PATENTOVÝ SPIS

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2000-3785**
(22) Přihlášeno: **12.04.1999**
(30) Právo přednosti: **15.04.1998 FR 1998/9804933**
(40) Zveřejněno: **14.03.2001**
(Věstník č. 3/2001)
(47) Uděleno: **12.01.2007**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **21.02.2007**
(Věstník č. 8/2007)
(86) PCT číslo: **PCT/FR1999/000843**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1999/053053**

(11) Číslo dokumentu:
297 645
(13) Druh dokumentu: **B6**
(51) Int. Cl.:

C12N 15/12	(2006.01)
C07K 14/435	(2006.01)
C12N 15/82	(2006.01)
C12N 15/62	(2006.01)
C12N 15/81	(2006.01)
A61K 38/17	(2006.01)
C12P 21/02	(2006.01)
A01H 4/00	(2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:
FR 2695392; WO 90/11770.
Hoffmann, J.A., Hetru C.: Insect defensins: inducible antibacterial peptides. Immunol Today, 1992, 13 (10):411-415.

(73) Majitel patentu:
BAYER CropScience SA, Lyon, FR

(72) Původce:
Lamberty Mireille, Strasbourg, FR
Bulet Philippe, Vendenheim, FR
Brookhart Gary Lee, Durham, NC, US
Hofmann Jules, Strasbourg, FR

(74) Zástupce:
Ing. Eduard Hakr, Přístavní 24, Praha 7, 17000

(54) Název vynálezu:
Peptid heliomicinu, přípravek obsahující tento peptid, nukleová kyselina kódující heliomicin, transformovaný hostitelský organismus a způsob transformace

(57) Anotace:
Řešení se týká heliomicinu, sekvence DNA kódující heliomicin, vektoru obsahujícího tento gen pro transformaci hostitelského organismu a způsobu transformace. Vynález se zvláště týká heliomicinu jakožto přípravku proti nemocem způsobeným houbami. Dále se zvláště týká transformace rostlinných buněk a rostlin, kde heliomicin v nich tvořený poskytuje těmto rostlinám odolnost k chorobám, zejména k chorobám houbového původu.

CZ 297645 B6

Peptid heliomicinu, přípravek obsahující tento peptid, nukleová kyselina kódující heliomicin, transformovaný hostitelský organismus a způsob transformace

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká nového peptidu bohatého n a cysteinové zbytky nazvaného heliomicin, použití tohoto peptidu jakožto léčiva. Dále se vynález týká přípravku, který obsahuje sekvenci DNA kódující tento peptid, vektoru obsahujícího tuto sekvenci vhodného pro transformaci hostitelského organismu a způsobu transformace takového organismu.

Vynález se zejména týká transformace rostlinných buněk a rostlin, kdy heliomicin produkovaný transformovanými rostlinami poskytuje těmto rostlinám rezistence k chorobám, zejména k chorobám houbového původu.

Dosavadní stav techniky

V současné době je pociťována potřeba získat rostliny,které jsou rezistentní proti chorobám, zejména houbovým chorobám, aby se z důvodu ochrany životního prostředí zmenšilo či případně zcela odstranilo používání fungicidních prostředků. Způsob, jak zvýšit rezistenci proti chorobám, spočívá v transformaci rostlin tak, aby tvořily látku, která je schopna jim zajistit ochranu proti těmto chorobám.

Pokud jde o oblast lidského zdraví, existují oportunní houbové infekce, proti kterým v současnosti není k dispozici účinná léčba. Konkrétně se jedná o určité těžké invazivní mykózy, které napadají pacienty s oslabeným imunitním systémem např. z důvodu transplantace, chemoterapie nebo infekce HIV. Ve srovnání s antibakteriálními činidly je arzenál protihoubových přípravků velmi omezený. Existuje proto stále potřeba vyvinout nové třídy látek s protihoubovým účinkem.

Jsou známy různé látky přírodního původu, zejména peptidy, které mají baktericidní nebo fungicidní vlastnosti, které působí zvláště proti houbám zodpovědným za choroby rostlin. Tudíž problém spočívá v tom, aby se mezi těmito látkami nalezla taková látka, která bude produkována v transformovaných rostlinách, a navíc si uchová své baktericidní nebo fungicidní vlastnosti, které tím poskytne uvedeným rostlinám. Ve smyslu předkládaného vynálezu se baktericidními nebo fungicidními vlastnostmi rozumí jak baktericidní a fungicidními vlastnostmi rozumí jak baktericidní a fungicidní vlastnosti v pravém smyslu slova, tak i vlastnosti bakteriostatické a fungistatické.

Je známo, že peptidy bohaté na cystein mají baktericidní nebo bakteriostatické vlastnosti, ale neprojevují fungicidní nebo fungistatickou aktivitu. Problémem je, na základě stavu techniky, tedy najít peptidy bohaté na cysteinové zbytky se silnou fungicidní nebo fungistatickou aktivitou.

Heliomicin je peptid, který byl izolován z hemolymfy motýla druhu *Heliothis virescens*, a který vykazuje fungicidní aktivitu působící proti houbám, působícím nemoci rostlin, lidí i zvířat.

Zvláště výhodné řešení výše uvedených problémů představuje syntéze genu kódujícího heliomicin, které se upraví tak, že se mohou vložit do hostitelského organismu, zejména do rostliny, kde exprimují heliomicin, ať již v čisté formě, nebo jinak, a hostitelský organismus díky expresi heliomicinu získá rezistenci k chorobám houbového původu.

Podstata vynálezu

Předmětem předkládaného vynálezu je heliomicin jeho použití jakožto léčiva nebo agrochemického přípravku k ochraně rostlin, přípravek obsahující heliomicin, fragment nukleové kyseliny,která kóduje heliomicin, chimérický gen obsahující tento fragment kódující heliomicin a heterologní regulační prvky v pozicích 5′ a 3′ funkční v hostitelském organismu, zejména v kvasinkách nebo rostlinách, a dále vektor pro transformaci hostitelského organismu obsahující chimérický gen a nakonec také transformovaný hostitelský organismus. Vynález se také týká transformované rostlinné buňky, která obsahuje přinejmenším jeden fragment nukleové kyseliny kódující heliomicin, a také rostliny rezistentní proti chorobám, která obsahuje tuto buňku, a zvláště rostliny, která byla regenerována z takové buňky. Dále se vynález týká způsobu transformace rostlin, kterou získají rezistenci k chorobám, když se do rostliny pomocí vhodného vektoru vnese gen kódující heliomicin. Vynález se také týká způsobu přípravy heliomicinu z hostitelského organismu.

Heliomicin podle předkládaného vynálezu je peptid, který obsahuje výslovně peptidovou sekvenci podle následujícího vzorce (I):

Xaa–Cys–Xab–Cys–Xac–Cys–Xad–Cys–Xae–Cys–Xaf–Cys–Xag (I)

kde

Xaa představuje skupinu NH_2 nebo peptidový zbytek obsahující 1 až 10 aminokyselin,

Xab představuje peptidový zbytek obsahující 1 až 10 aminokyselin, výhodně 10 aminokyselin,

Xac představuje peptidový zbytek obsahující 3 aminokyseliny,

Xad představuje peptidový zbytek obsahující 1 až 9 aminokyselin, výhodně 9 aminokyselin,

Xae představuje peptidový zbytek obsahující 1 až 7 aminokyselin, výhodně 7 aminokyselin,

Xaf představuje peptidový zbytek obsahující 1 aminokyselinu, a

Xag je skupina –OH nebo peptidový zbytek obsahující 1 až 5 aminokyselin, výhodně 1 až 2 aminokyseliny.

Ve výhodném provedení vynálezu Xaa obsahuje alespoň jednu bazickou aminokyselinu a/nebo Xad obsahuje alespoň jednu bazickou aminokyselinu. Výhodněji obsahuje Xad 1,2, 3 nebo 4 bazické aminokyseliny.

Výhodně Xad představuje peptidovou sekvenci –Lys–Xad′–Xad″–Gly–His–, kde Xad′ představuje peptidový zbytek 1 bazické aminokyseliny a Xad″ představuje peptidový zbytek obsahující 0 až 5 aminokyselin, výhodně 5 aminokyselin.

K bazickým aminokyselinám ve smyslu předkládaného vynálezu patří aminokyseliny vybrané ze skupiny obsahující lysin, arginin a a homoarginin.

Výhodněji Xad představuje peptidovou sekvenci –Lys–Arg–Arg–Gly–Tyr–Lys–Gly–Gly–His nebo –Leu–LeuArg–Gly–Tyr–Lys–Gly–Gly–His.

V dalším výhodném provedení Xac obsahuje alespoň jednu kyselou aminokyselinu, výhodně právě jednu.

Výhodně Xac představuje peptidovou sekvenci –Asn–Xac′–Xac″–, kde Xac′ představuje peptidový zbytek s 1 aminokyselinou a Xac″ představuje peptidový zbytek s 1 kyselou aminokyselinou.

Kyselé aminokyseliny ve smyslu předkládaného vynálezu jsou aminokyseliny obsahující na postranním řetězci funkční skupinu organické kyseliny, zvláště karboxylové kyseliny, a výhodně jsou vybrané ze skupiny obsahující kyselinou glutamovou (Glu) a asparagovou (Asp).

Výhodně Xac představuje peptidovou sekvenci –Asn–Gly–Glu nebo –Ala–Ala–Glu.

Ve výhodném provedení vynálezu

Xaa představuje peptidovou sekvenci Xaa′–Gly–Xaa″–, kde Xaa′ je skupina NH_2 nebo peptidový zbytek obsahující 1 až 9 aminokyselin, výhodně 1 až 5 aminokyselin, a Xaa″ představuje peptidový zbytek obsahující nejméně 1 aminokyselinu vybranou z aminokyselin Leu, Ile, Val, pro, Ser neo Thr, a/nebo Xab představuje peptidovou sekvenci –Val–Xab′–Asp–, kde Xab′ je peptidový zbytek obsahující 0 až 8 aminokyselin, výhodně 8 aminokyselin a/nebo

Xae představuje peptidovou sekvenci –Gly–Xae′–Asn, kde Xae′ představuje peptidový zbytek obsahující 0 až 5 aminokyselin, výhodně 5 aminokyselin, a/nebo

Xaf představuje jednu z následujících aminokyselin –Trp–, Phe, leu, Ile nebo Val, a/nebo

Xag představuje peptidovou sekvenci –Glu–Xag′, kde Xag′ představuje skupinou OH nebo zbytek sekvence obsahující 1 až 4 aminokyseliny, výhodně 1 aminokyselinu.

Ve výhodném provedení vynálezu představuje Xaa peptidovou sekvenci NH2–Asp–Lys–Leu–Ile-Gly–Ser nebo NH2–Ala–Ala–Ala–Ala–Gly–Ser– a/nebo Xab představuje peptidovou sekvenci –Val–Trp–Gly–Ala–Val–Asn–Tyr–Thr–Ser–Asp– a/nebo Xae představuje peptidovou sekvenci –Gly–Ser–Phe–Ala–Asn–Val–Asn– a/nebo Xaf představuje aminokyselinu –Trp– a/nebo Xag představuje peptidovou sekvenci –Glu–Thr–OH nebo Arg–Thr–OH.

Ve výhodném provedení předkládaného vynálezu je heliomicin peptid kódovaný sekvencí identifikačního čísla 2 (id. č. 2). Stejná sekvence, pokud jde o aminokyseliny 6 až 49 v sekvenci id. č. 1 je popsána jinou kódující sekvencí.

Zbytek na NH_2–konci heliomicinu může být postranslačně modifikován, např. acetylací, a stejně tak může být postranslačně modifikován zbytek na C–konci, např. amidací.

Peptidovou sekvencí obsahující v podstatě peptidovou sekvenci podle vzorce (I) se rozumí nejen sekvence zde definované, ale sekvence obsahující na jednom nebo na druhém konci, nebo a obou, peptidové zbytky, zejména takové zbytky, které jsou nezbytné pro její expresi a směrování v hostitelském organismu. Hostitelským organismem se myslí organismus obsahující alespoň jednu buňku, nebo také rostlinné buňky a také vyšší organismy jako např. rostliny.

Dále se jedná zejména o fúzní peptid „peptid–heliomicin“ ze kterého se může „vystřižením“ pomocí enzymatického systému rostlinné buňky uvolnit heliomicin, jak byl definován v předkládané přihlášce. Fúzní peptid s heliomicinem dále může obsahovat signální peptid nebo tranzitní peptid, které umožňují řídit a směrovat vytvářený heliomicin specifickým způsobem do určité části hostitelského organismu, zejména rostlinné buňky nebo rostliny, např. do cytoplazmy nebo na buněčnou membránu, a nebo v případě rostlin do určitého buněčného kompartmentu nebo určitých pletiv nebo do extracelulárního prostoru.

V jednom provedení vynálezu tranzitní peptid obsahuje signál pro cloroplastovou nebo mitochondriální lokalizaci, čímž je zajištěno štěpení v chloroplastu nebo mitochondrii.

V dalším provedení vynálezu může signální peptid obsahovat N–koncový signál neboli „prepeptid“, případně spojený se signálem zodpovědným za zadržení proteinu v endoplazmatickém retikulu, nebo peptid pro zaměření do vakuoly neboli „propeptid“. Endoplazmatické retikulum je místo, které je v rámci „buněčného mechanismu“ zodpovědné za procesy zrání proteinových produktů, jako je např. odštěpení signálního peptidu.

Tranzitní peptid je buďto jeden, nebo mohou být dva, a v takovém případě jsou odděleny vmezeřenou intermediární sekvencí, takže ve směru transkripce, jedna sekvence kóduje tranzitní peptid rostlinného genu kódujícího enzym s plastidovou lokalizací, pak následuje část zralé sekvence N–konce rostlinného genu kódujícího enzym s plastidovou lokalizací, a pak sekvence kódující druhý tranzitní peptid rostlinného genu kódujícího enzym s plastidovou lokalizací, jak to bylo již popsáno v patentové přihlášce EP 0 508 909.

Vhodným tranzitním peptidem podle vynálezu lze uvést zejména signální peptid genu PR–1α tabáku (popsaný v Cornelissen et al.), který je zde uveden s kódující sekvencí id. č. 2, když je heliomicin produkován rostlinnou buňkou nebo rostlinnou, nebo prekurzor faktoru Matα1, když je heliomicin produkován kvasinkovou buňkou.

Fúzní peptid „MFα1/heliomicin" s pěti aminokyselinovými zbytky propeptidu faktoru MFα1 (Ser–Leu–Asp–Lys–Arg) situovanými na N–konci kódující sekvence podle vynálezu, je zde popsán v sekvenci id. č. 1, aminokyseliny 1 až 49.

Fúzní peptid „signální peptid PR–1α/heliomicin" a kódující sekvence podle vynálezu je zde uveden jako sekvence id č. 3.

Fúzní peptid obsahující signální peptid genu PG1 polygalkturonázy z kukuřice fúzovaný s heliomicinem, tedy" signální peptid PG1/heliomicin" s kódující sekvencí je zde uveden jako sekvence id. č. 18 a 20.

Ve výhodném provedení vynálezu cysteinové zbytky v peptidu podle vzorce (I) vytvářejí alespoň jeden intramolekulární disulfidický můstek, výhodněji tři disulfidické můstky. Ve výhodném provedení vynálezu disulfidické můstky spojují cysteinové zbytky 1 a 4, 2 a 5 a 3 a 6.

Heliomicin je peptid účinný zejména proti houbám a kvasinkám, a tudíž může být využit jako preventivní nebo léčebný prostředek k ochraně různých organismů proti napadení houbami. Tudíž se předkládaný vynález týká také heliomicinu jakožto léčiva. Také se týká použití heliomicinu k ošetřené rostlin proti napadení houbami formou přímé aplikace heliomicinu na tyto rostliny.

Předkládaný vynález se dále týká přípravku, který obsahuje heliomicin a vhodné vehikulum. Vhodné vehikulum je prvotřídní kvality, takže nedegraduje podstatně heliomicin v přípravku ani nezhoršuje jeho baktericidní a fungicidní vlastnosti. Jedná se buďto o kosmetický přípravek, pak je vehikulum kosmeticky přijatelné (vhodné pro aplikaci na kůži nebo případně zuby, nehty či vlasy), nebo o farmaceutický přípravek určený k léčebnému použití, pak je vehikulum farmaceuticky přijatelné pro topické podávání heliomicinu, nebo pro podávání *per os* (ústy) nebo formou injekce. A nebo se jedná o agrochemický přípravek, pak je vehikulum agrochemicky přijatelné vhodné pro aplikaci na rostliny nebo do okolí rostlin, aniž by došlo k degradaci heliomicinu.

Předkládaný vynález se dále týká fragmentu nukleové kyseliny, zejména DNA, přírodní nebo syntetické, kódující heliomicin definovaný výše, včetně fúzního peptidu „peptidheliomicin".

Vynález se také fragmentu, který je syntetizován nebo je izolován z motýla rodu *Heliothis*, nebo odvozeného fragmentu, upraveného tak, aby vedl k expresi heliomicinu v hostitelském organismu nebo umožňoval exprimovat peptid. Fragment nukleové kyseliny může být získán standardními metodami izolace a purifikace nebo může být syntetizován známými metodami užívajícími postupné hybridizace syntetických oligonukleotidů. Tyto postupy jsou odborníkům známy a jsou popsány např. v publikaci Ausubel et al.

Ve smyslu předkládaného vynálezu „fragment nukleové kyseliny" je nukleotidová sekvence typu DNA nebo RNA, výhodně jde o DNA, zejména dvouřetězcového typu.

V jednom provedení vynálezu fragment nukleové kyseliny kódující heliomicin je sekvence DNA uvedena zde jako báze 16 až 147 v sekvenci id. č. 1 nebo sekvence id. č. 2, zejména kódující část této sekvence zahrnující báze 1 až 132, sekvence homologní nebo sekvence komplementární k této sekvenci.

V jiném provedení vynálezu fragment nukleové kyseliny kódující fúzní peptid „peptod–heliomicin" obsahuje sekvenci DNA uvedenou zde jako sekvence id. č. 1 nebo sekvence id. č. 3, zejména její kódující část zahrnující báze 3 až 224, nebo jako sekvence id č. 18, zejména část kódující báze 7 až 205, nebo homologní nebo komplementární sekvenci.

Termínem „homologní" sekvence se podle předkládaného vynálezu rozumí fragment nukleové kyseliny obsahujíc jednu nebo několik modifikací vzhledem k nukleotidové sekvenci popsané zde jako sekvence id. č. 1, 2 a 3, kódující heliomicin nebo fúzní peptid „peptid–heliomicin". Tyto modifikace lze získat v oboru známými metodami mutageneze, kromě toho také výběrem syntetických oligonukleotidů použitých k přípravě uvedené sekvence pomocí hybridizace. Vzhledem k mnoha kombinacím nukleové kyseliny, které kódují expresi téže aminokyseliny, rozdíly v sekvenci id. č. 1, 2 a 3 a odpovídajících homologních sekvencích mohou být důležité, a tím spíše to platí pro fragmenty DNA získané chemickou syntézou. Výhodně je míra homologie s uvedenou referenční sekvencí nejméně 70 %, výhodněji nejméně 80 % a nejvýhodněji alespoň 90 %. Obecně jsou tyto modifikace neutrální, tudíž neovlivňují primární sekvenci heliomicinu nebo výsledného fúzního peptidu.

Předkládaný vynález se dále týká chimérickému genu (nebo expresní kazety) obsahující sekvenci kódující také heterologní regulační prvky v pozicích 5′ nebo 3′, které jsou funkční v hostitelském organismu, zejména v rostlinné buňce nebo rostlině, funkčně (operativně) spojené s kódující sekvencí, přičemž tato kódující sekvence obsahuje alespoň jeden fragment DNA kódující heliomicin nebo fúzní peptid „peptidheliomicin" popsané výše.

Hostitelským organismem je podle vynález míněn organismus jednobuněčný nebo mnohobuněčný, nižší nebo vyšší, do kterého je vložen chimérický gen podle předkládaného vynálezu pro tvorbu heliomicinu. Zejména se jedná např. o bakterie *E. coli,* kvasinky, zvláště rodu *Saccharomyces, Kluyveromyces* nebo *Pichia*, houby rodu *Aspergillus*, bakuloviry, nebo výhodně rostlinné buňky a rostliny.

„Rostlinná buňka" znamená ve smyslu předkládaného vynálezu buňku tvořící rostlinné pletivo, ať už tvoří nediferencovanou tkáň jako je kalus nebo tvoří diferencované tkáně jako embryo, části rostliny, rostlinu nebo semena.

„Rostlina" ve smyslu předkládaného vynálezu znamená celý mnohobuněčný diferencovaný organismus, který je schopný fotosyntézy, je to rostlina jednoděložná nebo dvouděložná, a zvláště se pak jedná o rostliny kulturní určené pro výživu člověka nebo zvířat, kam patří např. kukuřice, pšenice, řepka, sója, rýže, cukrová třtina, řepa, tabák, bavlna a další.

Regulační prvky nezbytné pro expresi fragmentu DNA kódujícího heliomicin, funkční v hostitelském organismu, jsou odborníkovi známy. K těmto prvkům patří zejména promotorové sekvence, aktivátory transkripce, terminační sekvence včetně „start" a „stop" kodonu. Prostředky a metody pro identifikaci a výběr těchto regulačních prvků jsou odborníkovi známy.

Regulační prvky vhodné pro transformaci mikroorganismů jako jsou kvasinky nebo bakterie jsou odborníkům známy, a patří k nim promotorové sekvence, aktivátory transkripce, tranzitní peptidy a terminační sekvence včetně „start" a „stop" kodonu.

Pro řízení exprese v kvasinkách a sekreci peptidu do kultivačního média je fragment DNA kódující heliomicin integrován do kyvadlového vektoru, přičemž tento vektor obsahuje následující prvky:

- markery umožňují selekci transformant, výhodně se užije gen ura–3 pro kvasinky a gen rezistence k ampicilinu pro *E. coli*,
- nukleotidovou sekvenci umožňující replikaci (replikační počátek) plazmidu v kvasinkách, výhodně se užije replikační počátek kvasinkového plazmidu 2μ,
- nukleotidovou sekvenci umožňující replikace (replikační počátek) plazmidu v *E. coli*,
- expresní kazetu, která obsahuje
  1) regulační promotorovou sekvenci, výhodně se užije promotorová sekvence genu, který je přirozeně exprimován v kvasinkách, výhodně promotor genu Mfα1 ze *S. cerevisiae*,
  2) sekvenci kódující signální peptid (nebo prepeptid) ve spojení se zaměřovacím peptidem (nebo propeptidem), přičemž tyto úsek jsou důležité pro správnou sekreci peptidu, a výhodně se užije sekvence kódující pre–pro–peptid prekurzoru faktoru Mfα1,
  3) sekvenci regulující terminaci nebo polyadenylaci, výhodně se užije terminátor fosfoglycerátkinázy (PGK) ze *S. cerevisiae*.

V expresní kazetě se sekvence kódující heliomicin vloží za pre–pro sekvenci a před sekvenci terminátoru PGK.

Tyto prvky byly popsány v mnoha publikacích jako např. Reichhart et al., 1992, Invert. Reprod. Dav. 21, 15-24, a Michaut et al., 1996, FEBS Letters 395, 6–10.

Ve výhodném provedení se kvasinky druhu *S. cerevisiae* transformují expresním plazmidem metodou, která užívá lithiumacetát (Ito et al., 1993, J. Bacteriol. 153, 163–168). Transformované kvasinky se pak selektují na gelových plotnách neobsahujících uracil. Produkce transformovaných kvasinek ve velkém měřítku se provádí v kultuře obsahující kapalné selektivní médium po dobu 24 až 48 hodin.

Transformované mikroorganismy umožňují produkovat heliomicin ve velkém měřítku. Předkládaný vynález se proto také týká způsobu přípravy heliomicinu, který obsahuje kroky, kdy se kultivuje transformovaný mikroorganismus, který obsahuje gen kódující heliomicin definovaný výše, ve vhodném kultivačním médiu a krok, kdy se získaný heliomicin extrahuje a úplně nebo částečně purifikuje.

Ve výhodném provedení vynálezu se při extrakci heliomicinu v kvasinkách tyto kvasinky odstraní centrifugací a supernatant se smíchá s kyselým roztokem jako je např. roztok anorganické nebo organické kyseliny, např. kyseliny chlorovodíkové nebo kyseliny octové. Získaný extrakt se pak centrifuguje při 4000 až 10 000 rpm ve 4 °C po dobu 30 až 60 minut.

Purifikaci heliomicinu předchází ještě fáze frakcionace supernatantu získaného ve fázi extrakce, ve výhodném provedení vynálezu se v průběhu frakcionace se extrakt nanese na reverzní fázi vhodnou pro extrakci na pevné fázi. Vymytí molekul rozpustných ve vodě ze sloupce se provede roztokem kyseliny a eluce hydrofóbních molekul se provede vhodným elučním roztokem. Dobré výsledky se získají užitím trifluoroctové kyseliny pro vymytí kolony a s elučním roztokem obsahujícím zvyšující se množství acetonitrilu v roztoku kyseliny.

Ve výhodném provedení se purifikace heliomicinu provádí ve dvou fázích: pomocí kationtové výměnné HPLC následované HPLC s inverzní fází s elučním roztokem, který je odlišný nebo shodný s předchozí fází, jednotlivé etapy purifikace jsou následovány inhibičním testem houby v kapalném médiu. Výhodně se test provádí s houbou *Neurospora crasa*.

Sekvence heliomicinu produkovaného transformovanými kvasinkami se analyzuje známými metodami sekvencování Edmonovou degradací a hmotovou spektroskopií. Strukturní charakterizace se provádí přímo na peptidovém produktu, na peptidu modifikovaném redukcí/alkylací jakož i na peptidových fragmentech. Peptidová sekvence a molekulová hmotnost se pak porovnají s hodnotami získanými pro nativní heliomicin izolovaný z hemolymfy *H. virescens*. Tyto výsledky umožní porovnat dvě srovnávané molekuly z hlediska primární struktury. Stanovení poloh disulfidických můstků pak ukáže, zda je jejich uspořádání shodné u obou srovnávaných peptidů, tj. nativního peptidu a produktu transformovaného mikroorganismu.

Předkládaný vynález se dále týká zvláště transformace rostlin. Jako regulační promotorovou sekvenci v rostlině je možné užít promotor genu, který je přirozeně exprimován v rostlině, a zejména promotor bakteriálního, virového nebo rostlinného původu, jako je např. gen pro malou podjednotku ribulozobisfosfát–karboxylázy/oxygenázy (RuBisCo), nebo gen rostlinného viru jako je např. virus mozaiky květáku (CAMV, 19S nebo 35S promotor), nebo promotor indukovaný patogenem jako je např. PR–1α z tabáku, který je také výhodný pro použití dle vynálezu. Výhodné je užití regulační promotorové sekvence, která umožňuje konstitutivní expresi kódované sekvence nebo expresi indukovanou po napadení patogenem, jako je např. histonový promotor popsaný v patentové přihlášce EP 0 507 698.

Podle předkládaného vynálezu je také možné užít ve spojení s promotorovou sekvencí další regulační sekvence, které jsou situovány mezi promotorem a kódující sekvencí, jako jsou např. aktivátory transkripce („enhacery", zesilovače), např. aktivátor transkripce z viru mozaiky tabáku (TMV) popsaný v patentové přihlášce WO 87/07644, nebo z viru skvrnitosti tabáku (TEV), který popsali Carrington a Freed.

Jako sekvence řídící terminaci nebo polyadenylaci je možné užít odpovídající sekvence bakteriálního původu, jako např. terminátor *nos* z *Agrobacterium tumefaciens*, nebo také rostlinného původu, jako např. terminátor histonového genu, jaký byl popsán v patentové přihlášce EP 0 633 317.

Chimérický gen podle předkládaného vynálezu je spojen se selekčním markerem vhodným pro hostitelský organismus. Takové selekční markery jsou odborníkovi dobře známy, jedná se především o geny rezistence k antibiotikům a také o geny poskytující rostlinám toleranci k herbicidům.

Předkládaný vynález se také týká klonovacího nebo expresního vektoru pro transformaci hostitelského organismu, který obsahuje alespoň jeden chimérický gen podle vynálezu definovaný výše. Tento vektor obsahuje kromě již zmíněného chimérického genu nejméně jeden replikační počátek. Tento vektor je představován plazmidem, kozmidem, bakteriofágem nebo virem, do kterých byl vložen chimérický gen podle předkládaného vynálezu. Takové transformační vektory vhodné pro transformaci hostitelského organismu jsou v oboru známy a jsou popsány v odborné literatuře.

Pro transformaci rostlinných buněk nebo rostlin jde zejména o virus, který lze využít k transformaci vyvíjejících se rostlin, a který obsahuje také vlastní prvky pro replikaci a expresi. Ve výhodném provedení je transformačním vektorem pro rostlinné buňky nebo rostliny podle vynálezu plazmid.

Dalším předmětem vynálezu je způsob transformace hostitelského organismu, zejména rostlinných buněk, a to tím, že se do nich vloží alespoň jeden fragment nukleové kyseliny nebo chimérický gen, jak byly definovány výše podle vynálezu, přičemž transformace se provede vhodnými prostředky odborníkovi známými, které jsou popsány v odborné literatuře, zejména v publikacích citovaných v literárních odkazech v této přihlášce. Zejména se jedná o transformaci vektorem podle předkládaného vynálezu.

Jednou z řady metod pro transformaci je „bombardování" buněk nebo protoplastů částicemi, na které je navázaná sekvence DNA. Další metoda spočívá v tom, že se jak prostředek k přenosu do rostliny využije Ti plazmid z *Agrobacterium tumefaciens* nebo Ri plazmid z *Agrobacterium rhizogenes*, do kterého se vloží chimérický gen.

Dalšími metodami, které lze užít, je mikroinjekce nebo elektroporace, a také přímá precipitace prostřednictvím PEG.

Odborník zvolí vhodnou metodu v závislosti na povaze hostitelského organismu, zejména rostlinné buňky nebo rostliny.

Dalším předmětem předkládaného vynálezu jsou hostitelské organismy, zvláště rostlinné buňky nebo rostliny, které jsou transformované a obsahují ve svém genomu účinné množství chimérického genu obsahujícího sekvenci kódující heliomicin, jak je definován výše v této přihlášce.

Dalším předmětem předkládaného vynálezu jsou rostliny, které obsahují transformované buňky, zvláště rostliny získané regenerací z transformovaných buněk. Regeneraci lze provést jakýmkoliv vhodným způsobem odborníkovi známým, který závisí na druhu rostliny, např. způsobem popsaným v odborné literatuře uvedené v odkazech k této přihlášce.

Postupy transformace rostlinných buněk a regenerace rostlin byly popsány např. v následujících patentových dokumentech: US 4 459 355, US 4 536 475, US 5 464 763, US 5 177 010, US 5 187 073, EP 267 159, EP 604 662, EP 672 752, US 4 945 050, US 5 036 006, US 5 100 792, US 5 371 014, US 5 478 744, US 5 179 022, US 5 565 346, US 5 484 956, US 5 538 877, US 5 554 798, US 5 489 520, US 5 510 318, US 5 204 263, US 5 405 765, EP 442 174, EP 486 233, EP 486 234, EP 539 563, EP 674 725, WO 91/02071 a WO 95/06128.

Dále jsou předmětem předkládaného vynálezu také transformované rostliny získané kultivací a/nebo křížením regenerovaných rostlin podle vynálezu, a taktéž semena transformovaných rostlin.

Transformované rostliny podle předkládaného vynálezu jsou rezistentní k některým chorobám, zvláště k některým chorobám způsobeným houbami nebo bakteriemi. Rezistence rostlin proti těmto chorobám je vytvořena tímto způsobem, že je do rostlin integrována sekvence DNA kódující heliomicin podle vynálezu, přičemž heliomicin je účinný proti houbovým chorobám, které způsobují houby rodu *Cercospora*, zejména *cercospora beticola*, rodu *Cladosporium*, zejména *Cladosporium herbarum*, rodu *Fusarium*, zejména *Fusarium culmorum* nebo *fusarium graminearum*, a *Phytophthora*, zejména *Phytophthora cinnamoni*.

Ve výhodném provedení vynálezu je chimérický gen spojen s alespoň jedním selekčním markerem, kterým může být jeden nebo několik genů tolerance k herbicidům.

Sekvence DNA kódující heliomicin může být také spojena s takovým markerem pro selekci transformovaných rostlin a ještě s dalšími sekvencemi kódujícím jiné požadované peptidy nebo proteiny, např. s geny tolerance k herbicidům.

Takové geny tolerance k herbicidům jsou odborníkovi známy a byly popsány např. v patentových přihláškách EP 115 673, WO 87/04181, EP 337 899, WO 96/38567 nebo WO 97/04103.

Samozřejmě také transformované buňky a rostliny podle předkládaného vynálezu mohou obsahovat kromě sekvence kódující heliomicin další heterologní sekvence kódující požadované proteiny jako např. jiné peptidy, které poskytují rostlinám rezistenci k dalším nemocem bakteriálního nebo houbového původu a/nebo další sekvence kódující proteiny zajišťující toleranci k herbicidům a/nebo další sekvence kódující proteiny zajišťující toleranci k hmyzím škůdcům, jako je např. protein *Bt*..

Další sekvence, které se mohou vložit prostřednictvím vektoru obsahujícího chimérický gen podle vynálezu, jsou takové sekvence, které obsahují první sekvenci kódující heliomicin a alespoň jednu další sekvenci kódující další požadovaný peptid nebo protein.

Je také možné vložit nejméně jeden další vektor obsahují alespoň jeden další sekvenci, a to způsobem v oboru známým, jak bylo již popsáno.

Rostliny podle vynálezu je také možné získat křížením rodičovských rostlin, kdy jedna z rodičovských rostlin nese gen podle vynálezu kódující heliomicin a druhá z rodičovských rostlin nese gen kódující alespoň jeden další požadovaný peptid nebo protein.

K sekvencím kódujícím další peptidy s protihoubovým účinkem patří např. sekvence kódující drosomicin, která byla popsána v patentu FR 2 725 992, v publikaci Fehlbaum et al. 1994 a v nepublikované patentové přihlášce FR 97 09115 podané 24. července 1997 nebo sekvence kódující androctonin popsaná v patentu FR 2 745 004 a v nepublikované patentové přihlášce FR 97 10362 podané 20. srpna 1997.

Předkládaný vynález se nakonec také týká způsobu pěstování rostlin transformovaných podle vynálezu, který spočívá v tom, že semena těchto transformovaných rostlin se vysejí na povrch pole vhodného pro pěstování takových rostlin, a na povrch tohoto pole se pak aplikuje agrochemický prostředek, aniž by podstatně ovlivnil tato semena nebo transformované rostliny, pak jakmile dosáhnou zralosti se pěstované rostliny sklidí a případně se oddělí semena ze sklizených rostlin.

Agrochemický prostředek se ve smyslu vynálezu rozumí agrochemický prostředek obsahující alespoň jednu účinnou látku vykazující jeden z následujících účinků: herbicidní, fungicidní, baktericidní virocidní a insekticidní.

Ve výhodném provedení způsobu pěstování podle vynálezu agrochemický prostředek obsahuje alespoň jednu účinnou látku s fungicidní a/nebo baktericidní aktivitou, výhodněji s aktivitou doplňující aktivitu heliomicinu tvořeného v rostlinách transformovaných podle vynálezu.

Produktem s aktivitou doplňující aktivitu heliomicinu se podle předkládaného vynálezu míní produkt vykazující řadu doplňujících aktivit, jako je např. produkt účinně působící proti napadení škůdci (houbami, bakteriemi, viry), necitlivými k heliomicinu, nebo produkt, jehož spektrum účinnosti se plně nebo částečně překrývá s heliomicinem, a jehož aplikační dávka se podstatně sníží díky přítomnosti heliomicinu tvořeného transformovanými rostlinami.

Dále uvedené příklady slouží k ilustraci vynálezu, aniž by ho jakkoliv omezovaly.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Izolace a charakterizace heliomicinu získaného z hemolymfy imunizovaných larev motýla *H. virescens*

1.1 Izolace

1–1. Indukce biosyntézy látky s protihoubovým účinkem v hemolymfě *H. virescens*

Zralé larvy 5. stádia motýla *H. virescens* byly imunizovány pomocí injekční jehly (velikost 30) předtím ponořené do peletu Gram–pozitivních bakterií (*M. luteus*) a Gram–negativních bakterií (*E. coli* 1106) získaných z kultur pěstovaných v médiu Luria–Bertani po 12 hodin ve 37 °C. Po infekci byly larvy umístěny jednotlivě ve zkumavce obsahující agarové živné médium na 24 hodin při 20 až 23 °C. Před odběrem hemolymfy byly larvy ochlazeny na ledu.

1–2. Příprava plazmy

Hemolymfa (přibližně 30 µl z jedné larvy) byla odebírána naříznutím břišního výběžku a jímáním do 1,5ml polypropylénové mikrocentirfuganční zkumavky na ledu, která obsahovala aprotinin jakožto inhibitor proteáz (20 µg/ml výsledná koncentrace) a fenylthiomočovinu jakožto inhibitor melanizace (výsledná koncentrace 20 µM). Hemolymfa (2 ml) takto odebraná z imunizovaných larev byla centrifugována při 14000 g po 1 minutu ve 4 °C, aby se odstranily hemocyty. Hemolymfa zbavená krevních buněk byla uchována při –20 °C až do použití.

1–3. Acidifkace plazmy

Po rychlém rozmražené byla plazma z *H. virescens* okyselena na pH 3 užitím 1% roztoku kyseliny trifluoroctové. Kyselá extrakce peptidu probíhala 30 minut za třepání na ledové lázni. Získaný extrakt byl centrifugován 30 minut při 10 000 g ve 4 °C.

1–3. Purifikace peptidů

a) Prepurifikace extrakcí pevné fáze

Množství extraktu odpovídající 2 ml hemolymfy bylo naneseno na nosič s pevnou inverzní fází, jaký je komerčně dostupný ve formě předem naplněných kolonek (např. Sep–Pak(tm) C18, Waters Associates), a ekvilibrováno s vodným roztokem kyseliny (0,05% TFA). hydrofilní molekuly byl eliminovány jednoduchým propláchnutím kyselým vodným roztokem. Eluce peptidu byla proveden 40% roztokem acetonitrilu v 0,05% TFA. Frakce eluovaná 40% roztokem acetonitrilu byla vysušena pod vakuem, a aby se před první fází putifikace odstranily stopy acetonitrilu a TFA, byla rozpuštěna ve sterilní ultračisté vodě.

b) Purifikace pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) na koloně s inverzní fází

První fáze: Frakce obsahující peptid byla analyzována chromatografií s inverzní fází na semipreparativní koloně Aquapore RP–300 C8 (Brownlee(tm), 220 x 70 mm, 300 Å), eluce byla provedena lineárním gradientem acetonitrilu od 2 do 60% v 0,05% TFA po dobu 120 minut s konstantním průtokem 1,5 ml/min. Frakce byly sbírány ručně podle změn absorbance ve 225 až 254 nm. Odebrané frakce byly vysušeny pod vakuem a rekonstituovány v ultračisté vodě a pak analyzovány na fungicidní účinek testem popsaným v další části.

Druhá fáze: Frakce s protihoubovým účinkem odpovídající peptidu byla analyzována pomocí analytické kolony s inverzní fází (Brownlee(tm), 220 x 4,6 mm, 300 Å) užitím lineární dvoufázového gradientu acetonitrilu 2 až 22 % v 0,05% TFA po 10 minut a 22 až 32 % po dalších 50 minut se stálým průtokem 0,8 ml/min. Frakce byly sbírány ručně podle změn absorbance ve 225 až 254 nm. Odebrané frakce byly vysušeny pod vakuem a rekonstituovány v ultračisté vodě a pak analyzovány na fungicidní účinek.

Třetí fáze: Frakce s protihoubovým účinkem obsahující peptid byla purifikována do homogenity pomocí kolony s inverzní fází Narrowbore Delta–Pak(tm) HPlC18 (Waters Associates, 150 x 2,2 mm, 300 Å) užitím lineární dvoufázového gradientu acetonitrilu 2 až 24 % v 0,05% TFA po 10 minut a 24 až 44 % po dalších 100 minut se stálým průtokem 0,25 ml/min při kontrolované teplotě 30 °C. Frakce byly sbírány ručně podle změn absorbance ve 225 nm. Odebrané frakce byly

vysušeny pod vakuem a rekonstituovány ve vodě čištěné ultrafiltrací a pak analyzovány na fungicidní účinek.

1.2 Strukturní charakteristiky peptidu

2–1. Ověření čistoty kapilární zonální elektroforézou

Čistota peptidu s protihoubovým účinkem byla ověřena užitím zařízení pro kapilární zonální elektroforézu 270–HT (PE Applied Biosystems, division Perkin Elmer). 1 nl 50 μM roztoku purifikovaného peptidu byl injekční jednou vstříknut do skleněné kapiláry (72 cm x 50 μm) a analyzován v 20μM citrátovém pufru s pH 2,5. Elektroforéza probíhala 20 minut při 20 kV ve 30 °C. Migrace byla registrována po 220 nm.

2–2. Stanovení počtu cysteinových zbytků: redukce a S–pyridyletylace

Počet cysteinových zbytků byl stanoven na nativní peptidu redukcí a S–pyridyletylací. 100 pmol nativního peptidu se redukovalo ve 40 μl pufru 0,5M Tris/Hcl, pH 7,5 obsahujícího 2 mM EDTA a 6M guanidiniumchlorid, s přídavkem 2 μl 2,2 M dithiotreitolu, reakční směs byla umístěna do dusíkové atmosféry. Po 60 minutové inkubaci ve tmě, 2 μl čerstvě destilovaného 4–vinylpyridinu bylo přidáno do reakce a ta byla dále inkubována 10 minut ve 45 °C ve tmě v dusíkové atmosféře. Z reakční směsi byl chromatografií a inverzní fází separován pyridyletylpeptid užitím lineárního gradientu acetonitrilu a 0,05% TFA.

2–3. Stanovení hmotnosti nativní hopeptidu, S–pyridyletylpeptidu a proteiolytických fragmentů užitím hmotové spektrometrii MALDI–TOF („matrix assisted laser desorption ionization–time of light“)

Měření hmotnosti bylo provedeno na hmotovém spektrometru MALDI–TOF (Bruker Biflex, Brémy, Německo) v lineárním pozitivním modu. Hmotové spektra byla kalibrovány pomocí směsi standardů peptidů v rozmezí 2199,5 Da až 4890,5 Da. Analyzované produkty byly vloženy na slabou vrstvu krystalů kyseliny α–kyano–4–hydroxyskořicové získanou rychlým odpařením nasyceného acetonového roztoku. Po osušení ve vakuu byly vzorky opláchnuty kapkou 0,1% kyseliny trifluoroctové před tím, než byly vloženy do spektrometru.

2–4. Sekvencování peptidu Edmanovou degradací

Automatické sekvencování Edmanovou degradací nativního peptidu, S–pyridyletylpeptidu a různých fragmentů, získaných proteolytickým štěpením a detekce fenylthiohydantoinových derivátů byly prováděny pomocí automatické sekvencovacího zařízení ABI 473 A (PE Applied Biosystems, Division Perkin Elmer).

2–5. Proteolytické štěpení

Potvrzení peptidové sekvence C–koncového úseku

200 pmol redukovaného peptidu a S–pyridyletyl byly inkubovány v přítomnosti 5 pmol endoproteinázy Lys–C (proteáza I z *Acromobacter*, štěpí specificky lysinové zbytky v blízkosti C–konce, Takara, Otsu) v reakční směsi podle doporučení výrobce (10mM Tris-Cl, pH 9, 0,0% Tween 20). Po zastavení reakce 1% TFA byly peptidové fragmenty separovány pomocí HPLC s inverzní fází na koloně Narrowbore Delta–Pak$^{(tm)}$ HPIC18 (Waters Associates, 150 x 2 mm, 300 Å) užitím lineární gradientu acetonitrilu 2 až 60 % v 0,05% TFA po 80 minut se stálým průtokem 0,2 ml/min při konstantní teplotě 37 °C. Získané fragmenty byly analyzovány pomocí hmotového spektrometru MALDI–TOF a peptidy odpovídající C–konci byly sekvencovány Edmanovou degradací.

Stanovení uspořádaní disulfidických můstků proteolýzou thermolysinem

8 μg nativního peptidu bylo inkubováno 1 hodinu se 4 μg thermolysinu (Boehringer Mannheim, thermolysin/peptid = 1/2 hmotn.) ve 37 °C v pufru 0,1M MES (N–etylmorfolin) s pH 7,0 a 2mM $CaCl_2$. Reakce byla zastavena přídavkem kyseliny mravenčí a reakční produkt byl bezprostředně separován pomocí HPLC s inverzní fází na koloně Narrowbore Delta–Pak$^{(tm)}$ HPIC18 (Waters Associates, 150 x 2,2 mm) užitím lineární gradientu acetonitrilu 2 až 50 % v 0,05% FA po 100 minut se stálým průtokem 0,2 ml/min při konstantní teplotě 30 °C s předcházející isokratickou fází 2 % acetonitrilu po 10 minut. Získané fragmenty byly analyzovány pomocí hmotového spektrometru MALDI–TOF a peptidy odpovídající C–konci byly sekvencovány Edmanovou degradací.

Příklad 2

Exprese heliomicinu v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*

V příkladu byly užity standardní postupy odborníkovi známé. Detailní protokoly lze najít např. v publikaci Ausubel et al.

2–1. Konstrukce syntetické genu

Syntéza byla provedena pomocí 6 syntetických oligonukleotidů kódujících 44 aminokyselin heliomicinu, kterým předchází 5 aminokyselin C–konce prepropeptidu faktoru a1 (Mfa1) kvasinek. Oligonukleotidy uvedené na obr. 1 byly vybrány tak, aby obsahovaly kodony přednostně užívané v *S. cerevisiae*.

Syntéza byla provedena v několika fázích:

- oligonukleotidy 2 až 5 byly fosforylovány na 5′ koncích působením polynukleotidylkinázy (New England Biolabs),
- oligonukleotidy 1 až 6 byly smíchány, zahřáty na 100 °C a hybridizovány postupným snižováním teploty během 3 hodin na 25 °C,
- hybridizované oligonukleotidy pak byly spojeny působením ligázy bakteriofága T4 (New England Biolabs) 15 hodin v 15 °C,
- úsek DNA vzniklý hybridizací oligonukleotidů uvedených na obr. 1, opatřený restrikčním místy *HindIII* a *BglII* byl vložen do plazmidu pBluescript SK+ (Stratagene) naštěpeného enzymy *HindIII* a *BamHI* (*BglII* a *BamHI* jsou kompatibilní). Ligační směs pak byla užita pro transformaci kompetentních buněk *E. coli* DH5α (Stratagene). Několik klonů bylo analyzováno sekvencováním. Klon obsahující požadovanou sekvenci byl nazván pSEA1.

2–2. Konstrukce vektoru pSEA2, který umožňuje sekreci syntetického heliomicinu

Fragment DNA *HindIII–SalI* z vektoru pSEA1 obsahující sekvenci kódující heliomicin jakož i fragment *SphI–HindIII* vektoru MJEJM132 (Michaut et al., 1985, FEBS Letters 395: 6–10) byl vložen do míst SphI a sall plazmidu pTG4812 (Michaut et al., 1985, FEBS Letters 395: 6–10). Fragment *SphI–HindIII* vektoru M13JM132 obsahuje promotorovou sekvenci genu MFα1 z kvasinek a také sekvenci kódující pre–pro úsek faktoru MFα1. Ve výsledném plazmidu pSEA2 je syntetický gen pro heliomicin mezi pre–pro sekvenci faktoru MFα1 a terminátor transkripce, takže tento konstrukt zajišťuje maturaci a sekreci heliomicinu.

2–3. Transformace kmenu *S. cerevisiae* DNA plazmidu pSEA2 a analýza transformant

Kvasinkový kmen *S. cerevisiae* TGY 48.1 (MATa, ura3–D5, his, pra1, prb1, prc1, cps1, Reichhart et al., 1992, Invert. Reprod. Dev. 21: 15–24) byl transformován plazmidem pSEA2. Transformanty byl selektovány ve 29 °C v selektivním médiu YNBG (0,67% kvasinková dusíkatá báze, 2% glukóza) doplněném 0,5% kaseinovými aminokyselinami, které neobsahovalo uracil. Po transformaci bylo několik klonů selektovaných na zrak ura+ pěstováno 48 hodin v

50 ml selektivního média 48 hodin ve 29 °C. Po centrifugaci (400 g, 30 minut, 4 °C) byla supernatant okyselen na kyselinou octovou na pH 3,5 a pak nanesen na kolonku Sep–Pak(tm) C16 (Waters Associates) ekvilibrovanou 0,05% roztokem TFA ve vodě. Proteiny zachycené na koloně byly eluovány 0,05% TFA se zvyšujícím se podílem acetonitrilu.

40% frakce obsahující protihoubovou aktivitu byla analyzována pomocí HPLC s analytickou kolonou s inverzní fází Aquapore RP–300 C8 (Brownlee(tm), 220 x 4,6 mm, 300 Å), eluce byla provedena lineárním gradientem acetonitrilu od 2 do 40 % v 0,05% TFA po dobu 80 minut s kontrolním průtokem 0,8 ml/min. Frakce byly sbírány ručně podle změn absorbance ve 225 a 254 nm. Odebrané frakce byly vysušeny pod vakuem a rekonstituovány v ultračisté vodě a pak analyzovány na fungicidní účinek testem popsaným v příkladu 3. Strukturní charakteristiky peptidu byly určeny jak je popsáno v příkladu 1.2.

2–4. Produkce rekombinantního heliomicinu v semi–preparativním měřítku

Transformované kvasinkové klony exprimující heliomicin byly kultivovány 24 hodin ve 29 °C ve 100 ml selektivního média. Tato předkultura byla použita pro inokulaci 4 l selektivního média, které pak bylo kultivováno 48 hodin ve 29 °C. Kvasinky pak byly eliminovány centrifugací (4000 g, 30 minut, 4 °C). Supernatant byl okyselen na kyselinou octovou na pH 3,5, znovu centrifugován (4000 g, 30 minut, 4 °C) a pak nanesen na preparativní kolonku s inverzní fází C18 (Waters Associates, 125 Å, 6 g fáze na 500 ml supernatantu) ekvilibrovanou 0,05% roztokem TFA ve vodě. hybrofilní molekuly byly odstraněny propláchnutím vodným roztokem kyseliny a pak 15% roztokem acetonitrilu v 0,05% TFA. Peptid zachycený na koloně byl eluován 40% roztokem acetonitrilu v 0,05% TFA, pak byl lyofilizován a rozpuštěn v ultračisté vodě, než byla zahájena první fáze purifikace.

První fáze purifikace pomocí HPLC: frakce předběžně purifikovaná obsahující heliomicin byla rozpuštěna v 25mM roztoku octanu amonného, pH 3,4. Tento vzorek byl injekcí nanesena na preparativní kationtovou výměnnou kolonu Aquapore Cation Exchange (Brownlee(tm), 250 x 10 mm), eluce byla provedena lineárním gradientem NaCl od 0 do 100 % v 25mM roztoku octanu amonného, pH 3,4, po dobu 90 minut s konstantním průtokem 2 ml/min. Frakce byly odebrány a vysušeny pod vakuem a rekonstituovány v ultračisté vodě a pak analyzovány na fungicidní účinek testem popsaným v další části.

Druhá fáze purifikace pomocí NPLC: Heliomicin byl purifikován do homogenity pomocí kolony semipreparativní s inverzní fází (Brownlee(tm), 220 x 7 mm, 300 Å) užitím lineární gradientu acetonitrilu 2 až 40 % v 0,05% TFA po dobu 80 minut se stálým průtokem 2 ml/min.

Příklad 3

Test *in vitro* aktivity: měření protihoubové aktivity mikrospektrofotometrií

Tuto metodu lze použít k důkazu molekul s protihoubovým účinkem, v průběhu jednotlivých etap purifikace, pro stanovení spektra aktivity peptidu a pro stanovení minimální inhibující koncentrace (CMI) peptidu, při které je aktivní. CMI je vyjádřena jako interval koncentrací [a] – [b], kde [a] je minimální koncentrace, kdy se pozoruje počátek zvyšování účinku a [b] je koncentrace, od které už se žádné zvyšování nepozoruje. Příklady specifické aktivity heliomicinu podle vynálezu vůči vláknitým houbám a kvasinkám jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2.

3.1. Test aktivity proti vláknitým houbám

Protihoubová aktivita byla detekována testem inhibice růstu v tekutém médiu. Spóry testovaných huby byl umístěny do suspenze v kultivačním médiu typu „brambory–glukóza“. Výhodně bylo užito k přípravě média 12 g živného média „Potato Dextrose Broth“ firmy Difco na 1 l demineralizované vody. K médiu byla přidána dvě antibiotika: tetracyklin (výsledná koncentrace

10 μg/ml) a cefotaxim (výsledná koncentrace 100 μg/ml). 10 μl frakce se naneslo do jamky na mikrodestičce s 90 μl média obsahujícího spóry hub (ve výsledné koncentraci 10^4 spór/ml). Inkubace probíhala ve zvlhčované komůrce po 48 hodin při 30 °C. Růst hub byl pozorován světelným mikroskopem po 24 hodinách a kvantifikována po 48 hodinách měřením absorbance v 600 nm pomocí spektrofotometrického čtecího zařízení pro mikrotitrační destičky.

Testované vláknité houby byly následující: *Aspergillus fumigatus* (dar Dr. H. Koeniga, Veřejná nemocnic Strasbourg), *Nectria haemotoccoa, Fusarium colmorum, Trichoderma viridae* (sbírka hub Katolické University v Leavenu, Bergie), *Neurospora crassa, Fusarium oxysporum* (sbírka hub Societe Clause, Paříž).

Výsledky testování účinku heliomicinu proti uvedeným vláknitým houbám jsou shrnuty v následující tabulce 1.

Tabulka 1

Aktivita heliomicinu proti vláknitým houbám

Houba	CMI heliomicinu (μM)
Neurospora crassa	0,1 - 0,2
Fusarium culmorum	0,2 - 0,4
Fusarium oxysporum	1,5 - 3
Nectria haematococca	0,4 - 0,8
Trichoderma viridae	1,5 - 3
Aspergillus fumigatus	6 - 12,5

3–2. Test aktivity proti kvasinkám

Různé kmeny kvasinek byly inkubovány v kultivačním médiu typu „Sabourand" po 24 hodinách ve 30 °C při pomalém třepání. Testované vzorky (10 μl) se nanesly do jamky namikrodestičce s 90 μl média obsahujícího kvasinky, naředěné tak, že výsledná optická denzita DO_{600} = 0,001. Růst kvasinek byl kvantifikován měřením absorbance v 600 nm pomocí spektrofotometrického čtecího zařízení pro mikrotitrační destičky.

Testované kmeny kvasinek byly následující: *Candida albicans, C. glabrata, C. tropicalis, C. krusei, C. inconspicua, Cryptococcus neoformans, Cryp. albidus, Sachharomyces cerevisiae* (dar Dr. H. Koeniga, Veřejná nemocnice Strasbourg).

Výsledky testování účinku heliomicinu proti uvedeným kvasinkám jsou shrnuty v následující tabulce 2.

Tabulka 2

Aktivita heliomicinu proti kvasinkám

Kvasinka	CMI heliomicinu (μM)
Candida albicans	2,5 - 5
Candida tropicalis	2,5 - 5
Candida krusei	10 - 20
Candida inconspicua	5 - 10
Cryptococcus neoformans	2,5 - 5
Cryptococcus albidus	5 - 10

Tyto výsledky dokazují vynikající protihoubovou aktivitu peptidu podle předkládaného vynálezu.

Příklad 4

Příprava transformované rostliny obsahující gen kódující heliomicin

Tento příklad popisuje přípravu sekvence kódující heliomicin, která je exprimována v rostlinné buňce, chimérického genu, integračního vektoru a transformovaných rostlin. Připojené obrázky 2 až 6 popisují schematicky strukturu některých plazmidů připravených kvůli konstrukci chimérického genu. Na obrázcích jsou kurzívou vyznačena restrikční místa.

Všechny použité metody jsou standardní metodou odborníkovi známé a podrobnější protokoly lze najít v publikaci Ausubel et al.

4–1. Konstrukce chimérického genu pro transformaci rostlin

pRPA–MD–P: Příprava plazmidu obsahujícího signálu peptid genu PR–1a z tabáku

Dva syntetické oligonukleotidy s komplementárními sekvencemi Oligo 7 a Oligo 8, popsanými dále, byly hybridizovány tak, že byly 5 minut v 65 °C a pak pomalým snižováním teploty na 30 °C během 30 minut.

Oligo 7: 5' GCGTCGACGC GATGGGTTTC GTGCTTTTCT CTCAGCTTCC
ATCTTTCCTT CTTGTGTCTA CTCTTCTTCT TTTCC 3'

Oligo 8: 5' TCGCCGGCAC GGCAAGAGTA AGAGATCACA AGGAAAAGAA
GAAGAGTAGA CACAAGAAGG AAAGATGGAA GC 3'

Po hybridizaci Oligo 7 s Oligo 8 sloužil jednovláknový zbytek NDA jako matrice pro Klenowův fragment DNA polymerázy 1 z *E. coli* (za standardních podmínek doporučených výrobcem (New England Biolabs)) pro vytvoření dvojitého vlákna na 3'–koncích oligonukleotidů. Získaný dvouvláknový oligonukleotid byl pak naštěpen restrikčními enzymy *SacII* a *NaeI* a klonován do plazmidu pBS II SK(–) (Stratagene), který byl předtím naštěpen stejnými restrikčními enzymy. Byl tak získán klon obsahující kódující úsek signálního peptidu genu PR–1α z tabáku (sekvence id. č. 4).

pRPA–PS–PR1a–helio: příprava sekvence kódující heliomicin fúzovaný se signálním peptidem PR-1α bez nepřepisovaného úseku 3'–konce

Dva syntetické oligonukleotidy s komplementárními sekvencemi Oligo9 a Oligo 10 byly hybridizovány ve stejných podmínkách jak byly uvedeny výše pro pRPA–MD–P.

Oligo 9: 5' GATAAGCTTA TCGGTTCCTG CGTGTGGGGT GCTGTGAACT
ACACTTCCGA TTGCAACGGT GAGTGCAAGA GGAGGGGTTA 3'

Oligo 10: 5' CCGGATCCGT CGACACGTTC GCCTCGCCGA GCTCTCAAGT
CTCGCACCAG CAGTTCACGT TAGCGAAGGA ACCGCAGTGA
CCACCCTTGT AACCCCTCCT CTTGCACTC 3'

Po hybridizaci Oligo 9 s Oligo 10 sloužil jednovláknový zbytek DNA jako matrice pro Klenowův fragment DNA polymerázy 1 z *E. coli* (ve standardních podmínkách doporučených výrobcem (New England Biolabs)) pro vytvoření dvojitého vlákna na 3'–koncích oligonukleotidů. Získaný dvouvláknový oligonukleotid obsahující část kódující heliomicin (sekvence id. č. 2) byl pak přímo klonován do plazmidu pRPA–MD–P, který byl předtím naštěpen restrikčním enzymem *NaeI*. Správnost orientace v získaném klonu byla ověřena sekvencováním. Byl tak získán klon obsahující úsek kódující fúzní protein PR–1a–heliomicin ležící mezi restrikčními místy *Nco*I na N–konci a místy *SacI*, *SacII* a *BamHI* na C–konci (sekvence id č. 3).

pRPA–RD–239: Konstrukce sexpresního vektoru pro transformaci rostlin, který obsahuje sekvenci kódující fúzní protein P1–1a–heliomicin

Plazmid pRTL–2GUS odvozený z plazmidu pUC–19 poskytl laskavě Dr. Jim Carrington (Texas A&M University, nebyl dosud publikován). Tento plazmid, jehož struktura je schematicky znázorněna na obr. 2, obsahuje dvojitý 35S CaMV promotor izolovaný z viru mozaiky květáku (promotor CaMV 2 x 35S, Odell et al., 1985), který řídí expresi RNA obsahující netranslatovanou sekvenci 5'–konce viru skvrnitosti tabáku (TEV 5' UTR, Carrington a Freed, 1990), gen pro β–glukuronidázu z *E. coli* (GUS, Jefferson et al., 1987), po kterých následuje místo polydenylace RNA z 35S CaMV (CaMV polyA, Odell et al., 1985).

Plazmid pRTL2–2GUS byl štěpen restrikčními enzymy *NcoI* a *BamHI* a takto vzniklý velký fragment byl purifikován. Plazmid pRPA–PS–PR1a–than byl štěpen také restrikčními enzymy *Nco*I a *BamHI* a vzniklý malý fragment DNA obsahující úsek kódující fúzní protein PR1a–heliomicin byl pak purifikován. Oba purifikované fragmenty DNA byly spojeny do expresní kazety pro transformaci rostlin, které pak syntetizují fúzní protein PR1a–heliomicin. Struktura této expresní kazety je schematicky znázorněna na obr. 3. „PR1a–heliomicin" představuje úsek kódující fúzní protein PR1a–heliomicin z pRPA–RD–239. Heliomici je tedy přenášen do mezi buněčných prostorů v rostlině v důsledku působení signálního peptidu PR1α.

pRPA–RD–195: Konstrukce plazmidu obsahující modifikované vícečetné klonovací místo

Plazmid pRPA–RD–195 je plazmid odvozený z plazmidu pUC–19, který obsahuje modifikované vícečetné klonovací místo. Komplementární syntetické oligonukleotidy Oligo 11 a Oligo 12 uvedené dále byly hybridizovány a vytvořeny dvouvláknovou molekulu stejně jak bylo popsáno pro přípravu pRPA–MD–P.

Oligo 11: 5' AGGGCCCCCT AGGGTTTAAA CGGCCAGTCA GGCCGAATTC
GAGCTCGGTA CCCGGGGATC CTCTAGAGTC GACCTGCAGG
CATGC 3'

Oligo 12: 5' CCCTGAACCA GGCTCGAGGG CGCGCCTTAA TTAAAAGCTT
GCATGCCTGC AGGTCGACTC TAGAGG 3'

Získaný dvouvláknový oligonukleotid byl vložen do pUC–19, který byl předtím naštěpen restrikčními enzymy *EcoRI* a *HindIII* a pak byl užit k doplnění Klenowův fragment DNA polymerázy 1 z *E. coli*. Získaný vektor obsahoval vícečetné klonovací místo umožňující vložení expresní kazety z plazmidového vektoru z *Agrobacterium tumefaciens*. Struktura vícečetného klonovacího místa je schematicky znázorněna na obr. 4.

pRPA–RD–240: Vložení expresní kazety pro PR1α–heliomicin z pRPA–RD–239 do pRPA–RD–195

Plazmid pRPA–RD–23 byl naštěpen restrikčním enzymem *PstII* a fragment DNA obsahující expresní kazetu pro PR1a–heliomicin byl purifikován. Purifikovaný fragment byl vložen do plazmidu pRPA–RD–195, který byl předtím naštěpen restrikčním enzymem *PstII* a defosforylován telecí intestinální fosfatázou.

pRPA–RD–174: Plazmid odvozený z pRPA–BL–150A (EP 0 508 909) obsahující gen tolerance k bromoxynilu z pRPA–BL–237 (EP 0 508 909)

Gen tolerance k bromoxynilu byl izolován z pRPA–BL–237 pomocí genové amplifikace polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Získaný fragment s „tupými" konci byl klonován do *EcoRI* místa plazmidu pRPA–RD–150A, které bylo zarovnané působení Klenowova fragmentu polymerázy za standardních podmínek. Byl tak získán vektor vhodný při *Agrobacterium tumefaciens*, který obsahuje gen tolerance k bromoxynilu v blízkosti své pravé hranice a gen tolerance ke kanamycinu v blízkosti levé hranice a vícečetné klonovací místo ležící mezi těmito geny.

Schéma struktura pRPA–RD–174 je uvedeno na obr. 5. Na tomto obrázku „nos" označuje polyadenylační signál z genu pro nopalinsyntázu z *Agrobacterium tumefaciens* (Bevan et al., 1983). „NOS pro" označuje promotor z genu pro nopalinsyntázu z *Agrobacterium tumefaciens* (Bevan et al., 1983), „NPTII" představuje gen pro neomycinfosfotransferázu z transpozonu Tn5 z *E. coli* (Rothstein et al., 1981), „35S pro" označuje promotor 35S izolovaný z viru mozaiky květáku (Odell et al., 1985), „BRX" představuje gen pro nitrilázu izolovaný z *K. ozaenae* (Stalker et al., 1988) a „RB" a „LB" označují pravou a levou hranici sekvenci Ti plazmid z *Agrobacterium tumefaciens*.

pRPA–RD–184: Přidání nového jedinečného restrikčního místa do pRPA–RD–174

Komplementární syntetické oligonukleotidy Oligo 13 a Oligo 14, uvedené dále, byly hybridizovány a vytvořily dvouvláknovou molekulu stejně jak bylo popsáno pro plazmid pRPA–MD–P.

Oligo 13: 5' CCGGCCAGTC AGGCCACACT TAATTAAGTT TAAACGCGGC
CCCGGCGCGC CTAGGTGTGT GCTCGAGGGC CCAACCTCAG
TACCTGGTTC AGG 3'

Oligo 14: 5' CCGGCCTGAA CCAGGTACTG AGGTTGGGCC CTCGAGCACA
CACCTAGGCG CGCCGGGGCC GCGTTTAAAC TTAATTAAGT
GTGGCCTGAC TGG 3'

Dvouvláknový oligonukleotidový hybrid (95 párů bází) byl purifikován po separaci na agarózovém gelu (3% Nusieve agaróza, FMC). Plazmid pRPA–RD–174 byl štěpen restrikčním enzymem *XmaI* a vzniklý velký fragment DNA byl purifikován. Oba izolované fragmenty pak byly spojeny.

Získaný plazmid odvozený z plazmidu pRPA–RD-174 obsahoval další restrikční místo mezi genem tolerance k bromoxynilu a selekčním markerem kanamycinové rezistence.

Schematické znázornění struktury plazmidu pRPA–RD–184 je uvedeno na obr. 6, kde označení „nos", „NPTII", „NOSpro", „35Spro", „gen BRX", „RB" a „LB" mají stejný význam jaký byl vysvětlen u obr. 5.

pRPA-RD–241: Příprava vektoru pro *Agrobacterium tumefaciens* obsahujícího genový konstrukt kódující heliomicin směrovaný do mezibuněčného prostoru

Plazmid pRPA–RD–240 byl štěpen restrikčními enzymy *SfiII* a *AscI* a fragment DNA obsahující gen RP-1a–heliomicin byl purifikován. Plazmid pRPA–RD–184 byl naštěpen stejnými restrikčními enzymy. Fragment DNA obsahující expresní kazetu PR–1a–heliomicin byl vložen do plazmidu pRPA–RD–184. Byl tím získán vektor pro *Agrobacterium tumefaciens*, který obsahuje sekvenci kódující fúzní protein PR–1a–heliomicin a který umožňuje expresi heliomicinu v extracelulárním prostoru rostliny.

4–2. Konstrukce expresní kazety „promotor CsVMV – signální peptid PG1 – heliomicin – terminátor Nos"

pRPA–NP4: Konstrukce plazmidu obsahující signální peptid genu PG1 polygalakturinázy kukuřice (Genbank, přístup č. X57627)

Dva syntetické oligonukleotidy s částečně komplementárními sekvencemi Oligo 15 a Oligo 16, popsanými dále, byly hybridizovány tak, že byly 5 minut v 65 °C a pak pomalým snižováním teploty na 30 °C během 30 minut.

Oligo 15: 5' GGTCTAGAAT GGCCTGCACC AACAACGCCA TGAGGGCCCT
CTTCCTCCTC 3'

Oligo 16: 5' CCGAATTCGG CGCCGTGCAC GATGCAGAAG AGCACGAGGA
GGAAGAGGGC 3'

Po hybridizaci Oligo 15 s Oligo 16 sloužil jednovláknový zbytek DNA jako matrice pro Klenowův fragment DNA polymerázy 1 z *E. coli* (za standardních podmínek doporučených výrobcem (New England Biolabs)) pro vytvoření dvojitého vlákna na 3'–koncích oligonukleotidů. Získaný dvouvláknový oligonukleotid byl pak naštěpen restrikčními enzymy *XnaI* a *EcoRI* a

klonován do plazmidu pBS II SK(–) (Stratagene), který byl předtím naštěpen stejnými restrikčními enzymy. Byl tak získán klon obsahující kódující úsek 22 aminokyselin signálního peptidu genu PG1, který může být fúzován ve shodném čtecím rámci s dalším proteinem prostřednictvím místa SfI (sekvence id. č. 15).

pRPA–NP5: Konstrukce sekvence kódující heliomicin fúzovaný na signálním peptidu genu PG1

Úsek kódující heliomicin byl amplifikován užitím PCR z klonu pRPA–PS–PR1a–helio (sekvence id.č. 3) termostabilním enzymem Pfu (Stratagene) za standardních podmínek doporučených výrobcem. Syntetické oligonukleotidy použité pro tuto amplifikaci byly následující:

Oligo 17: 5′ GATAAGCTTA TCGGTTCCTG CGTG 3′

Oligo 18 : 5′ GGCTCGAGTC AAGTCTCGCA CCAGCAGTTC AC 3′

Produkt PCR byl naštěpen restrikčním enzymem *XhoI* a klonován do vektoru pRPA–NP4 naštěpeného restrikčními enzymy *SfoI* a *XhoI*. Výsledný klon obsahoval signální peptid genu PG1 fúzovaný ve shodném čtecím rámci s heliomicinem (sekvence id. č. 18).

pRPA–NP6: Konstrukce expresní kazety heliomicinu v transformačním vektoru

Expresní a transformační vektor pILTAB 357 byl odvozen z binárního vektoru pBin19. Obsahuje promotor CsVMV (Verdaguer et al., Plant.Mol. Biol. 31: 1129–1139, 1996) s vícenásobným klonovacím místem a terminátorem transkripce Nos z nopalinsyntázového genu (obr. 2). Sekvence tohoto fragmentu je zde uvedena jako sekvence id. č. 19.

Expresní vektor heliomicinu byl získán inzercí restrikčního fragmentu XbaI–KpnI z vektoru pRPA–NP5 obsahujícího fúzi signálního peptidu PG1–heliomicin do vektoru pILTAB 357 naštěpeného stejnými restrikčními enzymy. Výsledný klon tedy obsahoval expresní kazetu promotor CsVMV – signální peptid PG1 – heliomicin – terminátor Nos (sekvence id. č. 20).

4–3. Příprava transformovaných rostlin tabáku

3.1. Transformace

Vektor pRPA–RD–241 nebo pRPA–NP6 byl vnesen do buněk kmenu *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 nebo EHA105 (Hood et al., 1987) nesoucí kosmid pTVK291 (Komari et al., 1986). Transformační metoda byla založena na postupu, který popsali Horsch et al. (1985).

3.2. Regenerace

Regenerace tabáku PBD6 (pocházejícího ze SEITA, Francie) z listových explantátů probíhala na základním médiu dle Murashige a Skoog (MS médium) obsahujícím 30 g/l sacharózy a 200 μg/ml kanamycinu. Listové explantáty byly odebrány z rostlin pěstovaných ve skleníku nebo *in vitro* a byly transformovány metodou listových disků (Horsch et al., 1985) ve třech postupných etapách: první etapa spočívala v indukci výhonků na médiu s přídavkem 30 g/l sacharózy obsahujícím ještě 0,05 mg/l naftyloctové kyseliny (ANA) a 2 mg/l benzylaminopurinu (BAP) po dobu 15 hodin. Výhonky vytvořené v této etapě byly pak ponechány 10 hodin na MS médiu s přídavkem 30 g/l sacharózy, ale bez hormonů. Pak byly výhonky odebrány a přemístěny na médiu MS s poloviční koncentrací solí, vitamínů a sacharózy, ale neobsahující hormony. Přibližně po 15 dnech byly zakořeňující výhonky přeneseny do půdy.

3.3. Analýzy exprese heliomicinu v transgenním tabáku

a) Tvorba specifických polyklonálních protilátek

Polyklonální protilátky byly získány imunizací králíků nativním heliomicinem postupem obvyklým v Centru biologických experimentů VALBEX (IUT A – Lyon I). Získané sérum (15 ml) bylo purifikováno na koloně se Sepharose 4B (Pharmacia) s navázaným heliomicinem, čímž byly selektovány protilátky specificky rozpoznávající tento peptid. Nakonec byly specifické protilátky eluovány 6 ml Glycinového roztoku (200mM, pH 3) neutralizovaného 1M Tris pH 9,5 a dialyzovány s 0,5xPBS a až do použití byla uloženy v –20 °C.

b) Imunodetekce heliomicinu v transgenním tabáku

Analýza exprese heliomicinu byla provedena s 8 rostlinami transgenního tabáku transformovanými konstruktem pRPA–NP6 a nebo s kontrolami. Plně vyvinuté listy tabáku byly zmrazeny v kapalném dusíku a rozdrceny a proteiny byly extrahovány 1 hodiny při 4 °C pufrem obsahujícím 50mM Tris–HCl, 1% PVP25, 0,05% Triton X100, pH 7,5, přičemž byly užity 4 ml pufru na 1 gram čerstvé hmotnosti pletiva. po centrifugaci byla stanovena koncentrace proteinu v supernatantu Brodfordovou metodou.

5 µg proteinu z každého z 9 extraktů bylo naneseno na nitrocelulózovou membránu ve formátu „slot–blot" a také 50 ng čistého heliomicinu jako pozitivní kontrola. Membrána byla inkubována 1 hodinu v 1% blokovacím roztoku (Boehringer, katalog. č. 1 921 673) v TBS, pak inkubována přes noc ve 4 °C s imunopurifikovanými protilátkami namířenými proti heliomicinu v ředění 1/2000 v pufru TBS s 0,05% Tween 20. Po opláchnutí (TBS, 0,1% Tween a 0,5% blokovací pufr) byla membrána 1 hodinu inkubována při teplotě místnosti (TBS s 0,5% blokovacím pufrem) s kozí protilátkou (v ředění 1/50 000) specificky namířenou proti králičím imunoglobulinům konjugovanou s alkalickou fosfatázou (SIGMA katalog. č. A–3687). Po opláchnutí (TBS, 0,1% Tween 20) se provedla detekce pomocí substrátu fosfatázy (BioRad, katalog. č. 170–5012) a luminiscence produktu byla detekována radiograficky na filmu Amersham (ECL).

Výsledky tohoto pokusu ukázaly, že 4 rostliny transgenního tabáku exprimovaly heliomicin. Signál u ostatních rostlin byl slabý a nebyl dostatečně průkazný. Signál pozorovaný u průkazně pozitivních rostlin byl na srovnatelné hladině s pozitivní kontrolou (50 ng heliomicinu), což ukazuje, že u těchto rostlin heliomicin představoval přibližně 1 % celkového proteinu.

Příklad 5

Přípravky

5.1 Emulgovatelné koncentráty

Příklad CE1:

– účinná látka	400 g/l
– alkalický dodecylbenzensulfonát	24 g/l
– oxyetylnonylfenol v 10 molekulách etylenoxidu	16 g/l
– cyklohexanon	200 g/l
– aromatické rozpouštědlo	do 1 l

Příklad CE2

– účinná látka	400 g/l
– epoxidovaný rostlinný olej	25 g
– směs alkylarylsulfonátu a polyglykoléteru v mastném alkoholu	100 g
– dialkylformamid	50 g
– xylén	575 g

5–2. Koncentrované suspenze

Příklad SC1:

– účinná látka	500 g
– polyetoxytristyrylfenolfosfát	50 g
– polyetoxylalkylfenol	50 g
– polykarboxylát sodný	20 g
– etylénglykol	50 g
– organopolysiloxanový olej (jako protipěnivý prostředek)	1 g
– polysacharid	1,5 g
– voda	316,5 g

5–3. Smáčitelné prášky (nebo prášky pro postřik)

Příklad PM1:

– účinná látka	50 %
– mastný etoxyalkohol (smáčedlo)	2,5 %
– etoxyfenyletylfenol (disperzní činidlo)	5 %
– křída (inertní nosič)	42,5 %

Příklad PM2:

– účinná látka	10 %
– syntetický oxoalkohol rozvětveného typu, etoxylovaná skupina s 13 uhlíky na 8 až 10 etylénoxidových skupin (smáčedlo)	0,75 %
– neutrální lignosulfonát vápenatý (disperzní činidlo)	12 %
– uhličitan vápenatý (inertní nosič)	do 100 %

Příklad PM3:

– účinná látka	75 %
– smáčedlo	1,50 %
– disperzní činidlo	8 %
– uhličitan vápenatý (inertní nosič)	do 100 %

Příklad PM4:

– účinná látka	90 %
– mastný etoxyalkohol (smáčedlo)	4 %
– etoxylfenyletylfenol (dispergační činidlo)	6 %

Příklad PM5:

– účinná látka	90 %
– směs aniontových a neionogenních povrchově aktivních látek (smáčedlo)	2,5 %
– neutrální lignosulfonát vápenatý (disperzní činidlo)	5 %
– kaolin (inertní nosič)	42 %

5–4. Dispergovatelné granuláty

Příklad GD1:

V mísicím zařízení se smíchá 90 % (hmot.) účinné látky a 10 % močoviny v perličkách. Směs se rozmělní v kuželovém drtiči. Získá se tak prášek, který se může zvlhčit přibližně 8 % (hmot.) vody. Vlhký prášek se extruduje pomocí válcového extrudéru. Získaný granulát se suší a pak se jemně drtí a prosívá, takže částice bez ohledu na tvar jsou velikosti 150 až 2000 μm.

Příklad GD2

V mísiči se smíchají následující složky:

– účinná látka	75 %
– smáčedlo (alkylnaftalénsulfonát sodný)	2 %
– disperzní činidlo (polynaftalénsulfonát sodný)	8 %
– inertní nosič nerozpustný ve vodě (kaolin)	15 %

Tato směs se granuluje postupem na fluidním loži v přítomnosti vody, suší, drží a prosívá, čímž se získá granulát velikosti zrn 0,15 až 0,80 mm.

5–5. Farmaceutické přípravky

Příklad A: tablety

V oboru známým způsobem se připraví tablety obsahující dávku 50 mg účinného peptidu s následujícím složením:

– peptid heliomicin M1	50 mg
– amidon	60 mg
– laktóza	50 mg
– stearan hořečnatý	2 mg

Příklad B: Roztok pro injekci

Roztok pro injekci obsahující dávku 20 mg účinného peptidu má následující složení:

– peptid heliomicin M1 22,4 mg
– destilovaná voda doplnit do 2 cm^3

Příklad 6

Stálost aktivity heliomicinu

Stabilita antimikrobiálního peptidu vůči rostlinným proteázám je podstatným faktorem pro získání dobré hladiny exprese a tudíž rezistence transgenní rostliny proti fytopatogenu. Tato stabilita je kritickým bodem např. antimikrobiálního peptidu hmyzu cecropinu B (Owens a Huette, 1997, MPMI, 10 (4): 525–528). Stabilita a aktivita heliomicinu byla testována ve fytopatologickém testu (*Botytis cinerea*) inkubací s hrubým extraktem z 8 hlavních plodin (kukuřice, pšenice, ječmen, řepka, sója, slunečnice, rajče a tabák).

Listy všech 8 druhů rostliny byly rozdrceny při nízké teplotě (teplota kapalného dusíku) v třecí misce na prášek a ten byl resuspendován ve stejném objemu vody. Po centrifugaci (10 000 g, 30 minut) byl odebrán supernatant a stanovena koncentrace proteinu. Koncentrace všech extraktů pak byla pomocí vody upravena na 1 mg/ml a extrakty byly sterilizovány filtrací (0,2 μm). 100 μl extraktu (také kontroly s vodou) bylo smícháno s 50 μl roztoku heliomicinu (obsahujícího 15 μg peptidu, jakož i kontrola bez peptidu). Tato směs se inkubovala ve 30 °C a alikvotní části po 20 μl byly odebrány v čase 0, 1, 2, 4 a 20 hodin a až do testu uchovány na ledu.

Test protihoubové aktivity byl proveden ve 25 °C na mikrodestičkách s alikvotem 80 μl čerstvé suspenze spór *Botrits cinerea* (10 000 spór/ml v roztoku „Potato Dextrose Broth, Difco, 12 g/l). Vizuální vyhodnocení po 12 a 24 hodinách neukázalo žádný pokles v protihoubové aktivitě heliomicinu ani u vzorků po 20hodinové inkubaci ve 30 °C s extrakty z kukuřice, pšenice, ječmene, řepky, sóji, slunečnice, rajčete a tabáku. Tyto výsledky prokázaly velmi dobrou stabilitu heliomicinu vůči rostlinným proteázám, neboť protihoubová aktivita testovaná na *Botrytis cinerea* nebyla snížena přítomnosti hrubých rostlinných extraktů.

Příklad 7

Příprava různých mutant heliomicinu: jednoduchých, dvojnásobných, trojnásobných a čtyřnásobných mutant

Mutanty uvedené v tomto příkladu byly připraveny postupem popsaným v příkladu 2 tak, že některé z oligonukleotidů 1 až 6 byly nahrazeny jiným oligonukleotidem zvoleným pro vnesení mutace.

Heliomicin R48: Náhrada aminokyseliny Glu48 v sekvenci id č. 1 bazickou aminokyselinou, zejména argininem (Arg48). Podle sekvence kódující heliomicin, sekvence id. č. 1, byl kodon GAA kódující Glu nahrazen kodonem AGA kódujícím Arg. Oligonukleotidy 19 a 20 byly užity k nahrazení oligonukleotidů 5 a 6 z příkladu 2.

Oligo 19: 5′ GATCCTTCGC TAACGTTAAC TGTTGGTGTA GAACCTGATA GG 3′

Oligo 20: 5′ TCGACCTATC AGGTTCTACA CCAACAGTTA ACGTTAGCGA AG

Heliomicin L28L29: Náhrada dvou bazických aminokyselin Lys a Arg v polohách 28 a 29 v sekvenci id. č. 1 dvěma hydrofóbními aminokyselinami, zejména leucinem (Leu28 a Leu29). Podle sekvence kódující heliomicin, sekvence id. č. 1, byl úsek AAG–CGC kódující peptidové zbytky Lys-Arg nahrazen sekvencí TTG-TTG kódující peptidový zbytek Leu–Leu. Oligonukleotidy 21 a 22 byly užity k nahrazení oligonukleotidů 3 a 4 z příkladu 2.

Oligo 21: 5' CTAGTGACTG CAACGGCGAG TGCTTGTTGC GC 3'

Oligo 22: 5' GCAACAAGCA CTCGCCGTTG CAGTCA 3'

Heliomicin L28L29R48: Náhrada dvou bazických aminokyselin Lys a Arg v polohách 28 a 29 v sekvenci id. č. 1 aminokyselinovými zbytky leucinu a náhrada aminokyseliny Glu48 v sekvenci id č. 1 bazickou aminokyselinou, zejména argininem (Arg48). Oligonukleotidy 19 a 22 byly užity k nahrazení oligonukleotidů 3 a 6 z příkladu 2.

Heliomicin A24A25: Náhrada dvou kyselých aminokyselin Asn24 a Gly25 v sekvenci id. č. 1 dvěma alaniny (Ala24 a Ala25). Podle sekvence kódující heliomicin, sekvence id. č.1, byl úsek AAC–GGC kódující peptidový zbytek Asn–Gly nahrazen sekvencí GCT–GCT kódující peptidový zbytek Ala–Ala.

Oligonukleotidy 23 a 24 byla užity k nahrazení oligonukleotidů 3 a 4 z příkladu 2.

Oligo 23: 5' CTAGTGACTG CGCTGCTGAG TGCAAGCGGC GC 3'

Oligo 24: 5' GCCGCTTGCA CTCAGCAGCG CAGTCA 3'

Heliomicin A6A7A8A9: Náhrada čtyř aminokyselin Asp6–Lys7–Leu8–Ile9 v sekvenci id. č. 1 čtyřmi aleninovými zbytky (Ala). Podle sekvence kódující heliomicin, sekvence id. č. 1, byl úsek GAC–AAG–TTG–ATT kódující peptidový zbytek Asp6–Lys7–Leu8–Ile9 nahrazen sekvencí GCT–GCT–GCT–GCT kódující peptidový zbytek Ala–Ala–Ala–Ala. Oligonukleotidy 25 a 26 byly užity k nahrazení oligonukleotidu 1 z příkladu 2 a oligonukleotidy 27 a 28 oligonukleotidu 2.

Oligo25: 5' AGCTTGGATA AAAGAGCTGC TGCTGCTGGT AGCTGTGTTT 3'

Oligo 26: 5' GGGGCGCCG TCAACTACA 3'

Oligo 27: 5' CTAGTGTAGT TGACGGCGCC CC 3'

Oligo 28: 5' AAACACAGCT ACCAGCAGCA GCAGCTCTTT TATCCA 3'

Heliomicin A24A25L28L29: Dva oligonukleotidy (sense a antisense) byly potřebné pro překonání absence restrikčního místa před sekvencí kódující peptidový zbytek Asn24–Gly25 a sekvencí kódující peptidový zbytek Lys28–Arg29 heliomicinu podle sekvence id. č. 1. Oligonukleotidy 29 a 30 byla užity k nahrazení oligonukleotidů 3 a 4 z příkladu 2:

Oligo 29: 5' CTAGTGACTG CGCTGCTGAG TGCTTGTTGC GC 3'

Oligo 30: 5' GCAACAAGCA CTCAGCAGCG CAGTCA 3'

Příprava mutant heliomicinu v semipreparativním měřítku

Různé mutanty heliomicinu byly připraveny následujícím způsobem.

Transformované kvasinkové klony transformované mutovaným genem heliomicinu byly kultivovány 24 hodin ve 29 °C v 50 ml selektivního média. Tato předkultura byla použita pro inokulaci 2 l selektivního média, které pak bylo kultivováno 48 hodin ve 29 °C. Kvasinky pak byly eliminovány centrifugací (4000 g, 30 minut, 4 °C). Supernatan byl okyselen na kyselinu octovou na

pH 3,5, podruhé centrifugován (4000 g, 30 minut, 4 °C) a pak pokračovala extrakce na pevné fázi.

První etapa extrakce na pevné fázi s gelovou inverzní fází: okyselený supernatant byl nanesen na kolonku Sep–Pak(tm) C18 (Waters Associates, 10 g fáze), a ekvilibrováno s vodným roztokem kyseliny (0,05% TFA). Hydrofilní molekuly byly eliminovány jednoduchým propláchnutím kyselým vodným roztokem po kterém následovalo propláchnutí 15% roztokem acetonitrilu v 0,05% TFA. Eluce peptidu byla provedena 60% roztokem acetonitrilu v 0,05% TFA. Frakce eluovaná 60% roztokem acetonitrilubyla vysušena pod vakuem byla rozpuštěna ve sterilní ultračisté vodě.

Druhá fáze extrakce na pevné s gelovým kationtoměničem: prepurifikovaná 60% frakce obsahující mutovaný heliomicin byla rozpuštěna v 25mM octanu amonném, pH 3,4. Tento vzorek byl nanesen na kolonku Sep–Pak(tm) Vac 33cc CM s kationtovým měničem (Waters Associates, 10 g fáze), a ekvilibrováno s 25mM octanem amonným, pH 3,4. Eluce mutovaného heliomicinu byla proveden 1M roztokem chloridu sodného (NaCl) v 25mM octanu amonném, pH 3,4. Frakce eluovaná 1M NaCl obsahující mutant heliomicinu byla vysušena pod vakuem, rozpouštěna ve 20 ml sterilního roztoku kyseliny (1% TFA). Mutanta heliomicinu byla dále purifikována pomocí HPLC.

Poslední fáze purifikace užitím HPLC: mutanta heliomicinu byla purifikována až do homogenity chromatograficky na preparativní koloně s inverzní fází Aquapore RP–300 C8 (Brownlee(tm), 220 x 10 mm, 300 Å) užitím lineární dvoufázového gradientu acetonitrilu 2 až 23 % v 0,05% TFA po 10 minut a 23 až 33 % po dalších 80 minut se stálým průtokem 2,5 ml/min. Frakce byly odebrány, vysušeny pod vakuem a rekonstituovány v ultračisté vodě a pak analyzovány na spektrofotometru MALDI pro ověření čistoty a identity vzorku. Mutanty heliomicinu pak byly testovány na protihoubový účinek, jak bylo již popsáno pro heliomicin, proti *Neurospora crassa,Fusarium culmorum* a *Nectria heamatococca.* Byly také vyhodnoceny aktivita mutant heliomicinu proti bakteriím. Užité experimentální podmínky jsou popsány dále.

Test aktivity *in vitro:* měření protihoubové aktivity mikrospektofotometrií

Tato metoda byla užita pro stanovení spektra aktivity peptidu a pro stanovení minimální inhibující koncentrace (CMI) peptidu, při které je aktivní. CMI je vyjádřena jako interval koncentrací [a] – [b], kde [a] je minimální koncentrace, kdy se pozoruje počátek zvyšování účinku a [b] je koncentrace, od které už se žádné zvyšování nepozoruje. Příklady specifické aktivity mutant heliomicinu podle vynálezu vůči vláknitým houbám jsou uvedeny v tabulce 3.

Antibakteriální aktivita byla detekována testem inhibice růstu v tekutém médiu. Testované bakterie byly namíchány do suspenze v kultivačním médiu typu „Poor–Broth". Výhodně bylo užito k přípravě média 1 % (hmotn.) bactotryptonu a 1 % (hmotn.) NaCl na 1 l demineralizované vody. 10 µl testované frakce se naneslo do jamky na mikrodestičce s 90 µl média obsahujícího bakterie (ve výsledné koncentraci odpovídající 1 mOD při 600 nm). Inkubace probíhala při 25 °C 12 až 24 hodin. Růst bakterií byl kvantifikován měřením absorbance v 600 nm pomocí spektrofotometrického čtecího zařízení pro mikrotitrační destičky.

Byly použity následující bakterie: *Bacillus megaterium* (sbírka Pasteurova ústavu), *Micrococcus luteus* (sbírka Pasteurova ústavu), *Staphylococcus aureus (*H. Monteil, Bakteriologický Institut Strasbourg), *Aerococcus viridans* (H. Monteil, Bakteriologický Institut Strasborg) a *E. coli* D22 (P. L. Boquet, Centrum jaderného výzkum, Saclay).

Tabulka 3

Aktivita některých mutant heliomicinu proti vláknitým houbám a bakteriím.

Mikroorganismus	CMI heliomicinu (μM) mutanty				
	L28L29	R48	L28L29R48	A6A7A8A9	helio
HOUBY					
Neurospora crassa	0,8-1,6	0,4-0,8	0,8-1,6	1,6-3,1	0,1-0,2
Fusarium culmorum	3,1-6,2	0,4-0,8	0,8-1,6	3,1-6,2	0,2-0,4
Nectria haematococca	3,1-6,2	0,4-0,8	0,8-1,6	ND	0,4-0,8
BAKTERIE					
Bacillus megaterium	50-100	ND	ND	6,2-12,5	ND
Micrococcus luteus	12,5-25	25-50	ND	ND	ND
Staphylococcus aureus	ND	ND	ND	ND	ND
Aerococcus viridans	ND	ND	ND	12,5-25	ND
E. coli D22	ND	ND	ND	ND	ND

ND: aktivita nebyla detekována

Příklad 7

Test toxicity injekcí

Skupiny 4 myších samic byly ošetřeny intravenózní injekcí roztoku heliomicinu (sekvence id. č. 2) ve fyziologickém roztoku v dávkách 1 a 10 mg/kg. negativní kontrolou byl roztok aprotininu (při dvou dávkách žádný účinek) a pozitivní kontrola byl mellitin (100% mortalita po 5 dnech při 10 mg, významný účinek po 5 dnech při 1 mg). V tomto testu nebyl žádný důkaz toxicity po injektování dvou dávek roztoku heliomicinu.

Citovaná literatura:

Ausubel. F. A. & coll, (eds. Greene). Current Protocols in Molecular Biology, Publ. Wiley & Sons.

Bevan. m. & coll. (1983). Nuc. Acids. Res. 11: 369–385.

Carrington adn Freed (1990). J. Viro. 64: 1590–1597.

Ehret–Sabatier & coll (1996) The Journal of Biological Chemistry, 271, 47, 29537–29544.

Horsch & coll. (1985). Science 227: 1229–1231.

Jefferson & coll (1987), EMBO J. 6: 3901–3907.

Komari & coll. (1986). J. Bacterio. 166:88–94.

Rothstein & coll. (1981), Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 45:99–105.

Stalker & coll. (1988). J. Biol. Chem. 263: 6310–6314:

Odell, J.T. & coll, (1985). Nature 313:810–812.

SEZNAM SEKVENCÍ

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 147 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(ix) ZNAKY:
(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
(B) POZICE: 1..147

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 1:

```
AGC TTG GAT AAA AGA GAC AAG TTG ATT GGC AGC TGT GTT TGG GGC GCC      48
Ser Leu Asp Lys Arg Asp Lys Leu Ile Gly Ser Cys Val Trp Gly Ala
 1               5                  10                  15

GTC AAC TAC ACT AGT GAC TGC AAC GGC GAG TGC AAG CGC CGC GGT TAC      96
Val Asn Tyr Thr Ser Asp Cys Asn Gly Glu Cys Lys Arg Arg Gly Tyr
            20                  25                  30

AAG GGT GGC CAT TGT GGA TCC TTC GCT AAC GTT AAC TGT TGG TGT GAA     144
Lys Gly Gly His Cys Gly Ser Phe Ala Asn Val Asn Cys Trp Cys Glu
        35                  40                  45

ACC                                                                 147
Thr
 49
```

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 169 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(ix) ZNAKY:
(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
(B) POZICE: 1..132

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 2:

```
GAT AAG CTT ATC GGT TCC TGC GTG TGG GGT GCT GTG AAC TAC ACT TCC        48
Asp Lys Leu Ile Gly Ser Cys Val Trp Gly Ala Val Asn Tyr Thr Ser
  1               5                  10                  15

GAT TGC AAC GGT GAG TGC AAG AGG AGG GGT TAC AAG GGT GGT CAC TGC        96
Asp Cys Asn Gly Glu Cys Lys Arg Arg Gly Tyr Lys Gly Gly His Cys
             20                  25                  30

GGT TCC TTC GCT AAC GTG AAC TGC TGG TGC GAG ACT TGAGAGCTCG            142
Gly Ser Phe Ala Asn Val Asn Cys Trp Cys Glu Thr
         35                  40

GCGAGGCGAA CGTGTCGACG GATCCGG                                         169
```

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 261 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(ix) DALŠÍ ZNAKY:
(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
(B) POZICE: 3..224

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 3:

```
CC ATG GGT TTC GTG CTT TTC TCT CAG CTT CCA TCT TTC CTT CTT GTG        47
   Met Gly Phe Val Leu Phe Ser Gln Leu Pro Ser Phe Leu Leu Val
     1               5                  10                  15

TCT ACT CTT CTT CTT TTC CTT GTG ATC TCT CAC TCT TGC CGT GCC GAT       95
Ser Thr Leu Leu Leu Phe Leu Val Ile Ser His Ser Cys Arg Ala Asp
                20                  25                  30

AAG CTT ATC GGT TCC TGC GTG TGG GGT GCT GTG AAC TAC ACT TCC GAT       143
Lys Leu Ile Gly Ser Cys Val Trp Gly Ala Val Asn Tyr Thr Ser Asp
            35                  40                  45


TGC AAC GGT GAG TGC AAG AGG AGG GGT TAC AAG GGT GGT CAC TGC GGT       191
Cys Asn Gly Glu Cys Lys Arg Arg Gly Tyr Lys Gly Gly His Cys Gly
        50                  55                  60

TCC TTC GCT AAC GTG AAC TGC TGG TGC GAG ACT TGAGAGCTCG GCGAGGCGAA     244
Ser Phe Ala Asn Val Asn Cys Trp Cys Glu Thr
    65                  70

CGTGTCGACG GATCCGG                                                   261
```

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 4:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 120 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: dvojité
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(ix) DALŠÍ ZNAKY:
(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
(B) POZICE: 12..101

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 4:

```
GCGTCGACGC G ATG GGT TTC GTG CTT TTC TCT CAG CTT CCA TCT TTC CTT        50
             Met Gly Phe Val Leu Phe Ser Gln Leu Pro Ser Phe Leu
               1               5                  10

CTT GTG TCT ACT CTT CTT CTT TTC CTT GTG ATC TCT CAC TCT TGC CGT        98
Leu Val Ser Thr Leu Leu Leu Phe Leu Val Ile Ser His Ser Cys Arg
     15                  20                  25

GCT GGAGACGCGA ATTCACACA                                              129
Ala
 30
```

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 5:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 75 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: syntetický oligonukleotid 7

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 5:

```
GCGTCGACGC GATGGGTTTC GTGCTTTTCT CTCAGCTTCC ATCTTTCCTT CTTGTGTCTA      60

CTCTTCTTCT TTTCC                                                       75
```

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 6:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 72 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: syntetický oligonukleotid 8

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 6:

TCGCCGGCAC GGCAAGAGTA AGAGATCACA AGGAAAAGAA GAAGAGTAGA CACAAGAAGG 60

AAAGATGGAA GC 72

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 7:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 80 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: syntetický oligonukleotid 9

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 7:

GATAAGCTTA TCGGTTCCTG CGTGTGGGGT GCTGTGAACT ACACTTCCGA TTGCAACGGT 60

GAGTGCAAGA GGAGGGGTTA 80

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 8:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 109 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: syntetický oligonukleotid 10

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 8:

CCGGATCCGT CGACACGTTC GCCTCGCCGA GCTCTCAAGT CTCGCACCAG CAGTTCACGT 60

TAGCGAAGGA ACCGCAGTGA CCACCCTTGT AACCCCTCCT CTTGCACTC 109

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 9:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 85 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: syntetický oligonukleotid 11

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 9:

```
AGGGCCCCCT AGGGTTTAAA CGGCCAGTCA GGCCGAATTC GAGCTCGGTA CCCGGGGATC      60

CTCTAGAGTC GACCTGCAGG CATGC                                            85
```

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 10:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 66 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: syntetický oligonukleotid 12

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 10:

```
CCCTGAACCA GGCTCGAGGG CGCGCCTTAA TTAAAAGCTT GCATGCCTGC AGGTCGACTC      60

TAGAGG                                                                 66
```

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 11:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 93 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: syntetický oligonukleotid 13

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 11:

```
CCGGCCAGTC AGGCCACACT TAATTAAGTT TAAACGCGGC CCCGGCGCGC CTAGGTGTGT      60

GCTCGAGGGC CCAACCTCAG TACCTGGTTC AGG                                   93
```

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 12:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 93 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: syntetický oligonukleotid 14

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 12:

CCGGCCTGAA CCAGGTACTG AGGTTGGGCC CTCGAGCACA CACCTAGGCG CGCCGGGGCC 60

GCGTTTAAAC TTAATTAAGT GTGGCCTGAC TGG 93

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 13:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 50 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: syntetický oligonukleotid 15

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 13:

GGTCTAGAAT GGCCTGCACC AACAACGCCA TGAGGGCCCT CTTCCTCCTC 50

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 14:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 50 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: syntetický oligonukleotid 16

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 14:

CCGAATTCGG CGCCGTGCAC GATGCAGAAG AGCACGAGGA GGAAGAGGGC 50

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 15:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 81 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: dvojité
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(ix) DALŠÍ ZNAKY:
(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
(B) POZICE: 7..73

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 15:

```
TCTAGA ATG GCC TGC ACC AAC AAC GCC ATG AGG GCC CTC TTC CTC CTC          48
       Met Ala Cys Thr Asn Asn Ala Met Arg Ala Leu Phe Cys Ile
       1               5                   10

CTG CTC TTC TGC ATC GTG CAC GGC GCCGAATTC                               81
Val Leu Phe Cys Ile Val His Gly
15                  20
```

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 16:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 24 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: syntetický oligonukleotid 17

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 16:

```
GATAAGCTTA TCGGTTCCTG CGTG                                              24
```

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 17:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 32 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: syntetický oligonukleotid 18

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 17:

```
GGCTCGAGTC AAGTCTCGCA CCAGCAGTTC AC                                     32
```

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 18:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 213 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: dvojité
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(ix) DALŠÍ ZNAKY:
(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
(B) POZICE: 7..205

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 18:

```
TCTAGA ATG GCC TGC ACC AAC AAC GCC ATG AGG GCC CTC TTC CTC CTC          48
       Met Ala Cys Thr Asn Asn Ala Met Arg Ala Leu Phe Cys Ile
       1               5                   10

CTG CTC TTC TGC ATC GTG CAC GGC GAT AAG CTT ATC GGT TCC TGC GTG          96
Val Leu Phe Cys Ile Val His Gly Asp Lys Leu Ile Gly Ser Cys Val
15                  20                  25                  30

TGG GGT GCT GTG AAC TAC ACT TCC GAT TGC AAC GGT GAG TGC AAG AGG         144
Trp Gly Ala Val Asn Tyr Thr Ser Asp Cys Asn Gly Glu Cys Lys Arg
                35                  40                  45

AGG GGT TAC AAG GGT GGT CAC TGC GGT TCC TTC GCT AAC GTG AAC TGC         192
Arg Gly Tyr Lys Gly Gly His Cys Gly Ser Phe Ala Asn Val Asn Cys
            50                  55                  60

TGG TGC GAG ACT TGACTCGAG                                              213
Trp Cys Glu Thr
        65
```

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 19:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 838 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: dvojité
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(ix) DALŠÍ ZNAKY:
(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: promotor CcVMV
(B) POZICE: 7..532

(ix) DALŠÍ ZNAKY:
(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: vícečetné klonovací místo
(B) POZICE: 533..568

(ix) DALŠÍ ZNAKY:
(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: terminátor
(B) POZICE: 569..832

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 19:

```
AAGCTTCCAG AAGGTAATTA TCCAAGATGT AGCATCAAGA ATCCAATGTT TACGGGAAAA      60

ACTATGGAAG TATTATGTGA GCTCAGCAAG AAGCAGATCA ATATGCGGCA CATATGCAAC     120

CTATGTTCAA AAATGAAGAA TGTACAGATA CAAGATCCTA TACTGCCAGA ATACGAAGAA     180

GAATACGTAG AAATTGAAAA AGAAGAACCA GGCGAAGAAA AGAATCTTGA AGACGTAAGC     240

ACTGACGACA ACAATGAAAA GAAGAAGATA AGGTCGGTGA TTGTGAAAGA GACATAGAGG     300

ACACATGTAA GGTGGAAAAT GTAAGGGCGG AAAGTAACCT TATCACAAAG GAATCTTATC     360

CCCCACTACT TATCCTTTTA TATTTTTCCG TGTCATTTTT GCCCTTGAGT TTTCCTATAT     420

AAGGAACCAA GTTCGGCATT TGTGAAAACA AGAAAAAATT TGGTGTAAGC TATTTTCTTT     480

GAAGTACTGA GGATACAACT TCAGAGAAAT TTGTAAGTTT GTAGATCTCG ATTCTAGAAG     540

GCCTGAATTC GAGCTCGGTA CCGGATCCAA TTCCCGATCG TTCAAACATT TGGCAATAAA     600

GTTTCTTAAG ATTGAATCCT GTTGCCGGTC TTGCGATGAT TATCATATAA TTTCTGTTGA     660

ATTACGTTAA GCATGTAATA ATTAACATGT AATGCATGAC GTTATTTATG AGATGGGTTT     720

TTATGATTAG AGTCCCGCAA TTATACATTT AATACGCGAT AGAAAACAAA ATATAGCGCG     780

CAAACTAGGA TAAATTATCG CGCGCGGTGT CATCTATGTT ACTAGATCGG GGATCGAT       838
```

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 20:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
- (A) DÉLKA: 1036 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: dvojité
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(ix) DALŠÍ ZNAKY:
- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: promotor CcVMV
- (B) POZICE: 7..532

(ix) DALŠÍ ZNAKY:
- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
- (B) POZICE: 539..736

(ix) DALŠÍ ZNAKY:
- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: terminátor
- (B) POZICE: 767..1030

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 20:

```
AAGCTTCCAG AAGGTAATTA TCCAAGATGT AGCATCAAGA ATCCAATGTT TACGGGAAAA      60

ACTATGGAAG TATTATGTGA GCTCAGCAAG AAGCAGATCA ATATGCGGCA CATATGCAAC     120

CTATGTTCAA AAATGAAGAA TGTACAGATA CAAGATCCTA TACTGCCAGA ATACGAAGAA     180

GAATACGTAG AAATTGAAAA AGAAGAACCA GGCGAAGAAA AGAATCTTGA AGACGTAAGC     240

ACTGACGACA ACAATGAAAA GAAGAAGATA AGGTCGGTGA TTGTGAAAGA GACATAGAGG     300

ACACATGTAA GGTGGAAAAT GTAAGGGCGG AAAGTAACCT TATCACAAAG GAATCTTATC     360

CCCCACTACT TATCCTTTTA TATTTTTCCG TGTCATTTTT GCCCTTGAGT TTTCCTATAT     420

AAGGAACCAA GTTCGGCATT TGTGAAAACA AGAAAAAATT TGGTGTAAGC TATTTTCTTT     480

GAAGTACTGA GGATACAACT TCAGAGAAAT TTGTAAGTTT GTAGATCTCG ATTCTAGA       538

ATG GCC TGC ACC AAC AAC GCC ATG AGG GCC CTC TTC CTC CTC GTG CTC        586
Met Ala Cys Thr Asn Asn Ala Met Arg Ala Leu Phe Leu Leu Val Leu
  1               5                  10                  15

TTC TGC ATC GTG CAC GGC GAT AAG CTT ATC GGT TCC TGC GTG TGG GGT       634
Phe Cys Ile Val His Gly Asp Lys Leu Ile Gly Ser Cys Val Trp Gly
             20                  25                  30

GCT GTG AAC TAC ACT TCC GAT TGC AAC GGT GAG TGC AAG AGG AGG GGT       682
Ala Val Asn Tyr Thr Ser Asp Cys Asn Gly Glu Cys Lys Arg Arg Gly
         35                  40                  45

TAC AAG GGT GGT CAC TGC GGT TCC TTC GCT AAC GTG AAC TGC TGG TGC       730
Tyr Lys Gly Gly His Cys Gly Ser Phe Ala Asn Val Asn Cys Trp Cys
     50                  55                  60

GAG ACT TGACTCGAGG GGGGGCCCGG TACCGGATCC AATTCCCGAT CGTTCAAACA        786
Glu Thr
 65

TTTGGCAATA AAGTTTCTTA AGATTGAATC CTGTTGCCGG TCTTGCGATG ATTATCATAT     846

AATTTCTGTT GAATTACGTT AAGCATGTAA TAATTAACAT GTAATGCATG ACGTTATTTA     906

TGAGATGGGT TTTTATGATT AGAGTCCCGC AATTATACAT TTAATACGCG ATAGAAAACA     966

AAATATAGCG CGCAAACTAG GATAAATTAT CGCGCGCGGT GTCATCTATG TTACTAGATC    1026

GGGGATCGAT                                                           1036
```

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 21:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 52 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: syntetický oligonukleotid 1

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 21:

AGCTTGGATA AAAGAGACAA GTTGATTGGC AGCTGTGTTT GGGGCGCCGT CA 52

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 222:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 56 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: syntetický oligonukleotid 2

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 22:

AGTGTAGTTG ACGGCGCCCC AAACACAGCT GCCAATCAAC TTGTCTCTTT TATCCA 56

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 23:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 52 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: syntetický oligonukleotid 3

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 23:

ACTACACTAG TGACTGCAAC GGCGAGTGCA AGCGCCGCGG TTACAAGGGT GG 52

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 24:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 52 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: syntetický oligonukleotid 4

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 24:

CACAATGGCC ACCCTTGTAA CCGCGGCGCT TGCACTCGCC GTTGCAGTCA CT 52

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 25:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 56 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: syntetický oligonukleotid 5

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 25:

CCATTGTGGA TCCTTCGCTA ACGTTAACTG TTGGTGTGAA ACCTGATAGG TCGACA 56

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 26:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 52 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: syntetický oligonukleotid 18

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 26:

GATCTGTCGA CCTATCAGGT TTCACACCAA CAGTTAACGT TAGCGAAGGA TC 52

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 27:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 42 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: syntetický oligonukleotid 19

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 27:

GATCCTTCGC TAACGTTAAC TGTTGGTGTA GAACCTGATA GG 42

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 28:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 42 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: syntetický oligonukleotid 18

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 28:

TCGACCTATC AGGTTCTACA CCAACAGTTA ACGTTAGCGA AG 42

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 29:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 32 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: syntetický oligonukleotid 21

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 29:

CTAGTGACTG CAACGGCGAG TGCTTGTTGC GC 32

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 30:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 26 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: syntetický oligonukleotid 22

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 30:

GCAACAAGCA CTCGCCGTTG CAGTCA 26

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 31:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 32 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: syntetický oligonukleotid 23

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 31:

CTAGTGACTG CGCTGCTGAG TGCAAGCGGC GC 32

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 32:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 26 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: syntetický oligonukleotid 24

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 32:

GCCGCTTGCA CTCAGCAGCG CAGTCA 26

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 33:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 40 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: syntetický oligonukleotid 25

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 33:

AGCTTGGATA AAAGAGCTGC TGCTGCTGGT AGCTGTGTTT 40

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 34:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 18 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: syntetický oligonukleotid 26

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 34:

GGGGCGCCGT CAACTACA 18

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 35:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 22 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: syntetický oligonukleotid 27

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 35:

CTAGTGTAGT TGACGGCGCC CC 22

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 36:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 36 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: syntetický oligonukleotid 28

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 36:

AAACACAGCT ACCAGCAGCA GCAGCTCTTT TATCCA 36

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 37:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 32 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: syntetický oligonukleotid 29

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 37:

CTAGTGACTG CGCTGCTGAG TGCTTGTTGC GC 32

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 38:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
(A) DÉLKA: 26 párů bází
(B) TYP: nukleová kyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina
(A) POPIS: syntetický oligonukleotid 30

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE ID. Č. 38:

GCAACAAGCA CTCAGCAGCG CAGTCA 26

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Peptid heliomicinu obsahující peptidovou sekvenci podle vzorce (I)

Xaa–Cys–Xab–Cys–Xac–Cys–Xad–Cys–Xae–Cys–Xaf–Cys–Xag (I)

kde

Xaa představuje skupinu NH_2 nebo peptidový zbytek obsahující 1 až 10 aminokyselin, výhodně 1 až 6 aminokyselin, obsahující alespoň jednu bazickou aminokyselinu, představující peptidovou sekvenci Xaa′–Gly–Xaa″–, kde Xaa′ je skupina NH_2 nebo peptidový zbytek obsahující 1 až 9 aminokyselin a Xaa″ je peptidový zbytek obsahující jednu aminokyselinu vybranou z Leu, Ile, Val, Pro, Ser nebo Thr,

Xab představuje peptidový zbytek obsahující 1 až 10 aminokyselin,

Xac představuje peptidový zbytek obsahující 3 aminokyseliny, přičemž alespoň jednu kyselou aminokyselinu,

Xad představuje peptidovou sekvenci –Lys–Arg–Arg–Gly–Tyr–Lys–Gly–Gly–His–,

Xae představuje peptidovou sekvenci –Gly–Xae′–Asn–, kde Xae′ je peptidový zbytek obsahující 5 aminokyselin,

Xaf je tryptofan, a

Xag je skupina –OH nebo peptidový zbytek obsahující 1 až 2 aminokyseliny.

2. Peptid podle nároku 1, kde bazické aminokyseliny jsou vybrány ze skupiny obsahující lysin, arginin a homoarginin.

3. Peptid podle kteréhokoli z nároků 1 až 2, kde Xac představuje peptidovou sekvenci –Asn–Xac′–Xac″–, přičemž Xac′ představuje peptidový zbytek s 1 aminokyselinou a Xac″ představuje peptidový zbytek s 1 kyselou aminokyselinou.

4. Peptid podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, kde kyselé aminokyseliny jsou vybrány ze skupiny obsahující kyselinu glutamovou (Glu) a asparagovou (Asp).

5. Peptid podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, kde Xac představuje peptidovou sekvenci –Asn–Gly–Glu–.

6. Peptid podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, kde

Xab představuje peptidovou sekvenci –Val–Xab′–Asp–, kde

Xab′ je peptidový zbytek obsahující 8 aminokyselin, a

Xag představuje peptidovou sekvenci –Glu–Xag′, kde

Xag′ je skupina OH nebo zbytek sekvence obsahující 1 aminokyselinu.

7. Peptid podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, kde

Xaa představuje peptidovou sekvenci NH_2–Asp–Lys–Leu–Ile–Gly–Ser– a/nebo

Xab představuje peptidovou sekvenci –Val–Trp–Gly–Ala–Val–Asn–Tyr–Thr–Ser–Asp– a/nebo

Xae představuje peptidovou sekvenci –Gly–Ser–Phe–Ala–Asn–Val–Asn– a/nebo

Xag představuje peptidovou sekvenci –Glu–Thr–OH.

8. Peptid podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7, který je představován sekvencí identifikačního čísla 2 (sekvence id č. 2).

9. Peptid podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8, který obsahuje na jednom ze svých konců nebo na obou koncích peptidové zbytky nezbytné pro expresi a směrování peptidu v hostitelském organismu.

10. Peptid podle kteréhokoliv z nároků 1 až 9, kde cysteinové zbytky v peptidu podle vzorce (I) tvoří alespoň jeden intramolekulární disulfidický můstek.

11. Peptid podle nároku 10, který obsahuje 3 disulfidické můstky spojující cysteinové zbytky 1 a 4, 2 a 5, a 3 a 6.

12. Fúzní peptid „peptid–heliomicin“, který obsahuje heliomicinový peptid podle kteréhokoliv z nároků 1 až 11 a peptidový zbytek, který může být štěpen enzymatickým systémem hostitelské buňky, čímž se umožní uvolnění heliomicinu.

13. Fúzní peptid podle nároku 12, kde peptid fúzovaný s heliomicinem je signální peptid nebo tranzitní peptid.

14. Fúzní peptid podle nároku 13, kde tranzitní peptid je signální peptid genu PR–1α tabáku nebo prekurzor faktoru Matα1 nebo signální peptid genu PG1 polygalakturonázy kukuřice.

15. Fúzní peptid podle nároku 14, který je představován sekvencí id. č. 1, sekvencí id. č. 3 nebo sekvencí id. č. 18.

16. Peptid podle kteréhokoliv z nároků 1 až 15 pro použití jako léčivo.

17. Kompozice, **v y z n a č u j í c í s e t í m** , že obsahuje peptid podle kteréhokoliv z nároků 1 až 15 a vhodné vehikulum.

18. Fragment nukleové kyseliny, který obsahuje sekvenci nukleové kyseliny kódující peptid podle kteréhokoliv z nároků 1 až 15.

19. Fragment nukleové kyseliny podle nároku 18, kde se jedná o nukleotidovou sekvenci typu DNA.

20. Fragment nukleové kyseliny podle nároku 19, kde nukleotidová sekvence DNA obsahuje sekvenci uvedenou jako báze 16 až 147 sekvence id. č. 1, sekvence id č. 2, báze 3 až 224 sekvence id. č. 3 nebo báze 7 až 205 sekvence id. č. 18, nebo sekvenci homologní nebo sekvenci komplementární k této sekvenci.

21. Chimérický gen, který obsahuje kódující sekvenci nukleové kyseliny fúzovanou na 5'– a 3'– konci s heterologními regulačními prvky, které jsou funkční v hostitelském organismu, zejména rostlině, přičemž kódující sekvence obsahuje alespoň jeden fragment DNA podle nároků 18 až 20.

22. Chimérický gen podle nároku 21, kde hostitelský organismus je mikroorganismus.

23. Chimérický gen podle nároku 21, kde hostitelským organismem jsou rostlinné buňky nebo rostlina.

24. Klonovací nebo expresní vektor pro transformaci hostitelského organismu, který obsahuje alespoň jeden replikační počátek a alespoň jeden chimérický gen podle kteréhokoliv z nároků 21 až 23.

25. Transformovaný hostitelský organismus, který obsahuje fragment nukleové kyseliny podle kteréhokoliv z nároků 18 až 20 nebo chimérický gen podle kteréhokoliv z nároků 21 až 23.

26. Tranformovaný hostitelský organismus podle nároku 25, kterým je mikroorganismus, rostlinné buňky nebo rostlina.

27. Transformovaný hostitelský organismus podle nároku 25, kterým jsou rostliny obsahující transformované buňky.

28. Hostitelský organismus podle nároku 27, kterým je rostlina regenerovaná z transformované rostlinné buňky.

29. Transformovaný hostitelský organismus podle nároku 25, kde mikroorganismus je vybrán z bakterií, zejména *E. coli*, kvasinek, zejména rodů *Saccharomyces, Kluyveromyces* nebo *Pichia*, hub zejména rodu *Aspergillus*, nebo bakulovirů.

30. Transformovaná rostlinná buňka, která obsahuje fragment nukleové kyseliny podle kteréhokoliv z nároků 18 až 20 nebo chimérický gen podle kteréhokoliv z nároků 21 až 23.

31. Transformovaná rostlina, která obsahuje alespoň jednu transformovanou rostlinnou buňku podle nároku 30.

32. Transformovaná rostlina podle nároku 31 odolná proti chorobám, které způsobuje *Cercospora*, zejména *Cercospora beticola*, *Cladosporium*, zejména *Cladosporium herbarum*, *Fusarium*, zejména *Fusarium culmorum* nebo *Fusarium graminearum*, a *Phytophthora*, zejména *Phytophthora cinnamoni*.

33. Transformovaná rostlina, která byla získána pěstováním a/nebo křížením rostlin podle nároků 31 nebo 32 a která obsahuje fragment nukleové kyseliny podle kteréhokoliv z nároků 18 až 20 nebo chimérický gen podle kteréhokoliv z nároků 21 až 23.

34. Semena transformovaných rostlin podle kteréhokoliv z nároků 31 až 33, která obsahují fragment nukleové kyseliny podle kteréhokoliv z nároků 18 až 20 nebo chimérický gen podle kteréhokoliv z nároků 21 až 23.

35. Způsob transformace hostitelského organismu, zejména rostlinné buňky nebo rostliny, **vyznačující se tím**, že se do hostitelského organismu vnese alespoň jeden fragment nukleové kyseliny podle kteréhokoliv z nároků 18 až 20 nebo chimérický gen podle kteréhokoliv z nároků 21 až 23.

36. Způsob podle nároku 35, **vyznačující se tím**, že hostitelský organismus je rostlinná buňka nebo rostlina.

37. Způsob podle nároku 36, **vyznačující se tím**, že se regeneruje rostlina z transformované rostlinné buňky nebo rostliny.

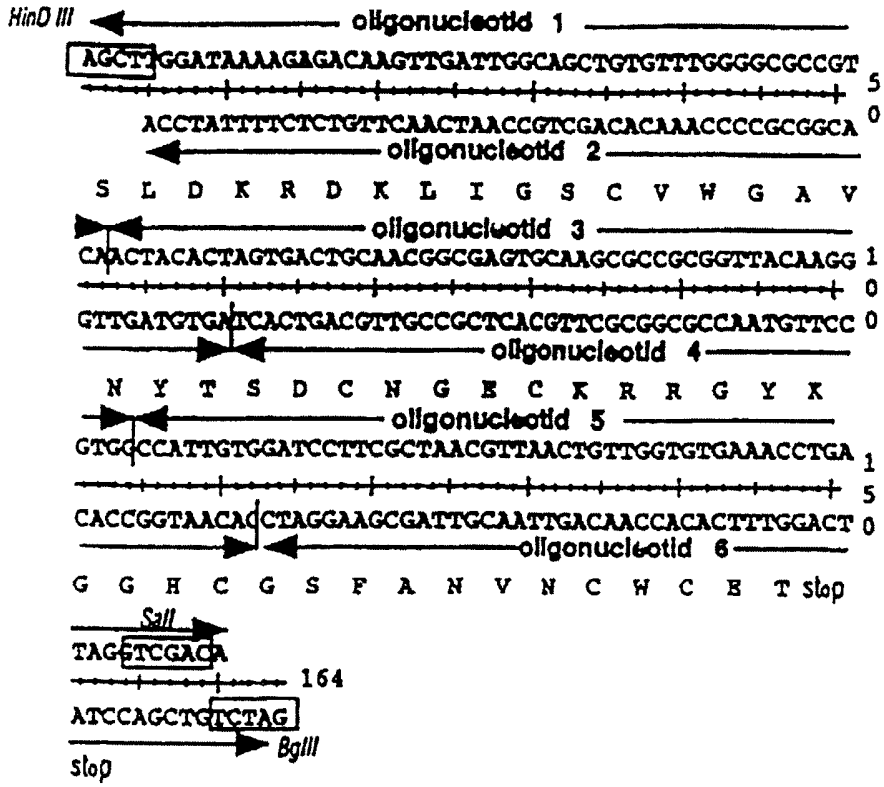
38. Způsob pěstování transformovaných rostlin podle kteréhokoliv z nároků 31 až 33, **vyznačující se tím**, že obsahuje kroky, kdy se vysejí semena transformovaných rostlin na pole vhodné pro pěstování těchto rostlin, na povrch pole se aplikuje agrochemický přípravek, aniž by se podstatným způsobem ovlivnila semena nebo transformované rostliny, po dosažení zralosti se pěstované rostliny sklidí, a případně se oddělí ze sklizených rostlin semena.

39. Způsob pěstování podle nároku 38, **vyznačující se tím**, že agrochemický přípravek obsahuje alespoň jednu účinnou látku projevující fungicidní a/nebo baktericidní aktivitu.

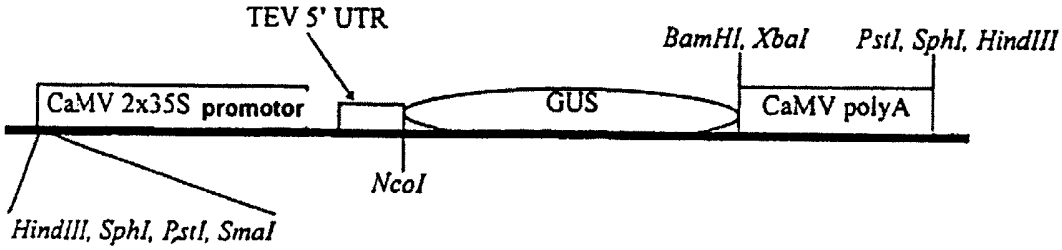
40. Způsob pěstování podle nároku 39, **vyznačující se tím**, že účinná látka projevuje doplňující účinky k účinkům peptidu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 20.

41. Způsob přípravy heliomicinu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 15, **vyznačující se tím**, že obsahuje kroky, kdy se pěstuje transformovaný organismus podle nároků 25 až 29 ve vhodném kultivačním médiu, a provede se extrakce a celková nebo částečná purifikace získaného heliomicinu.

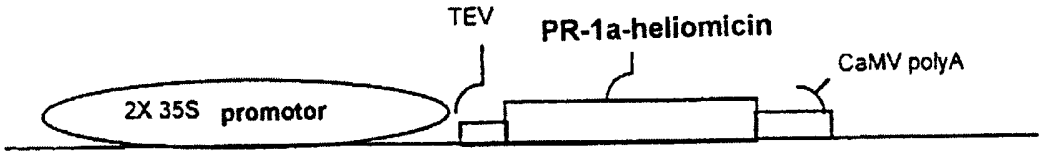
2 výkresy


HinD III
oligonucleotid 1
AGCTTGGATAAAAGAGACAAGTTGATTGGCAGCTGTGTTTGGGGCGCCGT
5
ACCTATTTTCTCTGTTCAACTAACCGTCGACACAAACCCCGCGGCA
0
oligonucleotid 2
S L D K R D K L I G S C V W G A V
oligonucleotid 3
CAACTACACTAGTGACTGCAACGGCGAGTGCAAGCGCCGCGGTTACAAGG
1
0
GTTGATGTGATCACTGACGTTGCCGCTCACGTTCGCGGCGCCAATGTTCC
0
oligonucleotid 4
N Y T S D C N G E C K R R G Y K
oligonucleotid 5
GTGGCCATTGTGGATCCTTCGCTAACGTTAACTGTTGGTGTGAAACCTGA
1
5
CACCGGTAACACCTAGGAAGCGATTGCAATTGACAACCACACTTTGGACT
0
oligonucleotid 6
G G H C G S F A N V N C W C E T stop
SalI
TAGGTCGACA
164
ATCCAGCTGTCTAG
BglII
stop

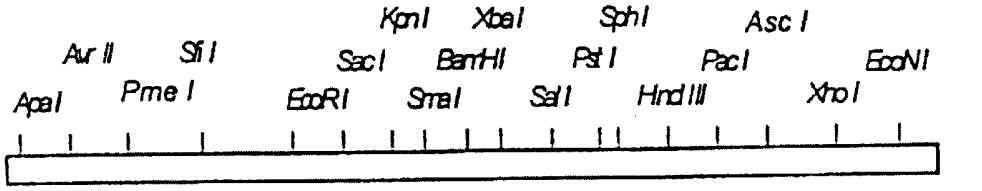
Obr. 1


TEV 5' UTR
BamHI, XbaI
PstI, SphI, HindIII
CaMV 2x35S promotor
GUS
CaMV polyA
NcoI
HindIII, SphI, PstI, SmaI

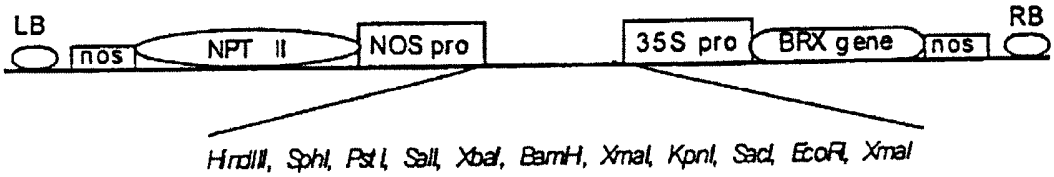
Obr. 2



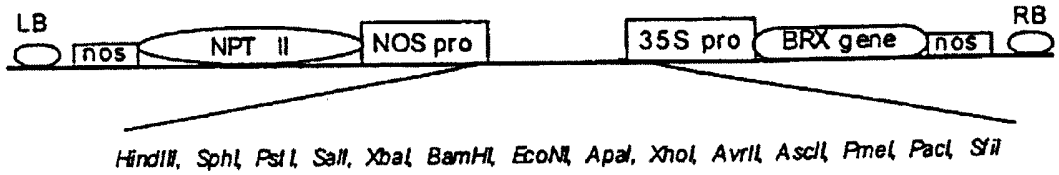
Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5



Obr. 6

Konec dokumentu