byly v médiu, ve kterém byly kultivovány buňky exprimující nezkrácenou chitinázu (57,6 nmol/ml/min), a v médiu, kde byly kultivovány buňky exprimující fragment chitinázy zkrácený z C-konce (57,8 nmol/ml/min), téměř totožné. To odpovídá výsledkům uvedeným v příkladu 6. Substrátem pro stanovení chitotriosidázové aktivity (postupem popsaným v příkladu 9) je triacetylchitotrióza, což je rozpustný trisacharid.

Za účelem srovnání chitin-vazebné aktivity byl na jemný prášek v hmoždíři rozetřen chitin z krunýře kraba (Sigma). Takto získaný prášek byl třikrát promyt ekvilibračním pufrem (20 mM Tris, pH 8, 500 mM NaCl) a rozsuspendován na koncentraci 100 mg/ml. 100 µl této suspenze bylo přidáno k 1 ml kultivačního média transfekovaných buněk COS a vzniklá směs byla při 4°C za stálého míchání inkubována po dobu 4 hodin. Po ukončení inkubace byl chitin odstraněn centrifugací (5 minut, 12000 x g). Ke stejným objemům takto získa-

ných supernatantů byl přidán Laemliho pufr a 50 mM dithiothreitol (DTT), vzorky byly uvařeny a elektroforeticky rozděleny na 12% polyakrylamidovém gelu (Novex). Následná analýza metodou Western blot s využitím monoklonální protilátky specificky namířené proti chitináze (206A) odhalila, že v supernatantech nezůstala žádná nezkrácená chitináza, což znamená, že veškerá nezkrácená chitináza se navázala na chitin a společně s ním přešla při centrifugaci do sedimentu. Naproti tomu v supernatantech s fragmentem zkráceným z C-konce (aminokyseliny 1 až 373) nebylo po inkubaci s chitinem pozorováno snížení množství tohoto fragmentu což ukazuje, že tento zkrácený konstrukt se na chitin neváže.

Získané výsledky naznačují, že 72 C-koncových aminokyselin lidské chitinázy je nezbytných pro chitin-vazebnou aktivitu, ale ne pro hydrolýzu triacetylchitotriózy.

B. Chitin-vazebná doména je nezbytná pro hydrolýzu chitinu, ale ne pro hydrolýzu triacetylchitotriózy.

Substrát použitý v příkladu 16A ke stanovení chitotriosidázové aktivity je rozpustný trisacharid. Nativní chitin je naproti tomu nerozpustný polysacharid s dlouhým řetězcem. Je tudíž možné, že schopnost enzymu hydrolyzovat krátké analogy nemusí predikovat schopnost hydrolyzovat chitin. Chitin z krunýře kraba byl za účelem srovnání chitinolytické aktivity nezkrácené chitinázy (445 aminokyselin) a fragmentu zkráceného z C-konce (aminokyseliny 1 až 373) zainkorporován do agarózového gelu. Do ztuhlého gelu byly vyříznuty jamky a do nich byla umístěna buď nezkrácená chitináza nebo zkrácený fragment. Po ukončení inkubace byl rozsah hydrolýzy chitinu indikován zónou prosvětlení kolem každé z jamek.

Tento pokus byl proveden následovně. Suspenze 0,4% chitinu a 1,5% agarózy ve 20 mM fosforečnanu sodném, pH 6, by-

la uvařena, ve vrstvě o tloušťce 2 mm nalita na Petriho misky (průměr 10 cm) a ponechána ztuhnout. Do této matrice (agaróza/chitin) byly vyříznuty jamky o průměru 3 mm. Před nanesením do jamek byly proteiny v médiích použitých ke kultivaci transfekovaných buněk COS 70-ti násobně zakoncentrovány přes filtrační membránu s MWCO 30000 (Millipore). Do sousedních jamek byla nanesena stejná množství rekombinantní nezkrácené chitinázy a rekombinantní chitinázy zkrácené z C-konce. Do třetí jamky bylo umístěno médium použité pro kultivaci buněk COS transfekovaných kontrolním plazmidem. Aby bylo možné pozorovat zóny prosvětlení kolem jednotlivých jamek, bylo nezbytné nanášku vzorků několikrát opakovat. Kolem jamek naplněných koncentrovaným médiem použitým při kultivaci buněk COS produkujících nezkrácenou chitinázu byla pozorována zóna prosvětlení o šířce 3 mm. Kolem jamek naplněných koncentrovanými médii použitými při kultivaci buněk COS produkujících buď zkrácený fragment nebo transfekovaných prázdným vektorem nebyla tato zóna pozorována.

Tyto výsledky ukazují, že 72 C-koncových aminokyselin je nezbytných k hydrolýze chitinu lidskou chitinázou.

Příklad 17

Chemická modifikace rekombinantní chitin-vazebné domény konjugací s jinými látkami

Za účelem zjištění, zda-li může být chitin-vazebná doména použita jako nosič pro nízkomolekulární farmaceutické látky, byla tato chitin-vazebná doména zahrnující v lidské chitináze aminokyseliny 392 až 445 chemicky konjugována s biotinem nebo rhodaminem, a to následujícím způsobem.

Biotinylace byla provedena soupravou EZ-link-Sulfo-NHS-Biotinylation (Pierce) postupem doporučeným výrobcem. Je pravděpodobné, že biotinylační činidlo bude na chitin-

vazebné doméně atakovat volné aminoskupiny, což jsou N-koncová aminoskupina a aminoskupiny na lysinech 402 a 440. V souladu s těmito předpoklady prokázala hmotnostní spektrometrie (MALDI) tři entity s molekulovými hmotnostmi odpovídajícími přítomnosti jedné, dvou nebo tří molekul biotinu na molekulu peptidu. Převážná část peptidů (více než 60%) byla biotinylována trojnásobně.

Rhodamin byl na N-konec chitin-vazebné domény připojen prostřednictvím vazby se sukcinimidem (Molecular Probes).

Chitin-vazebné charakteristiky peptidů s navázaným biotinem nebo rhodaminem byly nerozlišitelné od charakteristik neznačeného peptidu. To naznačuje, že chitin-vazebná doména je bez ovlivnění chitin-vazebné aktivity schopna tolerovat některé chemické modifikace.

Je zřejmé, že odborníci mohou vymyslet spoustu modifikací a obměn tohoto vynálezu. Vynález je tudíž limitován pouze připojenými patentovými nároky.

SEZNAM SEKVENCÍ

<110> (vynálezce) Gray, Patrick W.
(vynálezce) Tjoelker, Larry W.
ICOS Corporation

<120> Chitin-vazebné fragmenty chitinázy

<130> 27866/35407

<140>
<141>

<150> 09/09198
<151> 1998-03-12

<160> 39

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 1636
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (2)..(1399)

<220>
<221> mat_peptid
<222> (65)..(1399)

<400> 1

```
c atg gtg cgg tct gtg gcc tgg gca ggt ttc atg gtc ctg ctg atg atc 49
  Met Val Arg Ser Val Ala Trp Ala Gly Phe Met Val Leu Leu Met Ile
      -20                 -15                 -10

cca tgg ggc tct gct gca aaa ctg gtc tgc tac ttc acc aac tgg gcc  97
Pro Trp Gly Ser Ala Ala Lys Leu Val Cys Tyr Phe Thr Asn Trp Ala
 -5              -1   1              5                  10

cag tac aga cag ggg gag gct cgc ttc ctg ccc aag gac ttg gac ccc 145
Gln Tyr Arg Gln Gly Glu Ala Arg Phe Leu Pro Lys Asp Leu Asp Pro
             15                  20                  25

agc ctt tgc acc cac ctc atc tac gcc ttc gct ggc atg acc aac cac 193
Ser Leu Cys Thr His Leu Ile Tyr Ala Phe Ala Gly Met Thr Asn His
         30                  35                  40

cag ctg agc acc act gag tgg aat gac gag act ctc tac cag gag ttc 241
Gln Leu Ser Thr Thr Glu Trp Asn Asp Glu Thr Leu Tyr Gln Glu Phe
     45                  50                  55
```

06.03.01

```
aat ggc ctg aag aag atg aat ccc aag ctg aag acc ctg tta gcc atc   289
Asn Gly Leu Lys Lys Met Asn Pro Lys Leu Lys Thr Leu Leu Ala Ile
 60                  65                  70                  75

gga ggc tgg aat ttc ggc act cag aag ttc aca gat atg gta gcc acg   337
Gly Gly Trp Asn Phe Gly Thr Gln Lys Phe Thr Asp Met Val Ala Thr
                 80                  85                  90

gcc aac aac cgt cag acc ttt gtc aac tcg gcc atc agg ttt ctg cgc   385
Ala Asn Asn Arg Gln Thr Phe Val Asn Ser Ala Ile Arg Phe Leu Arg
             95                 100                 105

aaa tac agc ttt gac ggc ctt gac ctt gac tgg gag tac cca gga agc   433
Lys Tyr Ser Phe Asp Gly Leu Asp Leu Asp Trp Glu Tyr Pro Gly Ser
        110                 115                 120

cag ggg agc cct gcc gta gac aag gag cgc ttc aca acc ctg gta cag   481
Gln Gly Ser Pro Ala Val Asp Lys Glu Arg Phe Thr Thr Leu Val Gln
    125                 130                 135

gac ttg gcc aat gcc ttc cag cag gaa gcc cag acc tca ggg aag gaa   529
Asp Leu Ala Asn Ala Phe Gln Gln Glu Ala Gln Thr Ser Gly Lys Glu
140                 145                 150                 155

cgc ctt ctt ctg agt gca gcg gtt cca gct ggg cag acc tat gtg gat   577
Arg Leu Leu Leu Ser Ala Ala Val Pro Ala Gly Gln Thr Tyr Val Asp
                160                 165                 170

gct gga tac gag gtg gac aaa atc gcc cag aac ctg gat ttt gtc aac   625
Ala Gly Tyr Glu Val Asp Lys Ile Ala Gln Asn Leu Asp Phe Val Asn
            175                 180                 185

ctt atg gcc tac gac ttc cat ggc tct tgg gag aag gtc acg gga cat   673
Leu Met Ala Tyr Asp Phe His Gly Ser Trp Glu Lys Val Thr Gly His
        190                 195                 200

aac agc ccc ctc tac aag agg caa gaa gag agt ggt gca gca gcc agc   721
Asn Ser Pro Leu Tyr Lys Arg Gln Glu Glu Ser Gly Ala Ala Ala Ser
    205                 210                 215

ctc aac gtg gat gct gct gtg caa cag tgg ctg cag aag ggg acc cct   769
Leu Asn Val Asp Ala Ala Val Gln Gln Trp Leu Gln Lys Gly Thr Pro
220                 225                 230                 235

gcc agc aag ctg atc ctt ggc atg cct acc tac gga cgc tcc ttc aca   817
Ala Ser Lys Leu Ile Leu Gly Met Pro Thr Tyr Gly Arg Ser Phe Thr
                240                 245                 250

ctg gcc tcc tca tca gac acc aga gtg ggg gcc cca gcc aca ggg tct   865
Leu Ala Ser Ser Ser Asp Thr Arg Val Gly Ala Pro Ala Thr Gly Ser
            255                 260                 265

ggc act cca ggc ccc ttc acc aag gaa gga ggg atg ctg gcc tac tat   913
Gly Thr Pro Gly Pro Phe Thr Lys Glu Gly Gly Met Leu Ala Tyr Tyr
        270                 275                 280
```

```
gaa gtc tgc tcc tgg aag ggg gcc acc aaa cag aga atc cag gat cag   961
Glu Val Cys Ser Trp Lys Gly Ala Thr Lys Gln Arg Ile Gln Asp Gln
    285                 290                 295

aag gtg ccc tac atc ttc cgg gac aac cag tgg gtg ggc ttt gat gat  1009
Lys Val Pro Tyr Ile Phe Arg Asp Asn Gln Trp Val Gly Phe Asp Asp
300                 305                 310                 315

gtg gag agc ttc aaa acc aag gtc agc tat ctg aag cag aag gga ctg  1057
Val Glu Ser Phe Lys Thr Lys Val Ser Tyr Leu Lys Gln Lys Gly Leu
                320                 325                 330

ggc ggg gcc atg gtc tgg gca ctg gac tta gat gac ttt gcc ggc ttc  1105
Gly Gly Ala Met Val Trp Ala Leu Asp Leu Asp Asp Phe Ala Gly Phe
            335                 340                 345

tcc tgc aac cag ggc cga tac ccc ctc atc cag acg cta cgg cag gaa  1153
Ser Cys Asn Gln Gly Arg Tyr Pro Leu Ile Gln Thr Leu Arg Gln Glu
        350                 355                 360

ctg agt ctt cca tac ttg cct tca ggc acc cca gag ctt gaa gtt cca  1201
Leu Ser Leu Pro Tyr Leu Pro Ser Gly Thr Pro Glu Leu Glu Val Pro
    365                 370                 375

aaa cca ggt cag ccc tct gaa cct gag cat ggc ccc agc cct gga caa  1249
Lys Pro Gly Gln Pro Ser Glu Pro Glu His Gly Pro Ser Pro Gly Gln
380                 385                 390                 395

gac acg ttc tgc cag ggc aaa gct gat ggg ctc tat ccc aat cct cgg  1297
Asp Thr Phe Cys Gln Gly Lys Ala Asp Gly Leu Tyr Pro Asn Pro Arg
                400                 405                 410

gaa cgg tcc agc ttc tac agc tgt gca gcg ggg cgg ctg ttc cag caa  1345
Glu Arg Ser Ser Phe Tyr Ser Cys Ala Ala Gly Arg Leu Phe Gln Gln
            415                 420                 425

agc tgc ccg aca ggc ctg gtg ttc agc aac tcc tgc aaa tgc tgc acc  1393
Ser Cys Pro Thr Gly Leu Val Phe Ser Asn Ser Cys Lys Cys Cys Thr
        430                 435                 440

tgg aat tgagtcgcta aagcccctcc agtcccagct ttgaggctgg gcccaggatc   1449
Trp Asn
    445

actctacagc ctgcctcctg ggttttccct gggggccgca atctggctcc tgcaggcctt 1509

tctgtggtct tcctttatcc aggctttctg ctctcagcct tgccttcctt ttttctgggt 1569

ctcctgggct gccccttttca cttgcaaaat aaatctttgg tttgtgcccc tcttcccaaa 1629

aaaaaaa                                                          1636
```

<210> 2
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

```
Met Val Arg Ser Val Ala Trp Ala Gly Phe Met Val Leu Leu Met Ile
-20                 -15                 -10

Pro Trp Gly Ser Ala Ala Lys Leu Val Cys Tyr Phe Thr Asn Trp Ala
-5              -1  1                   5                  10

Gln Tyr Arg Gln Gly Glu Ala Arg Phe Leu Pro Lys Asp Leu Asp Pro
            15                  20                  25

Ser Leu Cys Thr His Leu Ile Tyr Ala Phe Ala Gly Met Thr Asn His
        30                  35                  40

Gln Leu Ser Thr Thr Glu Trp Asn Asp Glu Thr Leu Tyr Gln Glu Phe
    45                  50                  55

Asn Gly Leu Lys Lys Met Asn Pro Lys Leu Lys Thr Leu Leu Ala Ile
60                  65                  70                  75

Gly Gly Trp Asn Phe Gly Thr Gln Lys Phe Thr Asp Met Val Ala Thr
                80                  85                  90

Ala Asn Asn Arg Gln Thr Phe Val Asn Ser Ala Ile Arg Phe Leu Arg
            95                  100                 105

Lys Tyr Ser Phe Asp Gly Leu Asp Leu Asp Trp Glu Tyr Pro Gly Ser
        110                 115                 120

Gln Gly Ser Pro Ala Val Asp Lys Glu Arg Phe Thr Thr Leu Val Gln
    125                 130                 135

Asp Leu Ala Asn Ala Phe Gln Gln Glu Ala Gln Thr Ser Gly Lys Glu
140                 145                 150                 155

Arg Leu Leu Leu Ser Ala Ala Val Pro Ala Gly Gln Thr Tyr Val Asp
                160                 165                 170

Ala Gly Tyr Glu Val Asp Lys Ile Ala Gln Asn Leu Asp Phe Val Asn
            175                 180                 185

Leu Met Ala Tyr Asp Phe His Gly Ser Trp Glu Lys Val Thr Gly His
        190                 195                 200

Asn Ser Pro Leu Tyr Lys Arg Gln Glu Glu Ser Gly Ala Ala Ala Ser
    205                 210                 215

Leu Asn Val Asp Ala Ala Val Gln Gln Trp Leu Gln Lys Gly Thr Pro
220                 225                 230                 235

Ala Ser Lys Leu Ile Leu Gly Met Pro Thr Tyr Gly Arg Ser Phe Thr
                240                 245                 250
```

06.03.01

```
Leu Ala Ser Ser Ser Asp Thr Arg Val Gly Ala Pro Ala Thr Gly Ser
            255                 260                 265

Gly Thr Pro Gly Pro Phe Thr Lys Glu Gly Gly Met Leu Ala Tyr Tyr
        270                 275                 280

Glu Val Cys Ser Trp Lys Gly Ala Thr Lys Gln Arg Ile Gln Asp Gln
    285                 290                 295

Lys Val Pro Tyr Ile Phe Arg Asp Asn Gln Trp Val Gly Phe Asp Asp
300                 305                 310                 315

Val Glu Ser Phe Lys Thr Lys Val Ser Tyr Leu Lys Gln Lys Gly Leu
                320                 325                 330

Gly Gly Ala Met Val Trp Ala Leu Asp Leu Asp Asp Phe Ala Gly Phe
            335                 340                 345

Ser Cys Asn Gln Gly Arg Tyr Pro Leu Ile Gln Thr Leu Arg Gln Glu
        350                 355                 360

Leu Ser Leu Pro Tyr Leu Pro Ser Gly Thr Pro Glu Leu Glu Val Pro
    365                 370                 375

Lys Pro Gly Gln Pro Ser Glu Pro Glu His Gly Pro Ser Pro Gly Gln
380                 385                 390                 395

Asp Thr Phe Cys Gln Gly Lys Ala Asp Gly Leu Tyr Pro Asn Pro Arg
                400                 405                 410

Glu Arg Ser Ser Phe Tyr Ser Cys Ala Ala Gly Arg Leu Phe Gln Gln
            415                 420                 425

Ser Cys Pro Thr Gly Leu Val Phe Ser Asn Ser Cys Lys Cys Cys Thr
        430                 435                 440

Trp Asn
    445
```

<210> 3
<211> 1656
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (27)..(1424)

<220>
<221> mat_peptid
<222> (90)..(1424)

<400> 3
gctgcagcct gccgctgagc tgcatc atg gtg cgg tct gtg gcc tgg gca ggt 53

06.03.01

```
                                  Met Val Arg Ser Val Ala Trp Ala Gly
                                      -20                 -15

ttc atg gtc ctg ctg atg atc cca tgg ggc tct gct gca aaa ctg gtc    101
Phe Met Val Leu Leu Met Ile Pro Trp Gly Ser Ala Ala Lys Leu Val
        -10                 -5                  -1  1

tgc tac ttc acc aac tgg gcc cag tac aga cag ggg gag gct cgc ttc    149
Cys Tyr Phe Thr Asn Trp Ala Gln Tyr Arg Gln Gly Glu Ala Arg Phe
  5                 10                  15                  20

ctg ccc aag gac ttg gac ccc agc ctt tgc acc cac ctc atc tac gcc    197
Leu Pro Lys Asp Leu Asp Pro Ser Leu Cys Thr His Leu Ile Tyr Ala
                25                  30                  35

ttc gct ggc atg acc aac cac cag ctg agc acc act gag tgg aat gac    245
Phe Ala Gly Met Thr Asn His Gln Leu Ser Thr Thr Glu Trp Asn Asp
            40                  45                  50

gag act ctc tac cag gag ttc aat ggc ctg aag aag atg aat ccc aag    293
Glu Thr Leu Tyr Gln Glu Phe Asn Gly Leu Lys Lys Met Asn Pro Lys
        55                  60                  65

ctg aag acc ctg tta gcc atc gga ggc tgg aat ttc agc act cag aag    341
Leu Lys Thr Leu Leu Ala Ile Gly Gly Trp Asn Phe Ser Thr Gln Lys
    70                  75                  80

ttc aca gat atg gta gcc acg gcc aac aac cgt cag acc ttt gtc aac    389
Phe Thr Asp Met Val Ala Thr Ala Asn Asn Arg Gln Thr Phe Val Asn
85                  90                  95                  100

tcg gcc atc agg ttt ctg cgc aaa tac agc ttt gac ggc ctt gac ctt    437
Ser Ala Ile Arg Phe Leu Arg Lys Tyr Ser Phe Asp Gly Leu Asp Leu
                105                 110                 115

gac tgg gag tac cca gga agc cag ggg agc cct gcc gta gac aag gag    485
Asp Trp Glu Tyr Pro Gly Ser Gln Gly Ser Pro Ala Val Asp Lys Glu
            120                 125                 130

cgc ttc aca acc ctg gta cag gac ttg gcc aat gcc ttc cag cag gaa    533
Arg Phe Thr Thr Leu Val Gln Asp Leu Ala Asn Ala Phe Gln Gln Glu
        135                 140                 145

gcc cag acc tca ggg aag gaa cgc ctt ctt ctg agt gca gcg gtt cca    581
Ala Gln Thr Ser Gly Lys Glu Arg Leu Leu Leu Ser Ala Ala Val Pro
    150                 155                 160

gct ggg cag acc tat gtg gat gct gga tac gag gtg gac aaa atc gcc    629
Ala Gly Gln Thr Tyr Val Asp Ala Gly Tyr Glu Val Asp Lys Ile Ala
165                 170                 175                 180

cag aac ctg gat ttt gtc aac ctt atg gcc tac gac ttc cat ggc tct    677
Gln Asn Leu Asp Phe Val Asn Leu Met Ala Tyr Asp Phe His Gly Ser
                185                 190                 195
```

08.03.01

```
tgg gag aag gtc acg gga cat aac agc ccc ctc tac aag agg caa gaa   725
Trp Glu Lys Val Thr Gly His Asn Ser Pro Leu Tyr Lys Arg Gln Glu
            200                 205                 210

gag agt ggt gca gca gcc agc ctc aac gtg gat gct gct gtg caa cag   773
Glu Ser Gly Ala Ala Ala Ser Leu Asn Val Asp Ala Ala Val Gln Gln
        215                 220                 225

tgg ctg cag aag ggg acc cct gcc agc aag ctg atc ctt ggc atg cct   821
Trp Leu Gln Lys Gly Thr Pro Ala Ser Lys Leu Ile Leu Gly Met Pro
    230                 235                 240

acc tac gga cgc tcc ttc aca ctg gcc tcc tca tca gac acc aga gtg   869
Thr Tyr Gly Arg Ser Phe Thr Leu Ala Ser Ser Ser Asp Thr Arg Val
245                 250                 255                 260

ggg gcc cca gcc aca ggg tct ggc act cca ggc ccc ttc acc aag gaa   917
Gly Ala Pro Ala Thr Gly Ser Gly Thr Pro Gly Pro Phe Thr Lys Glu
                265                 270                 275

gga ggg atg ctg gcc tac tat gaa gtc tgc tcc tgg aag ggg gcc acc   965
Gly Gly Met Leu Ala Tyr Tyr Glu Val Cys Ser Trp Lys Gly Ala Thr
            280                 285                 290

aaa cag aga atc cag gat cag aag gtg ccc tac atc ttc cgg gac aac   1013
Lys Gln Arg Ile Gln Asp Gln Lys Val Pro Tyr Ile Phe Arg Asp Asn
        295                 300                 305

cag tgg gtg ggc ttt gat gat gtg gag agc ttc aaa acc aag gtc agc   1061
Gln Trp Val Gly Phe Asp Asp Val Glu Ser Phe Lys Thr Lys Val Ser
    310                 315                 320

tat ctg aag cag aag gga ctg ggc ggg gcc atg gtc tgg gca ctg gac   1109
Tyr Leu Lys Gln Lys Gly Leu Gly Gly Ala Met Val Trp Ala Leu Asp
325                 330                 335                 340

tta gat gac ttt gcc ggc ttc tcc tgc aac cag ggc cga tac ccc ctc   1157
Leu Asp Asp Phe Ala Gly Phe Ser Cys Asn Gln Gly Arg Tyr Pro Leu
                345                 350                 355

atc cag acg cta cgg cag gaa ctg agt ctt cca tac ttg cct tca ggc   1205
Ile Gln Thr Leu Arg Gln Glu Leu Ser Leu Pro Tyr Leu Pro Ser Gly
            360                 365                 370

acc cca gag ctt gaa gtt cca aaa cca ggt cag ccc tct gaa cct gag   1253
Thr Pro Glu Leu Glu Val Pro Lys Pro Gly Gln Pro Ser Glu Pro Glu
        375                 380                 385

cat ggc ccc agc cct gga caa gac acg ttc tgc cag ggc aaa gct gat   1301
His Gly Pro Ser Pro Gly Gln Asp Thr Phe Cys Gln Gly Lys Ala Asp
    390                 395                 400

ggg ctc tat ccc aat cct cgg gaa cgg tcc agc ttc tac agc tgt gca   1349
Gly Leu Tyr Pro Asn Pro Arg Glu Arg Ser Ser Phe Tyr Ser Cys Ala
405                 410                 415                 420
```

05.03.01

gcg ggg cgg ctg ttc cag caa agc tgc ccg aca ggc ctg gtg ttc agc 1397
Ala Gly Arg Leu Phe Gln Gln Ser Cys Pro Thr Gly Leu Val Phe Ser
425 430 435

aac tcc tgc aaa tgc tgc acc tgg aat tgagtcgcta aagcccctcc 1444
Asn Ser Cys Lys Cys Cys Thr Trp Asn
440 445

agtcccagct ttgaggctgg gcccaggatc actctacagc ctgcctcctg ggttttccct 1504

gggggccgca atctggctcc tgcaggcctt tctgtggtct tcctttatcc aggctttctg 1564

ctctcagcct tgccttcctt ttttctgggt ctcctgggct gccccttca cttgcaaaat 1624

aaatctttgg tttgtgcccc tcaaaaaaaa aa 1656

<210> 4
<211> 466
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Val Arg Ser Val Ala Trp Ala Gly Phe Met Val Leu Leu Met Ile
-20 -15 -10

Pro Trp Gly Ser Ala Ala Lys Leu Val Cys Tyr Phe Thr Asn Trp Ala
-5 -1 1 5 10

Gln Tyr Arg Gln Gly Glu Ala Arg Phe Leu Pro Lys Asp Leu Asp Pro
15 20 25

Ser Leu Cys Thr His Leu Ile Tyr Ala Phe Ala Gly Met Thr Asn His
30 35 40

Gln Leu Ser Thr Thr Glu Trp Asn Asp Glu Thr Leu Tyr Gln Glu Phe
45 50 55

Asn Gly Leu Lys Lys Met Asn Pro Lys Leu Lys Thr Leu Leu Ala Ile
60 65 70 75

Gly Gly Trp Asn Phe Ser Thr Gln Lys Phe Thr Asp Met Val Ala Thr
80 85 90

Ala Asn Asn Arg Gln Thr Phe Val Asn Ser Ala Ile Arg Phe Leu Arg
95 100 105

Lys Tyr Ser Phe Asp Gly Leu Asp Leu Asp Trp Glu Tyr Pro Gly Ser
110 115 120

Gln Gly Ser Pro Ala Val Asp Lys Glu Arg Phe Thr Thr Leu Val Gln
125 130 135

Asp Leu Ala Asn Ala Phe Gln Gln Glu Ala Gln Thr Ser Gly Lys Glu
140 145 150 155

08.03.01

Arg Leu Leu Leu Ser Ala Ala Val Pro Ala Gly Gln Thr Tyr Val Asp
160 165 170

Ala Gly Tyr Glu Val Asp Lys Ile Ala Gln Asn Leu Asp Phe Val Asn
175 180 185

Leu Met Ala Tyr Asp Phe His Gly Ser Trp Glu Lys Val Thr Gly His
190 195 200

Asn Ser Pro Leu Tyr Lys Arg Gln Glu Glu Ser Gly Ala Ala Ala Ser
205 210 215

Leu Asn Val Asp Ala Ala Val Gln Gln Trp Leu Gln Lys Gly Thr Pro
220 225 230 235

Ala Ser Lys Leu Ile Leu Gly Met Pro Thr Tyr Gly Arg Ser Phe Thr
240 245 250

Leu Ala Ser Ser Ser Asp Thr Arg Val Gly Ala Pro Ala Thr Gly Ser
255 260 265

Gly Thr Pro Gly Pro Phe Thr Lys Glu Gly Gly Met Leu Ala Tyr Tyr
270 275 280

Glu Val Cys Ser Trp Lys Gly Ala Thr Lys Gln Arg Ile Gln Asp Gln
285 290 295

Lys Val Pro Tyr Ile Phe Arg Asp Asn Gln Trp Val Gly Phe Asp Asp
300 305 310 315

Val Glu Ser Phe Lys Thr Lys Val Ser Tyr Leu Lys Gln Lys Gly Leu
320 325 330

Gly Gly Ala Met Val Trp Ala Leu Asp Leu Asp Asp Phe Ala Gly Phe
335 340 345

Ser Cys Asn Gln Gly Arg Tyr Pro Leu Ile Gln Thr Leu Arg Gln Glu
350 355 360

Leu Ser Leu Pro Tyr Leu Pro Ser Gly Thr Pro Glu Leu Glu Val Pro
365 370 375

Lys Pro Gly Gln Pro Ser Glu Pro Glu His Gly Pro Ser Pro Gly Gln
380 385 390 395

Asp Thr Phe Cys Gln Gly Lys Ala Asp Gly Leu Tyr Pro Asn Pro Arg
400 405 410

Glu Arg Ser Ser Phe Tyr Ser Cys Ala Ala Gly Arg Leu Phe Gln Gln
415 420 425

Ser Cys Pro Thr Gly Leu Val Phe Ser Asn Ser Cys Lys Cys Cys Thr
430 435 440

<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> Uměle připravená sekvence

<220>
<223> Popis uměle připravené sekvence: primer

<400> 5
gacactatag aatagggc 18

<210> 6
<211> 51
<212> DNA
<213> Uměle připravená sekvence

<220>
<223> Popis uměle připravené sekvence: primer

<400> 6
tgggatcatc agcaggacca tgaaacctgc ccaggccaca gaccgcacca t 51

<210> 7
<211> 40
<212> DNA
<213> Uměle připravená sekvence

<220>
<223> Popis uměle připravené sekvence: primer

<400> 7
tacatctaga attatggcaa aactggtctg ctacttcacc 40

<210> 8
<211> 34
<212> DNA
<213> Uměle připravená sekvence

<220>
<223> Popis uměle připravené sekvence: primer

<400> 8
agatctaacc ttaggtgcct gaagacaagt atgg 34

<210> 9
<211> 29
<212> DNA
<213> Uměle připravená sekvence

<220>
<223> Popis uměle připravené sekvence: primer

<400> 9
tacagaattc ttattcacat ccggccctg 29

<210> 10
<211> 34
<212> DNA
<213> Uměle připravená sekvence

<220>
<223> Popis uměle připravené sekvence: primer

<400> 10
tacatctaga ctccatccag aaaaacaggt atgg 34

<210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> Uměle připravená sekvence

<220>
<223> Popis uměle připravené sekvence: primer

<400> 11
tctagagtcg acctgcaggc atgcaagctt 30

<210> 12
<211> 50
<212> DNA
<213> Uměle připravená sekvence

<220>
<223> Popis uměle připravené sekvence: primer

<400> 12
cgcaagcttg agagctccgt tccgccacat ggtgcggtct gtggcctggg 50

<210> 13
<211> 32
<212> DNA
<213> Uměle připravená sekvence

<220>
<223> Popis uměle připravené sekvence: primer

<400> 13

gactctagac taggtgcctg aaggcaagta tg 32

<210> 14
<211> 373
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Ala Lys Leu Val Cys Tyr Phe Thr Asn Trp Ala Gln Tyr Arg Gln Gly
1 5 10 15

Glu Ala Arg Phe Leu Pro Lys Asp Leu Asp Pro Ser Leu Cys Thr His
20 25 30

Leu Ile Tyr Ala Phe Ala Gly Met Thr Asn His Gln Leu Ser Thr Thr
35 40 45

Glu Trp Asn Asp Glu Thr Leu Tyr Gln Glu Phe Asn Gly Leu Lys Lys
50 55 60

Met Asn Pro Lys Leu Lys Thr Leu Leu Ala Ile Gly Gly Trp Asn Phe
65 70 75 80

Gly Thr Gln Lys Phe Thr Asp Met Val Ala Thr Ala Asn Asn Arg Gln
85 90 95

Thr Phe Val Asn Ser Ala Ile Arg Phe Leu Arg Lys Tyr Ser Phe Asp
100 105 110

Gly Leu Asp Leu Asp Trp Glu Tyr Pro Gly Ser Gln Gly Ser Pro Ala
115 120 125

Val Asp Lys Glu Arg Phe Thr Thr Leu Val Gln Asp Leu Ala Asn Ala
130 135 140

Phe Gln Gln Glu Ala Gln Thr Ser Gly Lys Glu Arg Leu Leu Leu Ser
145 150 155 160

Ala Ala Val Pro Ala Gly Gln Thr Tyr Val Asp Ala Gly Tyr Glu Val
165 170 175

Asp Lys Ile Ala Gln Asn Leu Asp Phe Val Asn Leu Met Ala Tyr Asp
180 185 190

Phe His Gly Ser Trp Glu Lys Val Thr Gly His Asn Ser Pro Leu Tyr
195 200 205

Lys Arg Gln Glu Glu Ser Gly Ala Ala Ala Ser Leu Asn Val Asp Ala
210 215 220

Ala Val Gln Gln Trp Leu Gln Lys Gly Thr Pro Ala Ser Lys Leu Ile
225 230 235 240

Leu Gly Met Pro Thr Tyr Gly Arg Ser Phe Thr Leu Ala Ser Ser Ser
245 250 255

08.03.01

Asp Thr Arg Val Gly Ala Pro Ala Thr Gly Ser Gly Thr Pro Gly Pro
260 265 270

Phe Thr Lys Glu Gly Gly Met Leu Ala Tyr Tyr Glu Val Cys Ser Trp
275 280 285

Lys Gly Ala Thr Lys Gln Arg Ile Gln Asp Gln Lys Val Pro Tyr Ile
290 295 300

Phe Arg Asp Asn Gln Trp Val Gly Phe Asp Asp Val Glu Ser Phe Lys
305 310 315 320

Thr Lys Val Ser Tyr Leu Lys Gln Lys Gly Leu Gly Gly Ala Met Val
325 330 335

Trp Ala Leu Asp Leu Asp Asp Phe Ala Gly Phe Ser Cys Asn Gln Gly
340 345 350

Arg Tyr Pro Leu Ile Gln Thr Leu Arg Gln Glu Leu Ser Leu Pro Tyr
355 360 365

Leu Pro Ser Gly Thr
370

<210> 15
<211> 373
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Ala Lys Leu Val Cys Tyr Phe Thr Asn Trp Ala Gln Tyr Arg Gln Gly
1 5 10 15

Glu Ala Arg Phe Leu Pro Lys Asp Leu Asp Pro Ser Leu Cys Thr His
20 25 30

Leu Ile Tyr Ala Phe Ala Gly Met Thr Asn His Gln Leu Ser Thr Thr
35 40 45

Glu Trp Asn Asp Glu Thr Leu Tyr Gln Glu Phe Asn Gly Leu Lys Lys
50 55 60

Met Asn Pro Lys Leu Lys Thr Leu Leu Ala Ile Gly Gly Trp Asn Phe
65 70 75 80

Gly Thr Gln Lys Phe Thr Asp Met Val Ala Thr Ala Asn Asn Arg Gln
85 90 95

Thr Phe Val Asn Ser Ala Ile Arg Phe Leu Arg Lys Tyr Ser Phe Asp
100 105 110

Gly Leu Asp Leu Asp Trp Glu Tyr Pro Gly Ser Gln Gly Ser Pro Ala
115 120 125

08.03.01

```
Val Asp Lys Glu Arg Phe Thr Thr Leu Val Gln Asp Leu Ala Asn Ala
    130                 135                 140

Phe Gln Gln Glu Ala Gln Thr Ser Gly Lys Glu Arg Leu Leu Leu Ser
145                 150                 155                 160

Ala Ala Val Pro Ala Gly Gln Thr Tyr Val Asp Ala Gly Tyr Glu Val
                165                 170                 175

Asp Lys Ile Ala Gln Asn Leu Asp Phe Val Asn Leu Met Ala Tyr Asp
            180                 185                 190

Phe His Gly Ser Trp Glu Lys Val Thr Gly His Asn Ser Pro Leu Tyr
        195                 200                 205

Lys Arg Gln Glu Glu Ser Gly Ala Ala Ala Ser Leu Asn Val Asp Ala
    210                 215                 220

Ala Val Gln Gln Trp Leu Gln Lys Gly Thr Pro Ala Ser Lys Leu Ile
225                 230                 235                 240

Leu Gly Met Pro Thr Tyr Gly Arg Ser Phe Thr Leu Ala Ser Ser Ser
                245                 250                 255

Asp Thr Arg Val Gly Ala Pro Ala Thr Gly Ser Gly Thr Pro Gly Pro
            260                 265                 270

Phe Thr Lys Glu Gly Gly Met Leu Ala Tyr Tyr Glu Val Cys Ser Trp
        275                 280                 285

Lys Gly Ala Thr Lys Gln Arg Ile Gln Asp Gln Lys Val Pro Tyr Ile
    290                 295                 300

Phe Arg Asp Asn Gln Trp Val Gly Phe Asp Asp Val Glu Ser Phe Lys
305                 310                 315                 320

Thr Lys Val Ser Tyr Leu Lys Gln Lys Gly Leu Gly Gly Ala Met Val
                325                 330                 335

Trp Ala Leu Asp Leu Asp Asp Phe Ala Gly Phe Ser Cys Asn Gln Gly
            340                 345                 350

Arg Tyr Pro Leu Ile Gln Thr Leu Arg Gln Glu Leu Ser Leu Pro Tyr
        355                 360                 365

Leu Ser Ser Gly Thr
    370
```

<210> 16
<211> 28
<212> DNA
<213> Uměle připravená sekvence

<220>
<223> Popis uměle připravené sekvence: primer

<400> 16

tgatacggta ccgccccatg gctgacta 28

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Uměle připravená sekvence

<220>
<223> Popis uměle připravené sekvence: primer

<400> 17

gcaagtttgg cgcgaaatcg 20

<210> 18
<211> 66
<212> DNA
<213> Uměle připravená sekvence

<220>
<223> Popis uměle připravené sekvence: primer

<400> 18
gcttaagctt gctgcagcct gccgctgagc tgcatcatgc tactactact gctgctgctg 60

ggcctg 66

<210> 19
<211> 115
<212> DNA
<213> Uměle připravená sekvence

<220>
<223> Popis uměle připravené sekvence: primer

<400> 19
aacagggccc ttaattaatt aggtacctgc gcggccgcag catcgattgc tctagaagcg 60

atatcagcga attctgtctg ctcgaagcgg ccggccgccc cgactcgaga gtaac 115

<210> 20
<211> 34
<212> DNA
<213> Uměle připravená sekvence

<220>
<223> Popis uměle připravené sekvence: primer

<400> 20

tatagaattc ttctcctgca accagggccg atac 34

<210> 21
<211> 35
<212> DNA
<213> Uměle připravená sekvence

<220>
<223> Popis uměle připravené sekvence: primer

<400> 21
tatagaattc ccagagcttg aagttccaaa accag 35

<210> 22
<211> 35
<212> DNA
<213> Uměle připravená sekvence

<220>
<223> Popis uměle připravené sekvence: primer

<400> 22
tatagaattc agccctggac aagacacgtt ctgcc 35

<210> 23
<211> 35
<212> DNA
<213> Uměle připravená sekvence

<220>
<223> Popis uměle připravené sekvence: primer

<400> 23
agaggaattc cagggcaaag ctgatgggct ctatc 35

<210> 24
<211> 37
<212> DNA
<213> Uměle připravená sekvence

<220>
<223> Popis uměle připravené sekvence: primer

<400> 24
acaggaattc aatcctcggg aacggtccag cttctac 37

<210> 25
<211> 37
<212> DNA
<213> Uměle připravená sekvence

<220>
<223> Popis uměle připravené sekvence: primer

<400> 25
cacatctaga ttatgtcggg cagctttgct ggaacag 37

<210> 26
<211> 36
<212> DNA
<213> Uměle připravená sekvence

<220>
<223> Popis uměle připravené sekvence: primer

<400> 26
agagtctaga tcaattccag gtgcagcatt tgcagg 36

<210> 27
<211> 35
<212> DNA
<213> Uměle připravená sekvence

<220>
<223> Popis uměle připravené sekvence: primer

<400> 27
agaggaattc agccctggac aagacacgtt cagcc 35

<210> 28
<211> 97
<212> DNA
<213> Uměle připravená sekvence

<220>
<223> Popis uměle připravené sekvence: primer

<400> 28
agaggaattc agccctggac aagacacgtt ctgccagggc aaagctgatg ggctctatcc 60

caatcctcgg gaacggtcca gcttctacag cagtgca 97

<210> 29
<211> 67
<212> DNA
<213> Uměle připravená sekvence

<220>
<223> Popis uměle připravené sekvence: primer

<400> 29
tgcttctaga ttaattccag gtgcagcatt tgcaggagtt gctgaacacc aggcctgtcg 60

ggctgct 67

<210> 30
<211> 36
<212> DNA
<213> Uměle připravená sekvence

<220>
<223> Popis uměle připravené sekvence: primer

<400> 30
tgcttctaga ttaattccag gtgcagcatt tgctgg 36

<210> 31
<211> 36
<212> DNA
<213> Uměle připravená sekvence

<220>
<223> Popis uměle připravené sekvence: primer

<400> 31
tgcttctaga ttaattccag gtgcagcttt tgcagg 36

<210> 32
<211> 36
<212> DNA
<213> Uměle připravená sekvence

<220>
<223> Popis uměle připravené sekvence: primer

<400> 32
tgcttctaga ttaattccag gtgctgcatt tgcagg 36

<210> 33
<211> 72
<212> DNA
<213> Uměle připravená sekvence

<220>
<223> Popis uměle připravené sekvence: primer

<400> 33
ctctggtacc tttggataaa agagactaca aggacgacga tgacaagagc cctggacaag 60
acacgttctg cc 72

<210> 34
<211> 77
<212> DNA
<213> Uměle připravená sekvence

<220>
<223> Popis uměle připravené sekvence: primer

<400> 34
atatgcggcc gcgacttatc cactactatg atgatgatga tgatgtcctg ctccattcca 60
ggtgcagcat ttgcagg 77

<210> 35
<211> 37
<212> DNA
<213> Uměle připravená sekvence

<220>
<223> Popis uměle připravené sekvence: primer

<400> 35
ctctgaattc caagacacgt tctgccaggg caaagct 37

<210> 36
<211> 35
<212> DNA
<213> Uměle připravená sekvence

<220>
<223> Popis uměle připravené sekvence: primer

<400> 36
atatgaattc acgttctgcc agggcaaagc tgatg 35

<210> 37
<211> 41
<212> DNA
<213> Uměle připravená sekvence

<220>
<223> Popis uměle připravené sekvence: primer

<400> 37
aacatctaga ttaggtgcag catttgcagg agttgctgaa c 41

<210> 38
<211> 48
<212> DNA
<213> Uměle připravená sekvence

<220>
<223> Popis uměle připravené sekvence: primer

<400> 38
aagaggtacc tttggataaa agaagccctg gacaagacac gttctgcc 48

<210> 39
<211> 41
<212> DNA
<213> Uměle připravená sekvence

<220>
<223> Popis uměle připravené sekvence: primer

<400> 39
gagagcggcc gcgacttaat tccaggtgca gcatttgcag g 41

06.03.01

PV 2000-3308

17767

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Polypeptid s chitin-vazebnou aktivitou, ale postrádající chitinázovou aktivitu
v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e tento polypeptid zahrnuje chitin-vazebný fragment 54 C-koncových aminokyselin lidské chitinázy jak je popsána v SEK. ID. Č.: 2.

2. Polypeptid podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e tento polypeptid je vybrán ze skupiny zahrnující polypeptid o aminokyselinové sekvenci odpovídající v SEK. ID. Č.: 2 aminokyselinovým zbytkům 347 až 445, polypeptid o aminokyselinové sekvenci odpovídající v SEK. ID. Č.: 2 aminokyselinovým zbytkům 374 až 445, polypeptid o aminokyselinové sekvenci odpovídající v SEK. ID. Č.: 2 aminokyselinovým zbytkům 392 až 445, polypeptid o aminokyselinové sekvenci odpovídající v SEK. ID. Č.: 2 aminokyselinovým zbytkům 395 až 445 a polypeptid o aminokyselinové sekvenci odpovídající v SEK. ID. Č.: 2 aminokyselinovým zbytkům 397 až 445.

3. Polypeptid v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e tento polypeptid je vybrán ze skupiny zahrnující polypeptidy se sekvencí aminokyselin odpovídající v SEK. ID. Č.: 2 aminokyselinovým zbytkům X až Y, kde X zahrnuje všechna celá čísla v intervalu 347 až 397 a Y je 445.

4. Polypeptid s chitin-vazebnou aktivitou, ale postrádající chitinázovou aktivitu v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e tento polypeptid zahrnuje nějaký

polypeptid podle nároku 3.

5. Fúzní protein v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e tento protein zahrnuje polypeptid podle nároku 1 připojený k nějakému heterologním polypeptidu.

6. Fúzní protein podle nároku 5 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zmíněným heterologním polypeptidem je nějaký enzym.

7. Přípravek v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e tento přípravek zahrnuje polypeptid podle nároku 1 a fyziologicky přijatelné rozpouštědlo.

8. Přípravek podle nároku 7 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e tento přípravek dále zahrnuje antifungální látku non-chitinázové povahy.

9. Přípravek v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e tento přípravek zahrnuje polypeptid podle nároků 1 nebo 4 konjugovaný s nějakou antifungální látkou.

10. Způsob léčby infekcí patogenními houbami (mykóz) v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e tento způsob zahrnuje podání přípravku podle nějakého v nároků 7 nebo 8 subjektu postiženému nějakou infekcí patogenními houbami.

11. Způsob podle nároku 10 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e tento způsob dále zahrnuje aplikaci antifungální látku non-chitinázové povahy zmíněnému subjektu.

12. Přípravek v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e tento přípravek zahrnuje polypeptid podle nároků 1 nebo 4 konjugovaný s nějakou detekovatelnou značkou.

13. Přípravek podle nároku 12 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zmíněná detekovatelná značka je vybrána ze skupiny zahrnující radioizotopy, fluorofory, barvy, elektron-denzní sloučeniny a enzymy.

14. Způsob pro stanovení přítomnosti chitinu ve vzorcích v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e tento způsob zahrnuje:
(a) kontakt sledovaného vzorku s přípravkem podle nároku 12 a
(b) kvantifikaci značeného polypeptidu navázaného na chitin.

15. Souprava pro stanovení přítomnosti chitinu ve vzorcích v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e tato souprava zahrnuje přípravek podle nároku 12.

16. Purifikovaný izolovaný polynukleotid kódující polypeptid podle nároku 1.

17. Polynukleotid podle nároku 16 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e tímto polynukleotidem je DNA.

18. Nějaký vektor v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e tento vektor zahrnuje DNA podle nároku 17.

19. Hostitelská buňka stabilně transformovaná nebo transfekovaná DNA podle nároku 17 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e tato

hostitelská buňka exprimuje polypeptid kódovaný zmíněnou DNA.

20. Způsob produkce polypeptidu zahrnujícího fragment lidské chitinázy v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e tento způsob zahrnuje kultivaci hostitelských buněk podle nároku 19 v živném médiu a izolaci zmíněného polypeptidu z těchto hostitelských buněk nebo živného média.

21. Purifikovaný izolovaný polypeptid v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e tento polypeptid je produkován způsobem podle nároku 20.

22. Monoklonální protilátka v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e tato monoklonální protilátka specificky interaguje s epitopem v oblasti 54 C-koncových aminokyselin lidské chitinázy popsané sekvencí SEK. ID. Č.: 2:

23. Monoklonální protilátka podle nároku 22 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e tato monoklonální protilátka kompetuje s monoklonální protilátkou 243Q, produkovanou hybridomem uloženým pod přístupovým číslem ATCC _____, ve vazbě k fragmentu lidské chitinázy s chitin-vazebnou aktivitou, ale postrádajícím chitinázovou aktivitu.

24. Monoklonální protilátka podle nároku 22 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e tato monoklonální protilátka kompetuje s monoklonální protilátkou 243M, produkovanou hybridomem uloženým pod přístupovým číslem ATCC _____, ve vazbě k fragmentu

lidské chitinázy s chitin-vazebnou aktivitou, ale postrádajícím chitinázovou aktivitu.