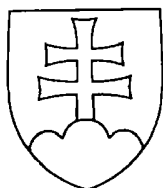


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA

- (22) Dátum podania prihlášky: **29. 9. 2000**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **09/411 329**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **1. 10. 1999**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **US**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **11. 9. 2003**
Vestník ÚPV SR č.: **9/2003**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky
v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: **PCT/US00/27029**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: **WO01/25445**

(11), (21) Číslo dokumentu:

423-2002

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :

C12N 15/57,
C12N 9/64,
C07K 16/40,
C12N 5/10

- (71) Prihlasovateľ: **AMGEN INC., Thousand Oaks, CA, US;**
(72) Pôvodca: **Boone Thomas Charles, Newbury Park, CA, US;**
Li Huimin, Newbury Park, CA, US;
Mann Michael Benjamin, Thousand Oaks, CA, US;
(74) Zástupca: **Bušová Eva, JUDr., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Fibrinolytický aktívny polypeptid**

- (57) Anotácia:
Je opísaný fibrinolytický aktívny metaloproteinázový peptid (nazývaný „nový aktívny trombolýtický peptid“ (NAT)), ktorý je účinný pri *in vivo* lýze krvných zrazenín, tiež sú opísané metódy a materiály potrebné na jeho výrobu pomocou rekombinantnej expresie.

FIBRINOLYTICKY AKTÍVNY POLYPEPTID

Oblasť techniky

Tento vynález sa vzťahuje k fibrinolytický aktívnej metaloproteináze, ktorá má v prírode sa nevyskytujúcu sekvenciu, k metódam jej výroby a k jej použitiu v liečbe trombóz *in vivo*.

Doterajší stav techniky

Fibroláza je enzymaticky aktívny polypeptid (konkrétne metaloproteináza), tvorený 203 aminokyselinami, ktorý bol prvý raz izolovaný purifikáciou z jedu hada Southern Copperhead (Patent USA č. 4, 610,879, vydaný 9. septembra 1986 (Markland et al.); a Guan et. Al., Archives of Biochemistry and Biophysics, zväzok 289, číslo 2, strany 197-207 (1991). Enzým vykazuje priamu fibrinolytickú aktivitu so slabou alebo žiadnou hemoragickou aktivitou. Rozpúšťa krvné zrazeniny tvorené z fibrinogénu alebo z plnej krvi.

Aminokyselinová sekvencia fibrolázy bola určená a tiež boli popísané metódy pre rekombinantnú produkciu v kvasinkách a použitie pre úpravu tromboembolických podmienok *in vivo*. Randolph et al., Protein Science, Cambridge University Press (1992), strany 590-600 a Európska patentová žiadosť č. 0 323 722 (Valenzuela et al.), publikovaná 12. júla 1989.

Podstata vynálezu

Tento vynález poskytuje fibrinolytickú metaloproteinázu o aminokyselinovej sekvencii, ktorá sa bežne v prírode nevyskytuje (popísaná vid'. SEQ ID NO:1 a tiež popisovaná tu ako "novel acting thrombolytic" (NAT). Tiež sú poskytnuté sekvencie nukleovej kyseliny ako napr. SEQ ID NO: 2 a jej varianty, ktoré kódujú NAT.

Termín "zrelý" je používaný v jeho konvenčnom zmysle - označuje biologicky aktívny polypeptid, ktorý bol enzymaticky spracovaný *in situ* v hostiteľskej bunke, vyštiepením z "prepro" oblasti.

Vzhľadom k fibrinolytickej aktivite je NAT použiteľný *in vivo* ako lyzačné činidlo krvných zrazenín pri liečení trombóz u cicavcov (vrátane krýs, prasiat a človeka).

NAT polypeptid v tomto vynáleze ako liečebné činidlo poskytuje výhody oproti v prírode sa vyskytujúcej fibroláze (napr. fibrinolytický polypeptid nájdený v hadom jede). U natívnej fibrolázy je popísané niekoľko alternatívnych N-koncov: QQRFP, EQRFP a ERFP (kde E značí cyklický glutamín alebo kyselinu pyroglutámovú). Presnejšie, molekula fibrolázy, ktorá začína na N-konci sekvenciou QQRFP, je degradovaná na 2 izoformy, ktoré majú N-konce EQRFP a ERFP. Rekombinantná fibroláza vyrábaná v kvasinkách je zmes všetkých týchto 3 foriem a teda nie je homogénna. Vid'. Loayza et al, Journal of Chromatography, B 662, strany 227-243 (1994).

A navyše cyklický glutamín blokuje N-koniec a znemožňuje tak sekvenovanie.

V zrovnání s tým rekombinantný NAT (popisovaný v tomto vynáleze) poskytuje jednu formu: iba jeden N-koniec je typicky vyrábaný. Výsledkom je väčšia homogenita koncového produktu v zrovnání s rekombinantnou fibrolázou, čo je výhodné, keď ako konečné upotrebenie sú zamýšľané lekárske aplikácie.

Stručný prehľad obrázkov na výkresoch

Obrázok 1 zobrazuje v lineárnom tvare celú aminokyselinovú sekvenciu NATu (Seq ID NO:3), skladajúcu sa z "prepo" oblasti (podčiarknutá), ktorá obsahuje "signálny" peptid, a zrelý polypeptid (nepodčiarknutý).

Podrobný prehľad obrázkov na výkresoch

NAT môže byť vyrábaný rekombinantnou expresiou molekuly nukleovej kyseliny o SEQ ID NO:4, ktorá kóduje kompletnú aminokyselinovú sekvenciu NATu (SEQ ID NO:3), vrátane "prepo" oblasti (nukleotidy 1173) a zrelého polypeptidu (nukleotidy 784-1386), vo vhodnom hostiteľovi. Následne po expresii, je prepo oblasť v hostiteľskej bunke enzymaticky odštiepená a poskytuje zrelý aktívny polypeptid (SEQ ID NO:1).

NAT je vyrábaný v kvasinkách, ako bude vysvetlené detailnejšie nižšie.

Zrelý polypeptid (SEQ ID NO: 1), ktorý je takto vyrábaný môže mať a tiež nemusí ako koncovú aminokyselinu - metionín a to v závislosti od spôsobu prípravy. Typicky je metionín, ako koncová aminokyselina prítomný, keď je polypeptid vyrábaný rekombinantne v nesekrétujúcom bakteriálnom druhu (napr. *E.coli*) ako hostiteľovi.

Okrem toho, molekula nukleovej kyseliny o SEQ ID NO: 2, je tiež použiteľná, pretože je to degenerovaná sekvencia a kóduje rovnaký polypeptid. Tento vynález zahrnuje tiež molekuly nukleovej kyseliny, ktoré môžu kódovať ďalšie aminokyseliny hraničiace na 5' alebo 3' konci s oblasťou, ktorá kóduje zrelý polypeptid, rovnako ako sekvencie kódujúce alternatívne pre/pro oblasti (napr. sekvencie zodpovedné za sekréciu polypeptidu cez bunkové membrány) v mieste natívnej pre/pro oblasti. (napr. nájdené v prírode vyskytujúcej sa fibroláze). Ďalšie sekvencie môžu tiež byť nekódujúce sekvencie, vrátane regulačných oblastí ako promótor transkripcie alebo translácie, v závislosti od hostiteľskej bunky.

NAT môže byť pripravený pomocou dobre známych rekombinantných techník, ktoré sú popísané bližšie v Sambrook et al., *Molecular cloning: Laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989) a/alebo v Ausubel et al., editors, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishers Inc. and Wiley and Sons, New York (1994).

DNA molekula kódujúca polypeptid alebo jeho skrátená verzia, môže byť získaná napríklad pomocou metódy: "screening" genómovej alebo cDNA knižnice, alebo pomocou PCR amplifikácie. Nasleduje nahradenie kodónu, ktorý kóduje N-koncové aminokyseliny QQR, kodónom pre serín (S).

Alternatívne, môže byť molekula kódujúca NAT pripravená chemickou syntézou, pomocou metód, ktoré sú dobre známe skúseným chemikom. Popísané boli Engelsom et al. v *Angew. Chem. Intl. Ed.*, Volume 28, strany 716-734 (1989). DNA je niekoľko stoviek nukleotidov dlhá. Nukleové kyseliny dlhšie ako jedno sto nukleotidov môžu byť syntetizované rovnakými metódami ako niekoľko fragmentov a následne tieto fragmenty

môžu byť ligované k sebe, tak aby vytvorili nukleotidovú sekvenciu o žiadanej dĺžke.

DNA molekula je vložená do príslušného expresného vektora pre expresiu vo vhodnej hostiteľskej bunke.

Vektor je vybraný, tak aby fungoval v danej hostiteľskej bunke (napr. vektor je kompatibilný s hostiteľským bunkovým aparátom, tak že dochádza k expresii DNA).

Aj keď polypeptid môže byť exprimovaný v prokaryotickej, kvasinkovej, hmyzej (bakulovírusový systém) alebo eukaryotickej hostiteľskej bunke, kvasinka je uprednostnená, ako bude ďalej podrobnejšie vysvetlené.

Vektory používané k expresii NAT v akejkoľvek hostiteľskej bunke môžu tiež obsahovať 5' hraničiacu oblasť (spomínaná ako "promótor") a ďalšie regulačné prvky prakticky pripojené k DNA tak, aby boli exprimované. Sú to enhancery, začiatok replikačného elementu, celá sekvencia intrónu, obsahujúca donorové a akceptorové vystrihovacie miesto, signálna peptidová sekvencia, sekvencia pre väzbu ribozómu a polyadenylačná sekvencia, polylinkerová oblasť pre inzerciu nukleovej kyseliny kódujúcej NAT a selekčný markér.

Každý z týchto elementov je diskutovaný ďalej.

Nie nutne, môže vektor tiež obsahovať "tag" sekvenciu, napr. oligonukleotidovú sekvenciu lokalizovanú na 5' alebo 3' koncu polypeptid- kódujúci sekvenciu, ktorá kóduje poly His (ako hexaHis) alebo krátke imunogénne sekvencie (ako c-myc alebo hemagglutínínový epiptop, pre ktoré sú protilátky, vrátane monoklonálnych protilátok, komerčne dostupné. Tento tag je exprimovaný spoločne s NAT a môže slúžiť ako afinitný

tag pre purifikáciu tohto polypeptidu z hostiteľskej bunky. Následne môže byť tag odstránený z purifikovaného polypeptidu rôznymi spôsobmi, napríklad použitím selektívnej peptidázy.

5' hraničná sekvencia môže byť v prírode sa vyskytujúca sekvencia, alebo môže byť homológna (napr. z rovnakého druhu alebo rodu ako hostiteľská bunka), heterogénna (napr. z iného druhu alebo rodu, ako je hostiteľská bunka), hybridná (napr. kombinácia 5' hraničná sekvencia z viacej ako jedného druhu) alebo syntetická.

Zdrojom môže byť akýkoľvek prokaryotický alebo eukaryotický organizmus, alebo akákoľvek rastlina, za predpokladu, že 5' hraničná sekvencia je funkčná, a môže byť aktivovaný systémom hostiteľskej bunky.

Začiatok replikácie je väčšinou súčasťou prokaryotických expresných vektorov, ktoré sú komerčne dostupné, a napomáha replikácii vektora v hostiteľskej bunke. Amplifikácia vektora v určitom počte kópií, môže byť v niektorých prípadoch dôležitá pre optimálnu expresiu "NATu". Akonáhle vybraný vektor neobsahuje začiatok replikácie, môže byť na základe známej sekvencie chemicky syntetizovaný a následne vložený do vektora.

Prvok konca transkripcie je typicky lokalizovaný na 3'konci polypeptidovej kódujúcej sekvencie a slúži k ukončeniu transkripcie mRNA. Terminačný prvok v prokaryotických bunkách je väčšinou G-C bohatý fragment nasledovaný polyT sekvenciou. Tento prvok je ľahko klonovateľný z knižnice alebo komerčne dostupný ako súčasť vektora, a tiež môže byť pripravený metódami syntézy nukleových kyselín.

Gén pre selekčný markér kóduje proteín nezbytný pre prežitie a rast hostiteľskej bunky na selektívnom kultivačnom médiu. Typický selekčný markérový gén kóduje proteíny, ktoré (a) prepožičiavajú rezistenciu na antibiotiká alebo na iné toxíny, napríklad, ampicilín, tetracyklín alebo kanamycín v prokaryotických hostiteľských bunkách, zeocín v kvasinkách a neomycín v cicavčích hostiteľských bunkách; (b) doplnok auxotrofickej deficiencie buniek; alebo (c) doplnok kritických živín nedostupných z komplexného média. Preferované selekčné markéry používané pri prokaryotickej expresii sú gény pre rezistenciu na kanamycín, ampicilín a tetracyklín.

Ribozomálny väzobný prvok, bežne nazývaný "Shine-Dalgarno" sekvencia (u prokaryotov) alebo "Kozak" sekvencia (pre eukaryoty), je nezbytný pre iniciáciu translácie mRNA. Tento prvok je typicky lokalizovaný na 3' konci od promótoru a na 5' konci od kódujúcej sekvencie polypeptidu, ktorý je syntetizovaný.

"Shine-Dalgarno" sekvencia je variabilná, ale typicky obsahuje polypurín (napr. vysoký obsah A-G). Mnoho "Shine-Dalgarno" sekvencií bolo identifikované, každá môže byť ľahko syntetizovaná pomocou metód, ktoré boli popísané a použité v prokaryotickom vektore.

"Kozak" sekvencia zahŕňa sekvencie bezprostredne pred a za iniciačným kodónom.

Preferovaná "Kozak" sekvencia je tá, ktorá je asociovaná s vysokou účinnosťou s iniciáciou translácie v AUG štart kodóne.

V tých prípadoch, kedy je žiadúce, aby NAT polypeptid bol

sekretovaný z hostiteľskej bunky, môže byť signálna sekvencia použitá k nasmerovaniu polypeptidu von z bunky, v ktorej bol syntetizovaný. Signálna sekvencia je umiestnená v kódujúcej oblasti sekvencie nukleovej kyseliny, alebo priamo na 5' konci kódujúcej oblasti. Veľa signálnych sekvencií bolo identifikované a akákoľvek z nich funguje vo vybranej hostiteľskej bunke a môžu tu byť použité. Teda, signálna sekvencia môže byť homológna alebo heterológna s polypeptidom.

Naviac signálna sekvencia môže byť chemicky syntetizovaná za použitia metód popísaných vyššie.

Keď je vektor skonštruovaný a nukleová kyselina bola vložená do správneho miesta vo vektore, celý vektor môže byť vložený do vhodnej hostiteľskej bunky a ďalej amplifikovaný a/alebo polypeptid exprimovaný.

Ako už bolo spomínané, hostiteľské bunky môžu byť prokaryotické (ako *E.coli*) alebo eukaryotické (ako kvasinkové bunky, alebo hmyzie alebo bunky stavovcov). Hostiteľská bunka, nech už je to kvasinka alebo iný hostiteľ, za vhodných podmienok môže syntetizovať NAT, ktorý môže byť neskôršie pozbieraný z kultivačného média (ako náhle je hostiteľskou bunkou sekretovaný do média), alebo priamo z hostiteľských buniek, ktoré ho produkujú (pokiaľ nie je sekretovaný). Po zberu NAT polypeptidu môže byť purifikovaný použitím metód, ako je molekulárna sieťová chromatografia, afinitná chromatografia a podobné.

Výber hostiteľskej bunky bude z veľkej miery závisieť od spôsobu, akým je bunka schopná zbaliť NAT do jeho natívnej sekundárnej a terciálnej štruktúry (napr. správna orientácia di-sulfidických mostíkov, apod.), tak aby bol biologicky aktívny. Napriek tomu, dokonca keď hostiteľská bunka

nesyntetizuje biologicky aktívny materiál, môže byť "zbalený" po syntéze za použitia vhodných chemických podmienok, takých, ktoré sú známe skúseným chemikom. V tomto prípade, môže byť správne "zbalenie" odvodené z faktu, že materiál je biologicky aktívny.

Vhodné hostiteľské bunky, alebo tkanivové kultúry môžu byť cicavčie bunky, ako napríklad bunky z vaječníka čínskeho škrečka (CHO-Chinese hamster ovary cells) alebo 3T3 bunky. Vhodné cicavčie hostiteľské bunky a metódy transformácie, kultivácie, množenia, screeningu, a výroby produktu a jeho purifikácie sú obecné známe.

Ďalšie vhodné cicavčie bunkové kultúry sú opičie COS-1 a COS-7 bunkové línie a CV-1 bunková línia. Ďalšie prípadné cicavčie hostiteľské bunky sú bunková línia primátov a hlodavcov, vrátane transformovaných bunkových línií. Vhodné sú tiež normálne diploidné bunky, bunkové druhy odvodené od *in vitro* kultivovaných primárnych tkanivových línií, rovnako ako primárne explantáty. Kandidátne bunky by mali byť genotypovo deficitné v selekčnom géne, alebo by mali obsahovať dominantne pôsobiaci selekčný gén.

Avšak aj ďalšie cicavčie bunkové línie je možné použiť, HeLa, myšacie L-929 bunky, 3T3 bunky odvodené od Swiss, Balb-c alebo NIH myšacích, BHK alebo HaK bunkové línie zo škrečka.

Užitočné sú tiež baktérie ako hostiteľské bunky. Napríklad rôzne druhy *E.Coli* (napr. HB101, DH5a, DH10 a MC1061) sú dobre známe ako hostiteľské bunky používané v biotechnológii.

Rôzne druhy *B.subtilis*, *Pseudomonas* druhy, iné druhy *Bacillus*, *Streptomyces* a im podobné môžu byť tiež použité. Navyše veľa druhov kvasinkových buniek je tiež použiteľných

ako hostiteľské bunky pre expresiu polypeptidu prezentovaného v tomto vynáleze. Tiež hmyzie bunky môžu byť použité ako hostiteľské bunky. Popísané napríklad v " Miller et al., Genetic Engineering,, Volume 8, strany 277-298 (1986).

Inzercia (tiež nazývaná ako transformácia alebo transfekcia) vektora do vybranej hostiteľskej bunky môže byť uskutočnená pomocou kalcium fosfátu, elektroporáciou, mikroinjekciou, lipofekciou alebo DEAEextránom.

Vybraná metóda musí funkčne korelovať s použitou hostiteľskou bunkou. Tieto a iné vhodné metódy sú známe skúseným chemikom a popísané hocikde (napr. v Sambrook et al.)

Hostiteľské bunky obsahujúci vektor môžu byť kultivované vo štandardnom médiu. Médium väčšinou obsahuje všetky nezbytné živiny pre rast a prežitie buniek.

Vhodné médiá pre kultiváciu *E.coli* sú napríklad Luria Broth (LB) a/alebo Terrific Broth (TB). Vhodné médiá pre kultiváciu eukaryotických buniek sú RPMI 1640, MEM, DMEM a všetky, ktoré môžu byť doplnené sérom a/alebo rastovými faktormi, ktoré sú nezbytné pre kultiváciu danej bunkovej línie. Vhodné médium pre kultiváciu hmyzích buniek je Graceovo médium doplnené, ak je to nezbytné, yestolátom, hydrolyzátom laktoalbumínu a/alebo fetálnym telacím sérom.

Antibiotiká alebo iné zlúčeniny používané pre selektívny rast transformovaných buniek môžu byť pridané ako doplnok do média. Zlúčenina, ktorá je použitá pre selekciu, je vybraná podľa selekčného markéra, ktorý je prítomný v plazmidu, ktorým bola hostiteľská bunka transformovaná. Napríklad, keď je selekčný markér rezistencie na kanamycín, tak sa kanamycín pridáva do kultivačného média.

Množstvo NATu vyprodukovaného hostiteľskou bunkou sa vyhodnocuje metódami bežne známymi.

Sú to metódy ako Western blot , SDS-polyakrylamidová gélová elektroforéza, nedenaturujúca gélová elektroforéza, HPLC, imunoprecipitácia, a/alebo stanovenie aktivity ako stanovenie gélového väzobného DNA posunu.

Akonáhle je NAT sekretovaný z hostiteľských buniek (okrem gram negatívnych baktérií), väčšina proteínu sa nachádza v médiu. Akonáhle je NAT sekretovaný z gram-negatívnych baktérií, určitá časť sa nájde v periplazme.

Akonáhle nie je NAT sekretovaný nachádza sa v cytoplazme.

V prípade intracelulárneho NATu sa bunky mechanicky rozbijú. Akonáhle je NAT lokalizovaný v periplazme, mechanické rozbitie alebo osmotická úprava môžu byť použité k uvoľneniu periplazmatického obsahu do pufrovaného roztoku. NAT je potom izolovaný priamo z roztoku. Vlastná izolácia z roztoku môže byť uskutočnená rôznymi technikami. Akonáhle je NAT syntetizovaný, tak obsahuje tzn. TAG , napr. hexa-histidín, alebo iný malý peptid buď karboxyl alebo amino koniec, v podstate môže byť purifikovaný v jednom kroku cez afinitnú kolónovú chromatografiu, kde náplň kolóny je vysoko afinitný k "TAGu" alebo priamo k polypeptidu (napr. monoklonálna protilátka).

Napríklad poly-histidín sa viaže s vysokou afinitou a špecificky k niklovej afinitnej kolóne (napr. Qiagen niklová kolóna), ktorá môže byť použitá k purifikácii (napríklad v Ausubel et al., editors, current Protocols in Molecular Biology).

Na druhej strane, aj keď polypeptid nemá "TAG", alebo nie je vhodná protilátka, iné dobre známe metódy purifikácie môžu byť použité. Sú to iónovymieňачová chromatografia, fázovo reverzná chromatografia, HPLC, natívna gélová elektroforéza v kombinácii s elúciou z gélu a preparatívna izoelektrická fokusácia ("Isoprime" prístroj/technika, Hoefer Scientific). V niektorých prípadoch dve alebo i viacej týchto technik môže byť skombinované, aby sa docielilo vyššej čistoty.

Pre produkciu NATu sa s výhodou používajú kvasinky, najvýhodnejší je druh *Pichia* (napr. *Pichia pastoris*), voči ich vyššej účinnosti pri zabaľovaní polypeptidu do pôvodnej štruktúry, v zrovnaní s bakteriálnymi bunkami, napr. *E.coli*. Vhodné rekombinantné metódy pre expresiu v kvasinkách sú popísané v Patente Spojených Štátov 4, 855, 231, (Stroman et al.), 4, 812, 405 (Lair et al.), 4, 818, 700 (Cregg et al.), 4, 885, 242 (Cregg), 4, 837, 148 (Cregg), ktoré sú začlenené vnútri referencií.

Pichia bunky môžu byť tiež použité na expresiu fibrolázy z DNA molekúl, ktoré kódujú túto metaloproteinázu s rovnakou efektivitou a takáto metóda predstavuje ďalšie hľadisko predkladaného vynálezu.

Fibroláza je známa metaloproteináza, ktorá bola popísaná vo vedeckej a patentovej literatúre, vid'. Randolph et al., a Európska patentová žiadosť č. 0 323 722, citovaná vyššie. Väčšinou je exprimovaná fibroláza o SEQ ID NO: 5, ktorá je kódovaná cDNA molekulou SEQ ID NO: 6 (alebo variantmi, ktoré kódujú rovnakú aminokyselinovú sekvenciu). Expresia fibrolázy v takom to systéme väčšinou navyše, okrem maturovaného polypeptidu (nukleotidy 784-1392), zahrnuje DNA molekulu o SEQ ID NO: 7, ktorá kóduje "prepo" sekvenciu (nukleotidy 1-783).

Chemicky modifikované varianty NATu, v ktorých je polypeptid naviazaný na polymér alebo inú molekulu, aby vytvoril derivát, preto aby modifikoval vlastnosti, sú tiež zahrnuté v rámci tohto predkladaného vynálezu.

Výhodné, hlavne pre ľudské liečebné účely, je derivatizovať NAT tak, že je pripojená jedna alebo viacej chemických molekúl na molekulu polypeptidu. Tieto molekuly môžu byť rôzne vo vode rozpustné polyméry. Polymér musí byť vo vode rozpustný, pretože NAT, ku ktorému je pripojený vo vode, ako vo fyziologickom prostredí rozpustný. Vo vode rozpustné polyméry môžu byť vybrané zo skupín, ktoré zostávajú, napríklad, z polyetylén-glykolu, kopolymérov etylén-glykol/propylén-glykolu, karboxy-metyl-celulózy, dextránu, polyvinyl-alkoholu, polyvinyl pyrrolidónu, poly-1,3-dioxalánu, poly-1,3,6-trioxánu, etylén/anhydridu kyseliny maleínovej kopolyméru polyamino kyseliny (buď homopolyméry, alebo náhodné či nenáhodné kopolyméry (viď. Ďalej u fúzných molekúl) a dextránu alebo poly (n-vinylpyrrolidón)polyetylén-glykolu, homopolymérov polypropylénglykolu, kopolymérov polypropylénu oxid/etylén oxidu, polyoxyetylovaných polyolov, polystyrén-maleátu a polyvinyl-alkoholu.

Polyetylén-glykol-propión-aldehyd je vhodný pre priemyslovú výrobu vďaka svojej stabilite vo vode.

Polymér môže mať akúkoľvek molekulárnu hmotnosť a môže byť rozvetvený alebo nerozvetvený. Pre polyetylén glykol je preferovaná molekulárna hmotnosť medzi 2 kilodaltonmi (kDa) a okolo 100 kDa (termín "okolo" znamená, že pri príprave polyetylénglykolu niektoré molekuly viažu viacej, iné o niečo menej ako je stanovená molekulárna hmotnosť), čo uľahčí zachádzanie a priemyslovú výrobu. Iné veľkosti môžu byť

použité v závislosti od žiadaného terapeutického profilu (napr. požadovaná dĺžka doby uvoľňovania, účinky na biologickú aktivitu, akonáhle sú nejaké, uľahčenie manipulácie, stupeň, alebo nedostatok antigenicity alebo iných známych efektov polyetylén glykolu na terapeutický proteín.

Počet pripojených molekúl polyméru môže byť rôzny a skúsený chemik je schopný zistiť účinok na funkciu. Môže byť použitá derivatizácia, ako mono-, tak aj di-, tri-, tetra- alebo aj kombinovaná, s rovnakou alebo inou chemickou molekulou (napr. polymérom o inej molekulovej hmotnosti, ako je polyetylén glykol).

Pomer molekúl polyméru a molekúl NAT polypeptidu kolísá, rovnako ako kolísá ich koncentrácia v reakčnej zmesi. Obecne, je optimálny pomer (vo zmysle efektivity reakcie tu nie je prebytok nezreagovaného polypeptidu alebo polyméru) určený faktormi ako je požadovaný stupeň derivatizácie (napr. mono-, di-, tri-, atď.), molekulárna hmotnosť vybraného polyméru, akonáhle je polymér rozvetvený či nie a reakčné podmienky.

Chemické skupiny by mali byť pripojené k NAT s ohľadom na ich účinok na funkciu alebo antigénne domény polypeptidu. Jestvuje veľký počet metód pre vytvorenie väzby, napríklad vid', E- 0401 384 (spojenie PEG k G-CSF) a Malik et al., Experimental Hematology, Volume 20, strany 1028-1035 (1992) (popisujúce "pegyláciu GM-CSF pomocou chloridu tresylového). Pre ilustráciu, polyetylén glykol môže byť kovalentne naviazaný cez reaktívne skupiny aminokyselinových zvyškov, ako voľná amino alebo karboxylová skupina. Reaktívne skupiny sú tie, ku ktorým sa aktivovaná molekula polyetylén glykolu (alebo iné chemické skupiny) môže viazať.

Aminokyselinové zvyšky, ktoré majú voľné aminoskupiny môžu obsahovať lyzínové zvyšky a N-koncový aminokyselinový zvyšok.

Tie ktoré majú voľné karboxylové skupiny, môžu obsahovať zvyšky kyseliny asparágovej a glutámovej a C-koncový aminokyselinový zvyšok. Sulfohydrylové skupiny môžu byť tiež použité ako reaktívne skupiny pre väzbu molekuly polyetylén-glykolu alebo iných chemických skupín. V priemyslovej výrobe je preferovaná väzba aminokyseliny ako je N-koniec alebo lyzínová skupina.

Je potreba sa vyvarovať väzby na reaktívne skupiny, ktoré sú dôležité pre väzbu receptora, akonáhle je naviazanie na receptor požadované.

N-koncová chemicky modifikovaná derivatizácia môže byť tiež požadovaná. Pre ilustráciu, rôzne molekuly polyetylén-glykolu môžu byť vybrané (podľa molekulovej hmotnosti, rozvetvenia, atď.), rôzny pomer molekúl polyetylén-glykolu s molekulou polypeptidu v reakčnej zmesi, typy "pegylácia" a metódy pre získanie vybraného N-koncového pegylatovaného NATu.

Metódou k získaniu pegylatovaného N-konca (napr. akonáhle je nezbytné oddelenie týchto zlúčenín od iných monopegylatovaných molekúl) môže byť purifikácia N-koncovo pegylatovaného materiálu z populácie pegylatovaných NAT molekúl. Selektívna N-koncová chemická modifikácia môže byť dosiahnutá pomocou redukujúcej alkylácie, ktorá využíva rozdielne reaktivity rôznych typov primárnych amino skupín (lyzín verzus N-koniec), ktoré sú k dispozícii pre derivatizácii. Vid' PCT žiadosť WO 96/11953, publikovanej 25. augusta 1996.

Za vhodných reakčných podmienok je dosiahnutá podstatne selektívna derivatizácia NATu na N-konci s karboxylovou skupinou, ktorá obsahuje polymér. Napríklad sa môže použiť selektívna N-koncová pegylácia NATu pri pH, ktoré potom zvyhodňuje rozdiely medzi ϵ -amino skupiny lyzínových zvyškov a α -amino skupiny N-konca polypeptidu. Vďaka tejto selektívnej derivatizácii je pripojenie polyméru k polypeptidu kontrolované: konjugácia s polymérom sa uskutočňuje predvážne na N-konci polypeptidu a nevyskytuje sa žiadna významná modifikácia iných reaktívnych skupín, ako je postranný reťazec amino skupín lyzínu. Pri použití redukujúcej alkylácie môže byť použitie akýkoľvek z polymérov popísaných vyššie, a mal by mať jedinou reaktívnu aldehydovú skupinu pre spojenie s polypeptidom.

Polyetylénglykol propionaldehyd, obsahujúci jediné reaktívny aldehyd, môže byť použitý.

NAT alebo chemicky modifikované deriváty v súhlase s vynálezom môžu byť navrhnuté k *in vivo* aplikácii, najlepšie cez intratrombus. (napr. cez lokalizované podanie priamo na miesto zrazeniny v cieve, napr. cez katéter). Systémové podávanie nie je bežne preferované, voči pravdepodobnosti, že prirodzený α_2 makroglobulín v celkovom krvnom obehu môže vytvoriť komplex s NAT, a tak zabráni interakcii s fibrínom alebo fibrinogénom a zníži rozpustenie zrazeniny. Hoci môžu byť prípady, kedy väčšie množstvo NATu môže byť aplikované, čo prevýši krvné hladiny α_2 makroglobulínu, a teda umožní systémové podávanie.

Obecne, v rámci vynálezu farmaceutická zlúčenina zahŕňa efektívne množstvo NATu spoločne s farmaceuticky prijateľnými riedidlami, konzervačnými činidlami, rozpúšťadlami, emulgátormi, adjuvans, a/alebo nosičmi. "Efektívnym množstvom"

je spomínané množstvo dostatočné k produkcii merateľného biologického vplyvu (napr. trombolyticky efektívne množstvo, ktoré spôsobí rozpustenie krvnej zrazeniny alebo vznikajúcej zrazeniny , lieči).

Typicky, NAT je vo vysoko purifikovanej forme a akákoľvek farmaceutická zlúčenina, ktorá bude použitá ako spojivo, bude pred použitím normálne sterilizovaná, napr. filtráciou cez sterilné filtračné membrány.

Skúsený farmaceut bude schopný zistiť efektívne dávky podávaním a pozorovaním požadovaného terapeutického vplyvu. Určité vplyvy dávok budú závisieť od danej choroby alebo stavu, ktorý bude liečený, rovnako ako od veku a od celkového zdravotného stavu príjemca a ktorý môže byť určený štandardnými klinickými postupmi.

Kde je to možné, bude vhodné stanoviť krivku farmaceutického zloženia odozvy na dávku, najskôr *in vitro* - ako bio-test a potom vo vhodnom zvieracom modeli (*in vivo*), pred tým, ako sa začne s testovaním na ľuďoch. Skúsený praktický lekár, po zvážení liečebných súvislostí, typu liečenej choroby a iných vhodných faktorov bude schopný zistiť správne dávkovanie bez prílišného úsilia. Typicky, praktický lekár bude podávať zlúčeninu NAT dokiaľ nebude dosiahnuté dávky, ktorá spôsobí požadovaný efekt (napr. rozpustenie krvnej zrazeniny). Zlúčenina môže byť podávaná ako jednorázová dávka, alebo vo dvoch a viacej dávkach (ktoré môžu ale nemusia obsahovať rovnaké množstvo polypeptidov) v určitých časoch, alebo kontinuálne.

NAT môže byť tiež použitý pre prípravu protilátok podľa štandardných metód. Protilátky môžu byť polyklonálne, monoklonálne, rekombinantné, chimérické, jednoreťazcové

a/alebo bi-špecifické, apod. Aby sa vylepšila pravdepodobnosť produkcie imunitnej odpovedi, aminokyselinová sekvencia NATu môže byť analyzovaná, aby sa určila časť molekuly, ktorá by mohla byť spojená so zvýšenou imunogenitou. Napríklad, aminokyselinová sekvencia môže byť podrobená počítačovej analýze, aby sa určili povrchové epitopy, podľa metód Hopa a Wooda, v Proceedings of the National Academy of Science USA, Volume 78, strany 3824-3828 (1981).

Rôzne známe postupy môžu byť použité pre produkciu polyklonálnych protilátok, ktoré rozoznajú epitopy NATu. Ako hostiteľ na produkciu protilátky môžu byť imunizované rôzne zvieratá (bez obmedzenia králiky, myši, krysy, atď.)

Rôzne adjuvans môžu byť použité k zvýšeniu imunologickej odpovedi, v závislosti od hostiteľského druhu, vrátane a bez obmedzenia Freundovo adjuvans, minerálne gély ako je hydroxid hlinitý, (alum), povrchovo aktívne látky, ako je lyzolecitín, plurónové polyoly, polyanióny, peptidy, olejové emulzie, hemocyanín z prílipky, dinitrofenol a potencionálne užitočné ľudské adjuvans, ako je *Bacillus Calmette-Guerin* a *Corynebacterium parvum*.

Pre prípravu monoklonálnych protilátok účinných na NAT môže byť použitá akákoľvek technika, ktorá umožňuje prípravu molekúl protilátky v bunkovej línii. Napríklad, hybridómová metóda, pôvodne vyvinutá Kohlerom a Milsteinom, ktorá je popísaná v Nature, Volume 256, strany 495-497 (1975), rovnako ako trióma technika, metodika hybridómov ľudských B-buniek popísaná Kozborom et al., v Immunology Today, Volume 4, strana 72 (1983) a EBV-hybridómová metodika produkcie monoklonálnych protilátok popísaná Coleom et al. v "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss, Inc., strany 77-96

(1985). Všetky tieto metódy sú použiteľné pre prípravu monoklonálnych protilátok v súlade s týmto vynálezom.

Protilátky tohto vynálezu môžu byť použité k liečebným účelom, ako je väzba a tým neutralizácia alebo inhibícia prebytočného množstva NATu in vivo po podaní. Protilátky môžu byť ďalej použité k diagnostickým účelom, ako treba v označenej forme k detekcii prítomnosti NATu v telových tekutinách, vzorkách tkaniva alebo iných extraktoch, v súhlase so známymi diagnostickými metódami.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Ďalej je vynález ilustrovaný nasledujúcimi príkladmi.

Príklad 1

Odvodenie sekvencie NATu

Efektívny spôsob výroby fibrolázy je exprimovať ju ako prefibrolázu, ktorá je štiepatelná proteázou kex-2 na "prepo" a "maturovanú" časť. (Získa sa biologicky aktívny materiál ("maturovaná" fibroláza)).

V tomto usporiadaní, vedie syntéza a procesovanie prefibrolázy k sekrecii maturovanej fibrolázy do kultivačného média. Skutočná sekvencia v štiepatelnom mieste je (...TKR|QQRF...) .

Kex-2 je endoproteáza, ktorá štiepi za dvomi susednými bázičnými aminokyselinami, v tomto prípade lyzínom (K)-arginínom (R). Zrelá fibroláza exprimovaná z DNA má, už vyššie

spomínaný, N-koncový glutamín (Q), ktorý bol pozmenený deamináciou a cyklizáciou na pyroglutamovú kyselinu (E). Táto chemická modifikácia bola považovaná za nežiadúcu, pretože peptidy s N-koncovým cyklickým glutamínom (pyroglutamová kyselina) zlyhávali pri reakcii v Edmanovom odbúravaní - aminokyselinovom sekvenovaní. Teda boli oba glutamíny (Q) na N-konci v sekvencii zrelej fibrolázy odstránené, a N-koncom sa stal arginín (R). Pretože kex-2 štiepi po dvoch susedných bázických aminokyselinách, ako bolo spomínané, očakávalo sa, že sekvencia (...KRRF...), ukáže nejednoznačné miesto pre štiepenie kex-2.

Preto bol N-koncový arginín (R) (podčiarknutý) nahradený serínom (S) s výslednou sekvenciou (...KRSF...). Serín bol vybraný na základe potreby vloženia aminokyseliny, ktorá uľahčí štiepenie kex-2, keď sa vyskytne na C-konci miesta hydrolýzi. Rholam et al., European Journal of biochemistry, Volume 227, strany 707-714 (1995).

DNA sekvencia preprofibrolázy bola modifikovaná metódou cielenej mutagenézy na N-konci kódujúcej sekvencie maturovanej fibrolázy, tak aby sa nahradil kodón pre "QQR" kodónom pre "S", použitím štandardného PCR protokolu. Výsledkom je prepoNAT o aminokyselinovej sekvencii SEQ ID NO:3. Oligonukleotidy použité ako priméry pre PCR reakcie sú spísané ďalej a ich homológia s cieľovou sekvenciou je tiež naznačená. Na začiatku boli uskutočnené 2 PCR reakcie za použitia oligonukleotidov 1 a 4 v jednom páre a oligonukleotidy 2 a 3 v druhom páre primérov. Templátom bola DNA. PCR produkty týchto reakcií (601 a 815 nukleotidov dlhé) boli následne prečistené pomocou agarózovej gélovej elektroforézy a ďalej slúžili ako templát pre druhé kolo PCR za použitia oligonukleotidov 1 a 2 ako primérov. Tento konečný PCR produkt (1372 nukleotidov dlhý) bol štiepený reštrikčnými endonukleázami *XhoI* a *NotI*.

Rozštiepená zmes bola zbavená proteínu pomocou fenol/chloroformu a DNA vyzrážaná. Časť tejto znovu získanej DNA bola vložená do plazmidu pPICZ α (Invitrogen, Carlsbad, CA, Katalógové č. VI95-20), ktorý bol zhodne naštiepený reštrikčnými endonukleázami *XhoI* a *NotI*, enzymaticky defosforylovaný a zbavený proteínu fenol/chloroformom.

Všetky ďalšie kroky boli uskutočnené podľa príručky Expresného Kitu- Invitrogen Pichia (Invitrogen Corp., katalógové č. K1710-01). Produkty ligačnej reakcie boli transformované do *E.coli* pomocou elektroporácie a tie selektované na pevnom médiu s zeocínom. Plazmid bol vyizolovaný a sekvencia prefibrolázy bola overená DNA sekvenovaním. Plazmid bol linearizovaný štiepením reštrikčnou endonukleázou *PmeI* a ďalej transformovaný do *Pichia pastoris* G5115 his^+ . Rod GS115 je bežne his^- , his^+ genotyp bol obnovený transformáciou DNA, ktorá kóduje divokú (wild-type) verziu génu *his4*. Alternatívne môže byť his^+ druh získaný komerčne od Invitrogenu (X-33 tkanivová kultúra, katalógové č. C180-00). Úspešne integrované komplexy boli selektované ako kolónia rezistentná na zeocín. Kandidátne klony boli indukované kultivačným médiom, ktoré obsahovali metanol a kultúra bola testovaná na produkciu NATu na 4- 20 % PAGE, farbením Coomassie.

Pre cielenú PCR mutagenézu boli použité nasledujúce oligonukleotidy:

Oligo 1 5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3' (SEQ ID NO: 8)

Oligo 2 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3' (SEQ ID NO: 9)

Oligo 3 (SEQ ID NO: 10)

5'-TCCAATTAACTTGACTAAGAGTCTTCCCACAAAGATACGTAC-3'

Oligo 4 (SEQ ID NO: 11)

5'-GTACGTATCTTTGTGGGAAAGATCTCTTAGTCAAGTTTAATTGG-3'

Umiestnenie týchto oligonukleotidov je naznačené nižšie na dvojvláknovej sekvencii DNA (SEQ ID NO: 12 kódujúcej čiže sens vlákno, SEQ ID NO: 13, komplementárne čiže antisens vlákno) a korešpondujúca aminokyselinová sekvencia (SEQ ID NO:14) fibrolázy (vrátane prepo úseku). N-koncové a C-koncovej oblasti maturovanej fibrolázy sú označené podčiarknutím koncovej aminokyselinovej sekvencie (QQRF a LNKP). N-koncová oblasť (QQRF) je modifikovaná (nahradenie S za QQF). V oligonukleotidoch 3 a 4, značí vložené pomlčky miesto, kde boli vynechané kodóny kódujúce aminokyseliny QQ na N-konci fibrolázy.

ATGAGATTTCCTTCAATTTTACTGCTGTTTTATTGCGAGCATCCTCCGCATTAGCTGCT

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TACTCTAAAGGAAGTTAAAAATGACGACAAAATAAGCGTCGTAGGAGGCCGTAATCGACGA

M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A

CCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGT

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGTCAGTTGTGATGTTGCTTCTACTTTGCCGTGTTAAGGCCGACTTCGACAGTAGCCA

P V N T T T E D E T A Q I P A E A V I G

TACTCAGATTTAGAAGGGGATTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAAT

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATGAGTCTAAATCTTCCCCTAAAGCTACAACGACAAAACGGTAAAAGGTTGTCGTGTTTA

Y S D L E G D F D V A V L P F S N S T N

Oligo 1 5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3'

AACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTA

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTGCCCAATAACAAATATTTATGATGATAACGGTCGTAACGACGATTTCTTCTCCCAT

N G L L F I N T T I A S I A A K E E G V

XhoI

TCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTTCTTCTATTATCTTGAATCTGGTAACGTTAAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGAGAGCTCTTTTCTCTCCGACTTCGAAGAAGATAATAGAACCTTAGACCATTGCAATTG

S L E K R E A E A S S I I L E S G N V N

GATTACGAAGTTGTTTATCCAAGAAAGGTCACTCCAGTTCCTAGGGGTGCTGTTCAACCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTAATGCTTCAACAAATAGGTTCTTTCCAGTGAGGTCAAGGATCCCCACGACAAGTTGGT

D Y E V V Y P R K V T P V P R G A V Q P

AAGTACGAAGATGCCATGCAATACGAATTCAAGGTTAACAGTGAACCAGTTGTCTTGCAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTCATGCTTCTACGGTACGTTATGCTTAAGTTCCAATTGTCACTTGGTCAACAGAACGTG

K Y E D A M Q Y E F K V N S E . P V V L H

TTGGAAAAAACAAGGTTTGTCTCTGAAGATTACTCTGAAACTCATTACTCCCCAGAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AACCTTTTTTTGTTTCCAAACAAGAGACTTCTAATGAGACTTTGAGTAATGAGGGGTCTA

L E K N K G L F S E D Y S E T H Y S P D

GGTAGAGAAATTACTACTTACCCATTGGGTGAAGATCACTGTTAETACCATGGTAGAATC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCATCTCTTTAATGATGAATGGGTAACCCACTTCTAGTGACAATGATGGTACCATCTTAG

G R E I T T Y P L G E D H C Y Y H G R I

GAAACGATGCTGACTCCACTGCTTCTATCTCTGCTTGTAACGGTTTGAAGGGTCATTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTTTTGCTACGACTGAGGTGACGAAGATAGAGACGAACATTGCCAACTTCCCAGTAAAG

E N D A D S T A S I S A C N G L K G H F

AAGTTGCAAGGTGAAATGTACTTGATTGAACCATTGGAATTGTCCGACTCTGAAGCCCAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTCAACGTTCCACTTTACATGAACTAACTTGTAACCTTAACAGGCTGAGACTTCGGGTA

K L Q G E M Y L I E P L E L S D S E A H

GCTGTCTACAAGTACGAAAACGTCGAAAAGGAAGATGAAGCCCCAAAGATGTGTGGTGT

CGACAGATGTTTCATGCTTTTGCAGCTTTTCCTTCTACTTCGGGGTTTCTACACACCACAA

A V Y K Y E N V E K E D E A P K M C G V

Oligo 3 5'-TCCAATTAACTTGACTAAG

ACCCAAAAC TGGGAATCATATGAACCAATCAAGAAGGCCTTCCAATTAAACTTGACTAAG

TGGGTTTTGACCCTTAGTATACTTGGTTAGTTCCTTCCGGAAGGTTAATTTGAAC TGATTC

Oligo 4 3'-GGTTAATTTGAACTGATTC

T Q N W E S Y E P I K K A F Q L N L T K

AGA-----TCTTCCCAAAAGATACGTAC-3'

AGACAACAAAGATTCCCACAAAGATACGTACAGCTGGTTATCGTTGCTGACCACCGTATG

TCTGTTGTTTCTAAGGGTGTTTCTATGCATGTCGACCAATAGCAACGACTGGTGGCATACT

TCT-----AGAAAGGGTGTTTCTATGCATG-5'

R O O R F P Q R Y V Q L V I V A D H R M

AACACTAAATACAACGGTGACTCTGACAAATCCGTCAATGGGTGCACCAATCGTCAAC

TTGTGATTTATGTTGCCACTGAGACTGTTTTAGGCAGTTACCCACGTGGTTTAGCAGTTG

N T K Y N G D S D K I R Q W V H Q I V N

ACCATTAACGAAATCTACAGACCACTGAACATCCAATTCACCTTTGGTTGGTTTGGAATC

TGGTAATTGCTTTAGATGCTCTGGTGACTTGTAGGTTAAGTGAAACCAACCAACCTTTAG

T I N E I Y R P L N I Q F T L V G L E I

TGGTCCAACCAAGATTGATCACCGTTACTTCTGTATCCCACGACACTCTGGCATCCTTC

ACCAGGTTGGTTCTAAACTAGTGCCAATGAAGACATAGGGTGCTGTGAGACCGTAGGAAG

W S N O D L I T V T S V S H D T L A S F

GGTAACTGGCGTGAAACCGACCTGCTGCGTCGCCAACGTCATGATAACGCTCAACTGCTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCATTGACCGCACTTTGGCTGGACGACGCAGCGGTTGCAGTACTATTGCCAGTTGACGAC

G N W R E T D L L R R Q R H D N A Q L L

ACCGCTATCGACTTCGACGGTGATACTGTTGGTCTGGCTTACGTTGGTGGCATGTGTCAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGGCGATAGCTGAAGCTGCCACTATGACAACCAGACCGAATGCAACCACCGTACACAGTT

T A I D F D G D T V G L A Y V G G M C Q

CTGAAACATTCTACTGGTGTTATCCAGGACCACTCCGCTATTAACCTGCTGGTTGCTCTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GACTTTGTAAGATGACCACAATAGGTCCTGGTGAGGCGATAATTGGACGACCAACGAGAC

L K H S T G V I Q D H S A I N L L V A L

ACCATGGCACACGAACTGGGTCATAACCTGGGTATGAACCACGATGGCAACCAGTGTCAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGGTACCGTGTGCTTGACCCAGTATTGGACCCATACTTGGTGCTACCGTTGGTCACAGTG

T M A H E L G H N L G M N H D G N Q C H

TGCGGTGCAAACTCCTGTGTTATGGCTGCTATGCTGTCCGATCAACCATCCAAACTGTTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACGCCACGTTTGAGGACACAATACCGACGATACGACAGGCTAGTTGGTAGGTTTGACAAG

C G A N S C V M A A M L S D Q P S K L F

TCCGACTGCTCTAAGAAAGACTACCAGACCTTCCTGACCGTTAACAACCCGAGTGATC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGGCTGACGAGATTCTTTCTGATGGTCTGGAAGGACTGGCAATTGTTGGGCGTCACATAG

S D C S K K D Y Q T F L T V N N P Q C I

NotI

CTGAACAAACCGTAAGCGGCCGCCAGCTTTCTAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GACTTGTGTTGGCATTGCGCGGCGGTCGAAAGATCTTGTTTTTGAGTAGAGTCTTCTCCTA

L N K P * A A A S F L E Q K L I S E E D

CTGAATAGCGCGGTCGACCATCATCATCATCATCATTGAGTTTGTAGCCTTAGACATGAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GACTTATCGCGGCAGCTGGTAGTAGTAGTAGTAGTAAGTCAAACATCGGAATCTGTACTG

L N S A V D H H H H H * V C S L R H D

TGTTCCCTCAGTTCAAGTTGGGCACTTACGAGAAGACCGGTCTTGCTAGATTCTAATCAAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACAAGGAGTCAAGTTCAACCCGTGAATGCTCTTCTGGCCAGAACGATCTAAGATTAGTTC

C S S V Q V G H L R E D R S C * I L I K

AGGATGTCAGAATGCCATTTGCCTGAGAGATGCAGGCTTCATTTTGTACTTTTTTATT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCCTACAGTCTTACGGTAAACGGACTCTCTACGTCCGAAGTAAAACTATGAAAAATAA
CCTACAGTCTTACGGTAAACG-5' Oligo 2

R M S E C H L P E R C R L H F * Y F F I -

Príklad 2*Expresia NATu v Pichia pastoris*

Pri pokusoch exprimovať DNA NATu v *E.coli*, veľmi slabé zbalenie do sekundárnej štruktúry a požiadavka na zriedené podmienky znížili efektivitu purifikácie. Tieto a iné úvahy viedli k použitiu druhu kvasiniek *Pichia pastoris* ako hostiteľskej bunky. Kultúra selektovaných bunkových klonov *Pichia pastoris*, ktoré boli transfekované cDNA prepo NATu (SEQ ID NO: 4) bola inokulovaná do 500 ml inokulačného rastového média, popísaného tu:

Na 1 liter média

Kvasničný extrakt	30,0 g
Fosforečnan draselný dihydrát	17,2 g
Glukóza	20,0 g
Biotín	0,004 g
Voda	do 1 litra
Fosforečná kyselina, 85%	upraviť pH na 6,00

Transfekované *P.pastoris* boli inkubované v 30°C v trepačke po dobu 30-32 hodín. Približne 1% (hmotnostné) výslednej kultúry bolo použité ako inokulum do 10-ti litrového fermentora. Fermentor obsahoval sterilné základné soli a glukózu (nižšie). Dvanásť mililitrov na liter PTM4 solí (PTM4 je roztok stopových kovov obsahujúci síran meďný pentahydrát, jodid sodný, síran horečnatý monohydrát, molybdénan sodný dihydrát, kyselinu boritú, chlorid kobaltnatý hexahydrát, chlorid zinočnatý, síran železnatý heptahydrát, d-biotín, kyselinu sírovú a purifikovanú vodu) bolo pridané do litrovej

dávky média po sterilizácii fermentora. Rastová teplota vo fermentore bola 30°C. pH vo fermentore bolo regulované hydroxidom amónnym a kyselinou fosforečnou na hodnotu 6.00. Zinok zo zinočnatých solí, ktoré boli pridané do média boli inkorporované do NATu ako súčasť štruktúry metaloproteinázy.

Základne soli na litrovú dávku média

Fosforečná kyselina, 85%	26,7 ml
Síran vápenatý	0,93 g
Síran draselný	18,2 g
Síran horečnatý-7 H ₂ O	14,9 g
Hydroxid draselný	4,13 g
Glukóza	30,0 g
Voda	do 1 litra

Kultúra sa nechá rásť, dokiaľ nie je všetka glukóza spotrebovaná (17 až 20 hodín). Potom sa začne so "sýtiacou" fázou. "Sýtiace" médium je tvorené glukózou a 12 ml PTM4 solí na 1 liter. Indukcia sýtenia sa zostáva z glukózy, 25% metanolu, a 12 ml PTM4 solí na 1 liter. Pri indukcii je teplota reaktora 20°C. Indukčná fáza trvá 60 až 75 hodín. Upravené médiá boli odpratane a bunkové zvyšky boli vyhodnené.

Príklad 3

Purifikácia NATu z *Pichia pastoris*

Kvasinková živná pôda z Príkladu 2 bola vyčistená a upravené pH na 6,5 a vodivosť 10-20mS/ cm. Živná pôda bola naliata na imobilizovanú kovovú afinitnú živicu, ktorá bola naplnená meďou a ekvilibrovaná fosfátovým pufrom (PBS). Živica bola opláchnutá v PBS a vymývaná gradientom imidazolu (0-100

mM) v PBS. Frakcie, ktoré obsahovali maturovaný NAT (SEQ ID NO:1) boli dané napospol a riedené dokiaľ vodivosť nebola nižšia ako 1,5 mS/cm, pH 6,9. Riedená vzorka bola naliata na SP Sefarózovú živicu (Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ), ktorá bola ekvilibrovaná 10 mM 2-(N-morfolino)etán-sírovou kyselinou (MES). Kolóna bola omytá pomocou MES a eluovaná a vymytá pomocou gradientu NaCl (0-500mM) v MES. Frakcie, ktoré obsahovali NAT boli dané dohromady a uschované.

Príklad 4

Trombolýza v akútnej trombóze v krysej krčnici, porovnanie NATu s Urokinázou

Aby sa preukázala biologická aktivita a funkčná jednoznačnosť maturovaného NATu (SEQ ID NO:1) boli uskutočnené farmakologické štúdie na krysiach. Anódovým prúdom bolo vytvorené ohniskové poškodenie na jednej krčnici. Toto poškodenie vyvolalo do 15 minút vytvorenie okluzívnej krvnej zrazeniny. Po vytvorení trombu, bola tepna ešte po 30 minút pozorovaná, či je oklúzia krčnice stabilná. Potom bol aplikovaný intravenózne heparín a aspirín, aby sa predišlo šíreniu trombu. Zvieratá boli liečené pomocou intraarteriálnych infúzií testovanej látky. Bol sledovaný prietok krvi krčnicou počas podávania testovaného materiálu, takže úspešné rozpustenie krvnej zrazeniny mohlo byť detekované a tiež mohol byť zaznamenaný čas lýzy. Percentá pokusov, kedy bola zrazenina rozpustená boli zaznamenané a vyrátaný priemer iba u tých, kde bola zrazenina úspešne rozpustená. Pretože je meraný hemoragický potenciál testovanej látky, všetka krv, ktorá bola vylúčená z operačného miesta bola zbieraná gázovými tampónmi. Tampóny boli umiestnené do

roztoku detergentu, aby sa rozpustili červené krvinky a množstvo uvoľneného hemoglobínu bolo potom merané spektrofotometricky. Podľa množstva vysušeného hemoglobínu boli vyrátané straty krvi. Dáta získané v testoch sú uvedené v tabuľke ďalej.

Tabuľka 1

Výskyt lýzy krvnej zrazeniny, čas za ktorý došlo k rozpusteniu zrazeniny a operačné straty krvi (priemer $\pm$ štandardná odchýlka)

	VÝSKYT LÝZY (%)	ČAS (min)	KRVNÉ STRATY (ml)
FYZIOLOGICKÝ ROZTOK (n=6)	0% (0 zo 6)	NEMERANÉ	0,10 $\pm$ 0,23
Urokináza 25 U/ min (n=15)	33% (5 z 15)	55,3 $\pm$ 15,9	1,06 $\pm$ 1,59
Urokináza 250 U/ml (n=15)	86 % (13 z 15)	33,5 $\pm$ 15,3	1,43 $\pm$ 1,45
NAT 2mg (n=14)	78% (11 zo 14)	6,3 $\pm$ 5,8	0,96 $\pm$ 0,77

Tieto štúdie preukazujú, že NAT je biologicky aktívny na zvieracom modeli v *in vivo* lýze krvnej zrazeniny.

Ďalej, rozpustenie krvnej zrazeniny bolo dosiahnuté v značne kratšom čase a s menšími stratami krvi z operačného miesta, v porovnaní s urokinázou. Tak profil aktivity NATu môže byť odlišený od triedy plazminogén - aktivátorov trombolytických činiteľov (reprezentovaných urokinázou), takže rozpustenie krvnej zrazeniny NATom sa uskutoční rýchlejšie a so zníženými hemoragickými komplikáciami.

Fibrinolytická aktivita NATu je zrovnateľná s firolázou. A navyše, ako bolo spomínané vyššie, stabilita N-konca NATu vedie k väčšej homogenite. koncového produktu pri rekombinantnej expresii, čo je nesporná výhoda (napr. N-koniec sa v čase nemení na zmes rôznych foriem, čo vytvára stabilnejší polypeptid).

Obrázok 1

MRFPSIFTAV LFAASSALAA PVNTTTEDET AQIPAEAVIG
YSDLEGDFDV AVLPFSNSTN NGLLFINTTI ASIAAKEEGV
SLEKREAEAS SIILESGNVN DYEVVYPRKV TPVPRGAVOP
KYEDAMOYEF KVNSEPVVLH LEKNKGLFSE DYSETHYSPD
GREITTYPLG EDHCYYHGRI ENDADSTASI SACNGLKGHF
KLOGEMYLIE PLELSDSEAH AVYKYENVEK EDEAPKMCGV
TONWESYEPI KKAFOLNLTK RSFPQRYVQL VIVADHRMNT
KYNGDSDKIR QWVHQIVNTI NEIYRPLNIQ FTLVGLEIWS
NQDLITVTSV SHDTLASFGN WRETDLLRRQ RHDNAQLLTA
IDFDGDTVGL AYVGGMCQLK HSTGVIQDHS AINLLVALTM
AHELGHNLGM NHDGNQCHCG ANSCVMAAML SDQPSKLFSD
CSKKDYQTFL TVNNPQCILN KP

Zoznam sekvencií

<110> Boone, Thomas C.

Li, Huimin

Mann, Michael B.

<120> Fybrinolyticky aktívny polypeptid

<130> A-596

<140> 09/411,329

<141> 1999-10-01

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 201

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: NAT (analóg fibrolázy z Agkistrodon contortrix)

<400> 1

Ser	Phe	Pro	Gln	Arg	Tyr	Val	Gln	Leu	Val	Ile	Val	Ala	Asp	His	Arg
1				5					10					15	

Met	Asn	Thr	Lys	Tyr	Asn	Gly	Asp	Ser	Asp	Lys	Ile	Arg	Gln	Trp	Val
			20					25					30		

His	Gln	Ile	Val	Asn	Thr	Ile	Asn	Glu	Ile	Tyr	Arg	Pro	Leu	Asn	Ile
	35					40					45				

Gln	Phe	Thr	Leu	Val	Gly	Leu	Glu	Ile	Trp	Ser	Asn	Gln	Asp	Leu	Ile
	50					55					60				

Thr	Val	Thr	Ser	Val	Ser	His	Asp	Thr	Leu	Ala	Ser	Phe	Gly	Asn	Trp
65					70					75				80	

Arg	Glu	Thr	Asp	Leu	Leu	Arg	Arg	Gln	Arg	His	Asp	Asn	Ala	Gln	Leu
				85				90						95	

Leu	Thr	Ala	Ile	Asp	Phe	Asp	Gly	Asp	Thr	Val	Gly	Leu	Ala	Tyr	Val
		100					105					110			

Gly	Gly	Met	Cys	Gln	Leu	Lys	His	Ser	Thr	Gly	Val	Ile	Gln	Asp	His
		115				120						125			

Ser	Ala	Ile	Asn	Leu	Leu	Val	Ala	Leu	Thr	Met	Ala	His	Glu	Leu	Gly
	130					135					140				

His	Asn	Leu	Gly	Met	Asn	His	Asp	Gly	Asn	Gln	Cys	His	Cys	Gly	Ala
145					150					155					160

Asn Ser Cys Val Met Ala Ala Met Leu Ser Asp Gln Pro Ser Lys Leu
 165 170 175

Phe Ser Asp Cys Ser Lys Lys Asp Tyr Gln Thr Phe Leu Thr Val Asn
 180 185 190

Asn Pro Gln Cys Ile Leu Asn Lys Pro
 195 200

<210> 2

<211> 603

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: kódujúci NAT (analóg fibrolázy)

<400> 2

```
tctttccac aaagatacgt acagctggtt atcggtgctg accaccgtat gaacactaaa 60
tacaacggtg actctgacaa aatccgtcaa tgggtgcacc aaatcgtaa caccattaac 120
gaaatctaca gaccactgaa catccaattc actttggttg gtttggaat ctggtccaac 180
caagatttga tcaccgttac ttctgtatcc cagcactc tgccatcctt cggtaactgg 240
cgtgaaaccg acctgctgcg tcgccaacgt catgataacg ctcaactgct gaccgctatc 300
gacttcgacg gtgatactgt tggcttggt tacgttggtg gcatgtgtca actgaaacat 360
tctactggtg ttatccagga ccactccgct attaacctgc tgggtgctct gaccatggca 420
cacgaaactgg gtcataacct gggatatgaac cagcatggca accagtgtca ctgcggtgca 480
aactcctgtg ttatggctgc tatgctgtcc gatcaaccat ccaaactgtt ctccgactgc 540
tctaagaaag actaccagac cttcctgacc gttaacaacc cgcagtgtat cctgaacaaa 600
ccg 603
```

<210> 3

<211> 462

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: Natívny pro-NAT (analóg fibrolázy)

<400> 3

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
 20 25 30

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
 35 40 45

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
 50 55 60

Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Ser Ser Ile Ile Leu Glu Ser
 85 90 95
 Gly Asn Val Asn Asp Tyr Glu Val Val Tyr Pro Arg Lys Val Thr Pro
 100 105 110
 Val Pro Arg Gly Ala Val Gln Pro Lys Tyr Glu Asp Ala Met Gln Tyr
 115 120 125
 Glu Phe Lys Val Asn Ser Glu Pro Val Val Leu His Leu Glu Lys Asn
 130 135 140
 Lys Gly Leu Phe Ser Glu Asp Tyr Ser Glu Thr His Tyr Ser Pro Asp
 145 150 155 160
 Gly Arg Glu Ile Thr Thr Tyr Pro Leu Gly Glu Asp His Cys Tyr Tyr
 165 170 175
 His Gly Arg Ile Glu Asn Asp Ala Asp Ser Thr Ala Ser Ile Ser Ala
 180 185 190
 Cys Asn Gly Leu Lys Gly His Phe Lys Leu Gln Gly Glu Met Tyr Leu
 195 200 205
 Ile Glu Pro Leu Glu Leu Ser Asp Ser Glu Ala His Ala Val Tyr Lys
 210 215 220
 Tyr Glu Asn Val Glu Lys Glu Asp Glu Ala Pro Lys Met Cys Gly Val
 225 230 235 240
 Thr Gln Asn Trp Glu Ser Tyr Glu Pro Ile Lys Lys Ala Phe Gln Leu
 245 250 255
 Asn Leu Thr Lys Arg Ser Phe Pro Gln Arg Tyr Val Gln Leu Val Ile
 260 265 270
 Val Ala Asp His Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asn Gly Asp Ser Asp Lys
 275 280 285
 Ile Arg Gln Trp Val His Gln Ile Val Asn Thr Ile Asn Glu Ile Tyr
 290 295 300
 Arg Pro Leu Asn Ile Gln Phe Thr Leu Val Gly Leu Glu Ile Trp Ser
 305 310 315 320
 Asn Gln Asp Leu Ile Thr Val Thr Ser Val Ser His Asp Thr Leu Ala
 325 330 335
 Ser Phe Gly Asn Trp Arg Glu Thr Asp Leu Leu Arg Arg Gln Arg His
 340 345 350
 Asp Asn Ala Gln Leu Leu Thr Ala Ile Asp Phe Asp Gly Asp Thr Val
 355 360 365

Gly Leu Ala Tyr Val Gly Gly Met Cys Gln Leu Lys His Ser Thr Gly
 370 375 380

Val Ile Gln Asp His Ser Ala Ile Asn Leu Leu Val Ala Leu Thr Met
 385 390 395 400

Ala His Glu Leu Gly His Asn Leu Gly Met Asn His Asp Gly Asn Gln
 405 410 415

Cys His Cys Gly Ala Asn Ser Cys Val Met Ala Ala Met Leu Ser Asp
 420 425 430

Gln Pro Ser Lys Leu Phe Ser Asp Cys Ser Lys Lys Asp Tyr Gln Thr
 435 440 445

Phe Leu Thr Val Asn Asn Pro Gln Cys Ile Leu Asn Lys Pro
 450 455 460

<210> 4

<211> 1386

<212> DNA

<213>

Umelá sekvencia

<220>

<223>

Popis umelej sekvencie: kóduje pro-NAT (analog fibrolázy)

<400> 4

atgagatttc cttcaatttt tactgctggt ttattcgcag catcctccgc attagctgct 60
 ccagtcaaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggt 120
 tactcagatt tagaagggga tttegatggt gctgttttgc cattttccaa cagcacaat 180
 aacgggttat tgtttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta 240
 tctctcgaga aaagagaggc tgaagcttct tctattatct tggaatctgg taacgttaac 300
 gattacgaag ttgtttatcc aagaaagggtc actccagttc ctagggtgct tgttcaacca 360
 aagtacgaag atgccatgca atacgaattc aagggttaaca gtgaaccagt tgtcttgcac 420
 ttggaaaaaa acaaagggtt gttctctgaa gattactctg aaactcatta ctccccagat 480
 ggtagagaaa ttactactta cccattgggt gaagatcact gttactacca tggtagaatc 540
 gaaaacgatg ctgactccac tgcttctatc tctgcttgta acggtttgaa gggtcatttc 600
 aagttgcaag gtgaaatgta cttgattgaa ccattggaat tgccgcactc tgaagcccat 660
 gctgtctaca agtacgaaaa cgtcgaaaaa gaagatgaag ccccaaagat gtgtgggtgt 720
 acccaaaact gggaatcata tgaaccaatc aagaaggcct tccaattaaa cttgactaag 780
 agatctttcc cacaagata cgtacagctg gttatcggtg ctgaccaccg tatgaacact 840
 aaatacaacg gtgactctga caaatccgt caatgggtgc accaaatcgt caacaccatt 900
 aacgaaatct acagaccatt gaacatccaa ttcacttttg ttggtttgga aatctgggtcc 960
 aaccaagatt tgatcaccgt tacttctgta tcccacgaca ctctggcatc cttcggtaac 1020
 tggcgtgaaa ccgacctgct gcgtcgccaa cgctcatgata acgctcaact gctgaccgct 1080
 atcgacttcg acgggtgatac tgttggtctg gcttacggtg gtggcatgtg tcaactgaaa 1140
 cattctactg gtgttatcca ggaccactcc gctattaacc tgetgggtgc tctgaccatg 1200
 gcacacgaac tgggtcataa cctgggtatg aaccacgatg gcaaccagtg tcaactgcgt 1260
 gcaaaactct gtgttatggc tgctatgctg tccgatcaac catccaaact gttctccgac 1320
 tgctctaaga aagactacca gaccttctg accgttaaca acccgagtg tatcctgaac 1380
 aaaccg 1386

<210> 5
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> Agkistrodon contortrix

<220>
 <223> Natívna fibroláza z Agkistrodon contortrix

<400> 5
 Gln Gln Arg Phe Pro Gln Arg Tyr Val Gln Leu Val Ile Val Ala Asp
 1 5 10 15
 His Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asn Gly Asp Ser Asp Lys Ile Arg Gln
 20 25 30
 Trp Val His Gln Ile Val Asn Thr Ile Asn Glu Ile Tyr Arg Pro Leu
 35 40 45
 Asn Ile Gln Phe Thr Leu Val Gly Leu Glu Ile Trp Ser Asn Gln Asp
 50 55 60
 Leu Ile Thr Val Thr Ser Val Ser His Asp Thr Leu Ala Ser Phe Gly
 65 70 75 80
 Asn Trp Arg Glu Thr Asp Leu Leu Arg Arg Gln Arg His Asp Asn Ala
 85 90 95
 Gln Leu Leu Thr Ala Ile Asp Phe Asp Gly Asp Thr Val Gly Leu Ala
 100 105 110
 Tyr Val Gly Gly Met Cys Gln Leu Lys His Ser Thr Gly Val Ile Gln
 115 120 125
 Asp His Ser Ala Ile Asn Leu Leu Val Ala Leu Thr Met Ala His Glu
 130 135 140
 Leu Gly His Asn Leu Gly Met Asn His Asp Gly Asn Gln Cys His Cys
 145 150 155 160
 Gly Ala Asn Ser Cys Val Met Ala Ala Met Leu Ser Asp Gln Pro Ser
 165 170 175
 Lys Leu Phe Ser Asp Cys Ser Lys Lys Asp Tyr Gln Thr Phe Leu Thr
 180 185 190
 Val Asn Asn Pro Gln Cys Ile Leu Asn Lys Pro
 195 200

<210> 6
 <211> 609
 <212> DNA
 <213> Agkistrodon contortrix

<220>
 <223> Kóduje natívnu fibrolázu z Agkistrodon contortrix

<400> 6

```

caacaaagat tcccacaaag atacgtacag ctgggtatcg ttgctgacca ccgtatgaac 60
actaaaatac acggtgactc tgacaaaatc cgtcaatggg tgcaccaa at cgtcaacacc 120
attaacgaaa tctacagacc actgaacatc caattcactt tgggtgggtt ggaaatctgg 180
tccaaccaag atttgatcac cgttacttct gtatcccacg acactctggc atccttcggg 240
aactggcggtg aaaccgacct gctgcgtcgc caacgtcatg ataacgctca actgctgacc 300
gctatcgact tcgacgggtga tactgttggg ctgggttacg ttgggtggcat gtgtcaactg 360
aaacatttcta ctggtgttat ccaggaccac tccgctatta acctgctggg tgctctgacc 420
atggcacacg aactgggtca taacctgggt atgaaccacg atggcaacca gtgtcactgc 480
gggtgaaact cctgtgttat ggctgctatg ctgtccgac aaccatccaa actgttctcc 540
gactgctcta agaaagacta ccagaccttc ctgaccgtta acaaccgcga gtgtatcctg 600
aacaaaccg

```

<210> 7

<211> 1392

<212> DNA

<213> Agkistrodon contortrix

<220>

<223> Kódujúca sekvencia natívnej pro-fibrolázy
z Agkistrodon contortrix

<400> 7

```

atgagatttc cttcaatttt tactgctggt ttattcgcag catcctccgc attagctgct 60
ccagtcaaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaatc cggctgaagc tgtcatcggt 120
tactcagatt tagaagggga tttcgatggt gctgttttgc cattttccaa cagcacaat 180
aacgggttat tgtttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta 240
tctctcgaga aaagagaggc tgaagcttct tctattatct tggaaatctgg taacgttaac 300
gattacgaag ttgtttatcc aagaaagggtc actccagttc ctaggggtgc tgttcaacca 360
aagtacgaag atgccatgca atacgaatc aagggttaaca gtgaaccagt tgtcttgac 420
ttggaaaaaa acaaagggtt gttctctgaa gattactctg aaactcatta ctcccagat 480
ggtagagaaa ttactactta cccattgggt gaagatcact gttactacca tggtagaatc 540
gaaaacgatg ctgactccac tgcttctatc tctgcttgta acggtttgaa gggtcatttc 600
aagttgcaag gtgaaatgta cttgattgaa ccattggaat tgtccgactc tgaagcccat 660
gctgtctaca agtacgaaaa cgtcgaaaaa gaagatgaag ccccaaagat gtgtgggtgt 720
accctaaact gggaatcata tgaaccaatc aagaaggcct tccaattaaa cttgactaag 780
agacaacaaa gattcccaca aagatacgta cagctgggta tcgttgctga ccaccgtatg 840
aacactaaat acaacgggtga ctctgacaaa atccgtcaat ggggtgcacca aatcgtaac 900
accattaacg aaatctacag accactgaac atccaattca ctttgggttg tttggaaatc 960
tggtccaacc aagatttgat caccgttact tctgtatccc acgacactct ggcaccttc 1020
ggtaactggc gtgaaaccga cctgctgcgt cgccaacgtc atgataacgc tcaactgctg 1080
accgctatcg acttcgacgg tgatactggt ggtctgggtt acgttggtgg catgtgtcaa 1140
ctgaaacatt ctactgggtg tatccaggac cactccgcta ttaacctgct ggttgctctg 1200
accatggcac acgaactggg tcataacctg ggtatgaacc acgatggcaa ccagtgtcac 1260
tgcggtgcaa actcctgtgt tatggctgct atgctgtccg atcaaccatc caaactgttc 1320
tccgactgct ctaagaaaga ctaccagacc ttcctgaccg ttaacaaccc gcagtgtatc 1380
ctgaacaaac cg

```

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>
<223> Popis umelej sekvencie: : Oligonukleotid

<400> 8
tactattgcc agcattgctg c

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia

<220>
<223>) Popis umelej sekvencie: Oligonukleotid

<400> 9
cctacagtct tacggtaaac g

<210> 10
<211> 45
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia

<220> Popis umelej sekvencie: Oligonukleotid
<223>

<400> 10
tccaattaaa cttgactaag agatctttcc cacaaagata cgtac

<210> 11
<211> 44
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia

<220>
<223> Popis umelej sekvencie: Oligonukleotid

<400> 11
ggttaatttg aactgattct ctagaaaggg tgtttctatg catg

<210> 12
<211> 1620
<212> DNA
<213> Agkistrodon contortrix

<220>
<221> misc_feature
<222> Komplement ((1)..(1620))

<223> Komplementárny (sens) reťazec k antisensovému reťazci
(vid' SEQ ID NO:13)

<220>

<223> Kódujúca sekvencia natívnej pro-fibrolázy
z Agkistrodon contortrix

<400> 12

```

atgagatttc cttcaatttt tactgctggt ttattcgcag catcctccgc attagctgct 60
ccagtcaaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggt 120
tactcagatt tagaagggga ttctgatgtt gctgttttgc cattttccaa cagcacaaat 180
aacgggttat tgtttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta 240
tctctcgaga aaagagaggc tgaagcttct tctattatct tggaatctgg taacgttaac 300
gattacgaag ttgtttatcc aagaaaggct actccagttc ctaggggtgc tgttcaacca 360
aagtacgaag atgccatgca atacgaattc aagggttaaca gtgaaccagt tgtcttgcat 420
ttggaaaaaa acaaagggtt gttctctgaa gattactctg aaactcatta ctccccagat 480
ggtagagaaa ttactactta cccattgggt gaagatcact gttactacca tggtagaatc 540
gaaaacgatg ctgactccac tgcttctatc tctgcttgta acggtttgaa gggtcatttc 600
aagttgcaag gtgaaatgta cttgattgaa ccattggaat tgtccgactc tgaagcccat 660
gctgtctaca agtacgaaaa ggtcgaaaag gaagatgaag ccccaaagat gtgtgggtgt 720
acccaaaact gggaatcata tgaaccaatc aagaaggcct tccaattaaa cttgactaag 780
agacaacaaa gattcccaca aagatacgta cagctgggta tcgttgctga ccaccgtatg 840
aacactaaat acaacgggtg ctctgacaaa atccgtcaat ggggtgcacca aatcgtcaac 900
accattaacg aaatctacag accactgaac atccaattca ctttggttgg tttggaaatc 960
tggtccaacc aagatttgat caccgttact tctgtatccc acgacactct ggcatecttc 1020
ggtaactggc gtgaaaccga cctgctgcgt cgccaacgct atgataacgc tcaactgctg 1080
accgctatcg acttcgacgg tgatactgtt ggtctggctt acgttggtgg catgtgtcaa 1140
ctgaaacatt ctactgggtg tatccaggac cactccgcta ttaacctgct ggttgctctg 1200
accatggcac acgaactggg tcataacctg ggtatgaacc acgatggcaa ccagtgtcac 1260
tgcggtgcaa actcctgtgt tatggctgct atgctgtccg atcaaccatc caaactgttc 1320
tccgactgct ctaagaaaga ctaccagacc ttcttgaccg ttaacaaccc gcagtgtatc 1380
ctgaacaaac cgtaagcggc cgccagcttt ctagaacaaa aactcatctc agaagaggat 1440
ctgaatagcg ccgtcgacca tcatcatcat catcattgag tttgtagcct tagacatgac 1500
tggtcctcag ttcaagttgg gcacttacga gaagaccggt cttgctagat tctaatacaag 1560
aggatgtcag aatgccattt gcctgagaga tgcaggcttc atttttgata cttttttatt 1620

```

<210> 13

<211> 1620

<212> DNA

<213> Agkistrodon contortrix

<220>

<221> misc_feature

<222> Complement((1)..(1620))

<223> Komplementárny (antisens) reťazec k sens reťazcu
(vid' SEQ ID NO. 12)

<220>

<223> Anti-kódujúca sekvencia natívnej pro-fibrolázy
z Agkistrodon contortrix

<400> 13

```

aataaaaaag tatcaaaaat gaagcctgca tctctcaggc aaatggcatt ctgacatcct 60
cttgattaga atctagcaag accggtcttc tcgtaagtgc ccaacttgaa ctgaggaaca 120
gtcatgtcta aggtacaaaa ctcaatgatg atgatgatga tggctgacgg cgctattcag 180

```

```

atcctcttct gagatgagtt ttgtttctag aaagctggcg gccgcttacg gtttgttcag 240
gatacactgc gggttgttaa cggtcaggaa ggtctggtag tctttcttag agcagtcgga 300
gaacagtttg gatggttgat cggacagcat agcagccata acacaggagt ttgcaccgca 360
gtgacactgg ttgccatcgt ggttcatacc caggttatga cccagttcgt gtgccatggg 420
cagagcaacc agcagggttaa tagcggagtg gtcttgata acaccagtag aatgtttcag 480
ttgacacatg ccaccaacgt aagccagacc aacagtatca ccgtcgaagt cgatagcggg 540
cagcagttga gcgttatcat gacgttggcg acgcagcagg tcggtttcac gccagttacc 600
gaaggatgcc agagtgtcgt gggatacaga agtaacgggt atcaaattctt ggttggacca 660
gatttccaaa ccaaccaaag tgaattggat gttcagtggt ctgtagattt cgttaatggg 720
gttgacgatt tggtcacccc attgacggat ttgtcagag tcaccgttgt atttagtggt 780
catacgggtg tcagcaacga taaccagctg tacgtatctt tgtgggaatc ttgttgtct 840
cttagtcaag tttaattgga aggccttctt gattgggttca tatgattccc agttttgggt 900
aacaccacac atctttgggg cttcatcttc cttttcgacg ttttcgtact tgtagacagc 960
atgggcttca gagtccgaca attccaatgg ttcaatcaag tacatttcac cttgcaactt 1020
gaaatgaccc ttcaaaccgt tacaagcaga gatagaagca gtggagtcag catcgttttc 1080
gattctacca tggtagtaac agtgatcttc acccaatggg taagtagtaa tttctctacc 1140
atctggggag taatgagttt cagagtaatc ttcagagaac aaacctttgt ttttttccaa 1200
gtgcaagaca actggttcac tgttaacctt gaattcgtat tgcattggcat cttcgtactt 1260
tggttgaaca gcacctctag gaactggagt gacctttctt ggataaacia cttcgtaatc 1320
gtraacgtta ccagattcca agataataga agaagcttca gcctctcttt tctcagagaa 1380
tacccttctt tcttttagcag caatgctggc aatagtagta tttataaaca ataaccggtt 1440
atttgtgctg ttggaaaatg gcaaaacagc aacatcgaaa tccccttcta aatctgagta 1500
accgatgaca gcttcagccg gaatttgtgc cgtttcatct tctgttgtag tgttgactgg 1560
agcagctaag gcggaggatg ctgcgaataa aacagcagta aaaattgaag gaaatctcat 1620

```

<210> 14

<211> 540

<212> PRT

<213> Agkistrodon contortrix

<220>

<223> Xaa na pozíciách 465,493,516 a 536 označuje stop kodón

<220>

<223> Natívna pro-fibroláza z Agkistrodon contortrix

<400> 14

```

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
  1             5             10             15

```

```

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
      20             25             30

```

```

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
  35             40             45

```

```

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
  50             55             60

```

```

Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
  65             70             75             80

```

```

Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Ser Ser Ile Ile Leu Glu Ser
      85             90             95

```

Gly Asn Val Asn Asp Tyr Glu Val Val Tyr Pro Arg Lys Val Thr Pro
 100 105 110
 Val Pro Arg Gly Ala Val Gln Pro Lys Tyr Glu Asp Ala Met Gln Tyr
 115 120 125
 Glu Phe Lys Val Asn Ser Glu Pro Val Val Leu His Leu Glu Lys Asn
 130 135 140
 Lys Gly Leu Phe Ser Glu Asp Tyr Ser Glu Thr His Tyr Ser Pro Asp
 145 150 155 160
 Gly Arg Glu Ile Thr Thr Tyr Pro Leu Gly Glu Asp His Cys Tyr Tyr
 165 170 175
 His Gly Arg Ile Glu Asn Asp Ala Asp Ser Thr Ala Ser Ile Ser Ala
 180 185 190
 Cys Asn Gly Leu Lys Gly His Phe Lys Leu Gln Gly Glu Met Tyr Leu
 195 200 205
 Ile Glu Pro Leu Glu Leu Ser Asp Ser Glu Ala His Ala Val Tyr Lys
 210 215 220
 Tyr Glu Asn Val Glu Lys Glu Asp Glu Ala Pro Lys Met Cys Gly Val
 225 230 235 240
 Thr Gln Asn Trp Glu Ser Tyr Glu Pro Ile Lys Lys Ala Phe Gln Leu
 245 250 255
 Asn Leu Thr Lys Arg Gln Gln Arg Phe Pro Gln Arg Tyr Val Gln Leu
 260 265 270
 Val Ile Val Ala Asp His Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asn Gly Asp Ser
 275 280 285
 Asp Lys Ile Arg Gln Trp Val His Gln Ile Val Asn Thr Ile Asn Glu
 290 295 300
 Ile Tyr Arg Pro Leu Asn Ile Gln Phe Thr Leu Val Gly Leu Glu Ile
 305 310 315 320
 Trp Ser Asn Gln Asp Leu Ile Thr Val Thr Ser Val Ser His Asp Thr
 325 330 335
 Leu Ala Ser Phe Gly Asn Trp Arg Glu Thr Asp Leu Leu Arg Arg Gln
 340 345 350
 Arg His Asp Asn Ala Gln Leu Leu Thr Ala Ile Asp Phe Asp Gly Asp
 355 360 365
 Thr Val Gly Leu Ala Tyr Val Gly Gly Met Cys Gln Leu Lys His Ser
 370 375 380

Thr Gly Val Ile Gln Asp His Ser Ala Ile Asn Leu Leu Val Ala Leu
 385 390 395 400
 Thr Met Ala His Glu Leu Gly His Asn Leu Gly Met Asn His Asp Gly
 405 410 415
 Asn Gln Cys His Cys Gly Ala Asn Ser Cys Val Met Ala Ala Met Leu
 420 425 430
 Ser Asp Gln Pro Ser Lys Leu Phe Ser Asp Cys Ser Lys Lys Asp Tyr
 435 440 445
 Gln Thr Phe Leu Thr Val Asn Asn Pro Gln Cys Ile Leu Asn Lys Pro
 450 455 460
 Xaa Ala Ala Ala Ser Phe Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp
 465 470 475 480
 Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His Xaa Val Cys Ser
 485 490 495
 Leu Arg His Asp Cys Ser Ser Val Gln Val Gly His Leu Arg Glu Asp
 500 505 510
 Arg Ser Cys Xaa Ile Leu Ile Lys Arg Met Ser Glu Cys His Leu Pro
 515 520 525
 Glu Arg Cys Arg Leu His Phe Xaa Tyr Phe Phe Ile
 530 535 540

<210> 15
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> Agkistrodon contortrix

<220>
 <223> Natívna fibroláza z Agkistrodon contortrix

<220>
 <223>) Xaa na pozícii 1 zastupuje chemickú zlúčeninu
 -kyselinu pyroglutátovú. Táto chemická zlúčenina
 je označovaná v zozname písmenkom "E".

<400> 15
 Xaa Gln Arg Phe Pro Gln Arg Tyr Val Gln Leu Val Ile Val Ala Asp
 1 5 10 15
 His Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asn Gly Asp Ser Asp Lys Ile Arg Gln
 20 25 30
 Trp Val His Gln Ile Val Asn Thr Ile Asn Glu Ile Tyr Arg Pro Leu
 35 40 45

Asn Ile Gln Phe Thr Leu Val Gly Leu Glu Ile Trp Ser Asn Gln Asp
 50 55 60
 Leu Ile Thr Val Thr Ser Val Ser His Asp Thr Leu Ala Ser Phe Gly
 65 70 75 80
 Asn Trp Arg Glu Thr Asp Leu Leu Arg Arg Gln Arg His Asp Asn Ala
 85 90 95
 Gln Leu Leu Thr Ala Ile Asp Phe Asp Gly Asp Thr Val Gly Leu Ala
 100 105 110
 Tyr Val Gly Gly Met Cys Gln Leu Lys His Ser Thr Gly Val Ile Gln
 115 120 125
 Asp His Ser Ala Ile Asn Leu Leu Val Ala Leu Thr Met Ala His Glu
 130 135 140
 Leu Gly His Asn Leu Gly Met Asn His Asp Gly Asn Gln Cys His Cys
 145 150 155 160
 Gly Ala Asn Ser Cys Val Met Ala Ala Met Leu Ser Asp Gln Pro Ser
 165 170 175
 Lys Leu Phe Ser Asp Cys Ser Lys Lys Asp Tyr Gln Thr Phe Leu Thr
 180 185 190
 Val Asn Asn Pro Gln Cys Ile Leu Asn Lys Pro
 195 200

<210> 16
 <211> 202
 <212> PRT
 <213> Agkistrodon contortrix

<220>
 <223> Natívna fibroláza z Agkistrodon contortrix

<220>
 <223> Xaa na pozícii 1 zastupuje chemickú zlúčeninu
 -kyselinu pyroglutámovú. Táto chemická zlúčenina
 je označovaná v zozname písmenkom "E".

<400> 16
 Xaa Arg Phe Pro Gln Arg Tyr Val Gln Leu Val Ile Val Ala Asp His
 1 5 10 15
 Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asn Gly Asp Ser Asp Lys Ile Arg Gln Trp
 20 25 30
 Val His Gln Ile Val Asn Thr Ile Asn Glu Ile Tyr Arg Pro Leu Asn
 35 40 45

Ile Gln Phe Thr Leu Val Gly Leu Glu Ile Trp Ser Asn Gln Asp Leu
 50 55 60
 Ile Thr Val Thr Ser Val Ser His Asp Thr Leu Ala Ser Phe Gly Asn
 65 70 75 80
 Trp Arg Glu Thr Asp Leu Leu Arg Arg Gln Arg His Asp Asn Ala Gln
 85 90 95
 Leu Leu Thr Ala Ile Asp Phe Asp Gly Asp Thr Val Gly Leu Ala Tyr
 100 105 110
 Val Gly Gly Met Cys Gln Leu Lys His Ser Thr Gly Val Ile Gln Asp
 115 120 125
 His Ser Ala Ile Asn Leu Leu Val Ala Leu Thr Met Ala His Glu Leu
 130 135 140
 Gly His Asn Leu Gly Met Asn His Asp Gly Asn Gln Cys His Cys Gly
 145 150 155 160
 Ala Asn Ser Cys Val Met Ala Ala Met Leu Ser Asp Gln Pro Ser Lys
 165 170 175
 Leu Phe Ser Asp Cys Ser Lys Lys Asp Tyr Gln Thr Phe Leu Thr Val
 180 185 190
 Asn Asn Pro Gln Cys Ile Leu Asn Lys Pro
 195 200

<210> 17

<211> 538

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Popis umelej sekvencie: analóg natívnej pro-fibrolázy z
 Agkistrodon contortrix

<400> 17

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 1 5 10 15
 Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
 20 25 30
 Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
 35 40 45
 Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
 50 55 60
 Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
 65 70 75 80

Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Ser Ser Ile Ile Leu Glu Ser
 85 90 95
 Gly Asn Val Asn Asp Tyr Glu Val Val Tyr Pro Arg Lys Val Thr Pro
 100 105 110
 Val Pro Arg Gly Ala Val Gln Pro Lys Tyr Glu Asp Ala Met Gln Tyr
 115 120 125
 Glu Phe Lys Val Asn Ser Glu Pro Val Val Leu His Leu Glu Lys Asn
 130 135 140
 Lys Gly Leu Phe Ser Glu Asp Tyr Ser Glu Thr His Tyr Ser Pro Asp
 145 150 155 160
 Gly Arg Glu Ile Thr Thr Tyr Pro Leu Gly Glu Asp His Cys Tyr Tyr
 165 170 175
 His Gly Arg Ile Glu Asn Asp Ala Asp Ser Thr Ala Ser Ile Ser Ala
 180 185 190
 Cys Asn Gly Leu Lys Gly His Phe Lys Leu Gln Gly Glu Met Tyr Leu
 195 200 205
 Ile Glu Pro Leu Glu Leu Ser Asp Ser Glu Ala His Ala Val Tyr Lys
 210 215 220
 Tyr Glu Asn Val Glu Lys Glu Asp Glu Ala Pro Lys Met Cys Gly Val
 225 230 235 240
 Thr Gln Asn Trp Glu Ser Tyr Glu Pro Ile Lys Lys Ala Phe Gln Leu
 245 250 255
 Asn Leu Thr Lys Arg Ser Phe Pro Gln Arg Tyr Val Gln Leu Val Ile
 260 265 270
 Val Ala Asp His Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asn Gly Asp Ser Asp Lys
 275 280 285
 Ile Arg Gln Trp Val His Gln Ile Val Asn Thr Ile Asn Glu Ile Tyr
 290 295 300
 Arg Pro Leu Asn Ile Gln Phe Thr Leu Val Gly Leu Glu Ile Trp Ser
 305 310 315 320
 Asn Gln Asp Leu Ile Thr Val Thr Ser Val Ser His Asp Thr Leu Ala
 325 330 335
 Ser Phe Gly Asn Trp Arg Glu Thr Asp Leu Leu Arg Arg Gln Arg His
 340 345 350
 Asp Asn Ala Gln Leu Leu Thr Ala Ile Asp Phe Asp Gly Asp Thr Val
 355 360 365
 Gly Leu Ala Tyr Val Gly Gly Met Cys Gln Leu Lys His Ser Thr Gly
 370 375 380

Val Ile Gln Asp His Ser Ala Ile Asn Leu Leu Val Ala Leu Thr Met
 385 390 395 400
 Ala His Glu Leu Gly His Asn Leu Gly Met Asn His Asp Gly Asn Gln
 405 410 415
 Cys His Cys Gly Ala Asn Ser Cys Val Met Ala Ala Met Leu Ser Asp
 420 425 430
 Gln Pro Ser Lys Leu Phe Ser Asp Cys Ser Lys Lys Asp Tyr Gln Thr
 435 440 445
 Phe Leu Thr Val Asn Asn Pro Gln Cys Ile Leu Asn Lys Pro Xaa Ala
 450 455 460
 Ala Ala Ser Phe Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
 465 470 475 480
 Ser Ala Val Asp His His His His His His Xaa Val Cys Ser Leu Arg
 485 490 495
 His Asp Cys Ser Ser Val Gln Val Gly His Leu Arg Glu Asp Arg Ser
 500 505 510
 Cys Xaa Ile Leu Ile Lys Arg Met Ser Glu Cys His Leu Pro Glu Arg
 515 520 525
 Cys Arg Leu His Phe Xaa Tyr Phe Phe Ile
 530 535

<210> 18

<211> 602

<212> DNA

<213> Agkistrodon contortrix

<220> Fragment fibrolázy z Agkistrodon contortrix

<223>

<400> 18

tactattgcc agcattgctg cttaaagaaga aggggtatct ctcgagaaaa gagaggctga 60
 agcttcttct attatcttgg aatctggtaa cgtaacgat tacgaagttg tttatccaag 120
 aaaggtcact ccagttccta ggggtgctgt tcaaccaaaag tacgaagatg ccatgcaata 180
 cgaattcaag gttaacagtg aaccagttgt cttgcacttg gaaaaaaca aaggtttgtt 240
 ctctgaagat tactctgaaa ctcatctact cccagatggt agagaaatta ctacttacc 300
 attgggtgaa gatcactgtt actaccatgg tagaatcgaa aacgatgctg actccactgc 360
 ttctatctct gcttgtaacg gtttgaaggg tcatttcaag ttgcaaggtg aaatgtactt 420
 gattgaacca ttggaattgt ccgactctga agcccatgct gtctacaagt acgaaaacgt 480
 cgaaaaggaa gatgaagccc caaagatgtg tgggtgttacc caaaactggg aatcatatga 540
 accaatcaag aaggccttcc aattaaactt gactaagaga tctttccac aaagatacgt 600
 ac 602

<210> 19

<211> 816

<212> DNA

<213> Agkistrodon contortrix

<220>

<223> Fragment fibrolázy z Agkistrodon contortrix

<400> 19

```

tccaattaaa cttgactaag agatctttcc cacaaagata cgtacagctg gttatcggtg 60
ctgaccaccg tatgaacact aaatacaacg gtgactctga caaaatccgt caatgggtgc 120
accaaatcgt caacaccatt aacgaaatct acagaccact gaacatccaa ttcactttgg 180
ttgggttggg aatctgggtc aaccaagatt tgatcaccgt tacttctgta tcccacgaca 240
ctctggcatc ctctggtaac tggcgtgaaa cgcacctgct gcgtcgccaa cgctcatgata 300
acgctcaact gctgaccgct atcgacttcg acggtgatac tgggtggtctg gcttacgttg 360
gtggcatgtg tcaactgaaa cattctactg gtgttatcca ggaccactcc gctattaacc 420
tgctgggtgc tctgaccatg gcacacgaac tgggtcataa cctgggtatg aaccacgatg 480
gcaaccagtg tcaactgcgt gcaaactcct gtgttatggc tgctatgctg tccgatcaac 540
catccaaact gttctccgac tgctctaaga aagactacca gaccttctctg accgttaaca 600
acccgcagtg tatcctgaac aaaccgtaag cggccgccag ctttctagaa caaaaactca 660
tctcagaaga ggatctgaat agcgcgctcg accatcatca tcatcatcat tgagtttgta 720
gccttagaca tgactgttcc tcagttcaag ttgggcactt acgagaagac cgtcttgct 780
agattctaatt caagaggatg tcagaatgcc atttgc 816

```

<210> 20

<211> 1373

<212> DNA

<213> Agkistrodon contortrix

<220>

<223> Fragment fibrolázy z Agkistrodon contortrix

<400> 20

```

tactattgcc agcattgctg ctaaagaaga aggggtatct ctcgagaaaa gagaggctga 60
agcttcttct attatcttgg aatctggtaa cgtaacgat tacgaagttg tttatccaag 120
aaaggctact ccagttccta ggggtgctgt tcaaccaaag tacgaagatg ccatgcaata 180
cgaattcaag gttaacagtg aaccagttgt cttgcacttg gaaaaaaca aaggtttgtt 240
ctctgaagat tactctgaaa ctctattctc cccagatggt agagaaatta ctacttacc 300
attgggtgaa gatcactgtt actaccatgg tagaatcgaa aacgatgctg actccactgc 360
ttctatctct gcttgaacg gtttgaaggg tcatctcaag ttgcaagggtg aaatgtactt 420
gattgaacca ttggaattgt ccgactctga agcccatgct gtctacaagt acgaaaacgt 480
cgaaaaggaa gatgaagccc caaagatgtg tgggtgttacc caaaactggg aatcatatga 540
accaatcaag aaggccttcc aattaaactt gactaagaga tctttccac aaagatacgt 600
acagctggtt atcgttgctg accaccgtat gaapactaaa tacaacggtg actctgacaa 660
aatccgtcaa tgggtgcacc aaatcgtaac caccattaac gaaatctaca gaccactgaa 720
catccaattc actttggttg gtttggaaat ctggtccaac caagatttga tcaccgttac 780
ttctgtatcc cagcactc tggcatcctt cggtaactgg cgtgaaaccg acctgctgctg 840
tcgccaacgt catgataacg ctcaactgct gaccgctatc gacttcgacg gtgatactgt 900
tgggtctggct tacgttggtg gcatgtgtca actgaaacat tctactggtg ttatccagga 960
ccactccgct attaacctgc tgggtgctct gaccatggca cacgaactgg gtcataacct 1020
gggtatgaac cagcatggca accagtgtca ctgcggtgca aactcctgtg ttatggctgc 1080
tatgctgtcc gatcaaccat ccaaactgtt ctccgactgc tctaagaaag actaccagac 1140
cttctgacc gttaacaacc cgcagtgtat cctgaacaaa ccgtaagcgg ccgccagctt 1200
tctagaacaa aaactcatct cagaagagga tctgaatagc gccgtcgacc atcatcatca 1260
tcatcattga gttttagtgc ttagacatga ctgttctca gttcaagttg ggcacttacg 1320
agaagaccgg tcttgctaga ttctaataca gaggatgtca gaatgccatt tgc 1373

```

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Fibrinolyticky aktívny polypeptid má aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO:1.

2. Polypeptid z nároku 1, ktorý bol vyrobený rekombinantnou expresiou v kvasinkách.

3. Molekula nukleovej kyseliny kóduje polypeptid o sekvencii SEQ ID NO:1.

4. Molekula nukleovej kyseliny z nároku 3, ktorá má sekvenciu SEQ ID NO :4.

5. Expresný vektor obsahuje expresné regulačné prvky, ktoré sú účinne pripojené k molekule nukleovej kyseliny podľa nároku 3.

6. Expresný vektor podľa nároku 5, v ktorom je molekula nukleovej kyseliny a má nukleotidovú sekvenciu SEQ ID NO:4.

7. Hostiteľská bunka transformovaná alebo transfekovaná molekulou nukleovej kyseliny podľa nároku 3.

8. Transformovaná alebo transfekovaná hostiteľská bunka podľa nároku 7, ktorá je prokaryotická alebo eukaryotická.

9. Transformovaná alebo transfekovaná prokaryotická bunka podľa nároku 8, ktorá je kvasinková bunka.

10. Transformovaná alebo transfekovaná kvasinková bunka podľa nároku 9, ktorá je *Pichia pastoris*.

11. Metóda produkcie NATu, zahrnujúca kultiváciu hostiteľských buniek obsahujúcich DNA molekulu kódujúcu uvedenú metaloproteinázu, účinne pripojenú k regulačným prvkom ktoré stimulujú expresiu za podmienok, že je DNA molekula exprimovaná a izolácia exprimovanej metaloproteinázy z kultúry hostiteľských buniek.

12. Metóda z nároku 11, kde DNA molekula je SEQ ID NO:4.

13. Metóda z nároku 11, v ktorej sú hostiteľské bunky kvasinky.

14. Metóda z nároku 13, v ktorom sú kvasinkové bunky *Pichia pastoris*.

15. Metóda produkcie metaloproteinázy-fybrinolytického agens vybraného zo skupiny zostávajúcej sa z fibrolázy NATu, obsahujúcej kultiváciu *Pichia* hostiteľských buniek, ktoré obsahujú DNA molekulu kódujúcu spomínanú metaloproteinázu, účinne pripojenú k regulačným prvkom pre stimuláciu expresie za podmienok, kedy je DNA molekula exprimovaná a izolácia exprimovanej metaloproteinázy z kultúry hostiteľských buniek.

16. Metóda z nároku 15, kde *Pichia* hostiteľská bunka je *Pichia pastoris*.

17. Metóda liečby trombózy u cicavcov zahrnujúca podávanie trombolyticky efektívneho množstva NATu cicavcom.

18. Protilátku proti polypeptidu z nároku 1.

19. Protilátka z nároku 17, ktorá je monoklonálna protilátka.