

74.898/SZE

Eljárás élesztőben javított fermentációs hozammal rendelkező inzulin prekursorok és inzulin prekursor analógok előállítására

KIVONAT

A találmány tárgyát új inzulin prekursorok vagy inzulin prekursor analógok képezik, amik előnyösen maximum 15 aminosav csoportból álló összekötő peptidet (mini C-peptid) tartalmaznak, amikben legalább egy Gly csoport van. A prekursorok humán inzulinná vagy humán inzulin prekursorrá konvertálhatók. A prekursorokban a B27 (CG2 atom) és az A1 (CA atom) közötti távolság 5 Angströmnél kevesebb.

*Illana A. L. /
Reiner*

74.898/SZE

Eljárás élesztőben javított fermentációs hozammal rendelkező in-
zulin prekursorok és inzulin prekursor analógok előállítására

Az élesztő szervezetek nagyszámú fehérjét termelnek, amiknek a sejten kívül van funkciója. Az ilyen fehérjéket nevezik szekretált fehérjéknek. Ezek a szekretált fehérjék először a sejten belül expresszálódnak prekursor vagy pre-formában, ami egy pre-peptid szekvenciát tartalmaz, biztosítva az expresszált termék hatékony irányítását az endoplazmatikus retikulum membránján keresztül (transzlokáció). A pre-peptid, normális körülmények között szignálpeptidnek nevezik, a transzlokáció során általában lehasad a kívánt termékről. Ha egyszer belépett a szekréciós bioszintézis útba, a fehérje a Golgi berendezésbe transzportálódik. A Golgi berendezésből a fehérje különböző utakat követhet, amik kompartmentekbe, azaz például a sejt vakuólumába vagy a sejtmembránba juttathatják, vagy kijuthat a sejtől, ezzel a külső közegbe szekretálódik [Pfeffer és mtsai: Annu. Rev. Biochem. 56, 829-852 (1987)].

Az inzulin a hasnyálmirigy által szekretált polipeptid hormon, és két, A és B polipeptid láncból áll, amiket a láncok közötti diszulfid hidak kötnek össze. Az A lánc emellett tartalmaz egy láncon belüli diszulfid hidat.

A hormon egyláncú prekursor proinzulin (preproinzulin) formájában szintetizálódik, ami tartalmaz egy 24 aminosavból



álló prepeptidet, ezt követi a proinzulin 86 aminosava, a következő konfigurációban: prepeptid - B- Arg Arg - Lys Arg -A, amiben egy 31 aminosavból álló összekötő peptid. Az Arg-Arg és a Lys-Arg hasítási helyek, ahol az összekötő peptid hasad le az A és B láncokról.

Három fő módszert használnak a humán inzulin mikroorganizmusokban való előállítására. Kettő *Escherichia coli*-t használ, és vagy egy nagy fúziós fehérjét expresszál a citoplazmában [Frank és mtsai: *In: Peptides: Proceedings of the 7th American Peptide Chemistry Symposium*, 729-739. oldal, szerk.: Rich & Gross, Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1981)], vagy szignálpeptidet használ, ami lehetővé teszi a periplazmatikus térbe való szekréciót [Chen és mtsai: *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 78, 5401-5404 (1981)]. A harmadik módszer *Saccharomyces cerevisiae*-t használ inzulin prekursorának a táptalajba való expresszálására [Thim és mtsai: *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 83, 6766-6770 (1986)]. A szakirodalomban korábban leírtak korlátozott számú inzulin prekuzort, amiket vagy *Escherichia coli*-ban vagy *Saccharomyces cerevisiae*-ben expresszáltak [5,962,267 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás, WO 95/16078, EP 0055945, EP 0163529, EP 0347845 és EP 0741188 számú szabadalmi leírás].

A jelen találmány szerinti összekötő peptidek legalább egy aromás aminosavat tartalmaznak (Phe, Trp vagy Tyr), és általában rövidebbek mint a természetes humán C peptid, ami - bele-

értve a kétbázisos hasítási helyeket - 35 aminosavból áll. Tehát az új összekötő peptidek általában maximum 15 aminosav csoportból állnak, előnyösen nem több mint 9 aminosavból. Az új összekötő peptidek tipikus esetben maximum 7 vagy 5 aminosav csoportot tartalmaznak, előnyösen nem több mint 4 aminosav csoportot.

Ugyanúgy, mint a természetes humán inzulin molekulában, az összekötő peptid tartalmaz egy hasítási helyet a C-terminálisán és az N-terminálisán, ami lehetővé teszi az összekötő peptid *in vitro* lehasítását az A és B láncról. Az ilyen hasítási hely lehet bármilyen, a szakterületen ismert hasítási hely, azaz például egy brómciánnal hasítható Met; egyetlen bázikus aminosav csoport, vagy bázikus aminosav csoport pár (Lys vagy Arg), ami tripszinnel vagy tripszin-szerű proteázokkal hasítható; az *Achromobacter lyticus* proteázzal vagy egy karboxipeptidáz proteázzal. Az összekötő peptidnek A láncról való lehasítását lehetővé tevő hasítási hely előnyösen egyetlen bázikus aminosav csoport, azaz Lys vagy Arg, előnyösen Lys.

Egy másik változat szerint az összekötő peptidnek a B láncról való lehasítását a B láncban természetesen előforduló Lys^{B29} aminosavnál való hasítás teszi lehetővé, ezzel egy desB30 inzulin prekuzort vagy desB30 inzulin prekuzor analógot eredményezve. A kívánt B30 aminosavat azután hozzáadhatjuk jól ismert, *in vitro* enzimatiszus eljárásokkal.

Az egyik megvalósítási mód szerint az összekötő peptid nem tartalmaz két szomszédos bázikus aminosav csoportot (LysArg).



Ebben a megvalósítási módban az A-láncról való lehasítást egyetlen, az A lánc N-terminálisán elhelyezkedő Lys vagy Arg csoportnál, és a B láncban természetes körülmények között a B29 pozícióban található Lys csoportnál hajthatjuk végre.

Az összekötő peptid egynél több Gly csoportot tartalmazhat, de előnyösen ötnél nem többet. Az összekötő peptid előnyösen nem tartalmaz háromnál több Gly csoportot, és legelőnyösebben csak egyetlen Gly csoportot tartalmaz. A Gly csoport az A lánc szomszédságában levő hasítási helyhez viszonyítva N-terminális pozícióban lehet.

Emellett tipikus esetben a B27 (CG2 atom) az A1-hez (CA atom) viszonyítva kisebb mint 5 Angström távolságban van.

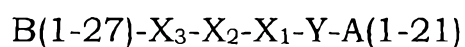
Ennek megfelelően a jelen találmány tárgyát olyan inzulin prekurzorok vagy inzulin prekurzor analógok képezik, amik az A és B láncról lehasítható összekötő peptidet (C-peptid) tartalmaznak, ami legalább egy Gly csoportot tartalmaz, és a B27 (CG2 atom) az A1-hez (CA atom) viszonyítva kisebb mint 5 Angström távolságban van.

A jelen találmány tárgyát továbbá inzulin prekurzorok vagy inzulin prekurzor analógok képezik, amik olyan összekötő peptidet (C-peptid) tartalmaznak, ami lehasítható az A és B láncról, és legalább egy Gly aminosav csoportot és egy olyan hasítási helyet tartalmaz, ami e peptidkötést az A lánc és az összekötő peptid között elhasítja, és egy aromás Gly csoport közvetlenül N-terminális pozícióban van az említett hasítási helyhez viszonyítva.



A jelen találmány tárgyát továbbá inzulin prekursorok vagy inzulin prekursor analógok képezik, amik olyan összekötő peptidet (C-peptid) tartalmaznak, ami lehasítható az A és B lánc-ról, és legalább egy Gly aminosav csoportot tartalmaz, és maximum 6 aminosav hosszúságú.

A jelen találmány tárgyát képezik továbbá az olyan inzulin prekursorok vagy inzulin prekursor analógok, amik az alábbi általános képlettel írhatók le:



amiben

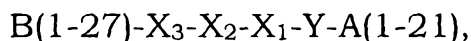
X_1 jelentése egy 1-5 aminosavból álló peptid-szekvencia, ami egy Gly aminosav csoportot tartalmaz,

X_2 jelentése Pro, Asp, Ala, Arg vagy Pro-Thr a B lánc 29-es pozíciójában,

X_3 jelentése Pro, Asp, Lys vagy Ile a B lánc 28-as pozíciójában, és

Y jelentése Lys vagy Arg.

A jelen találmány tárgyát képezik továbbá az olyan inzulin prekursorok vagy inzulin prekursor analógok, amik az alábbi általános képlettel írhatók le:



és amikben X_1 egy Gly aminosav csoportot tartalmaz az Y-hoz viszonyítva közvetlenül N-terminális pozícióban, amiben

X_1 jelentése egy 1-5 aminosavból álló peptid-szekvencia, ami egy Gly aminosav csoportot tartalmaz,

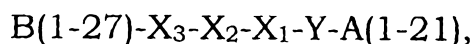
X_2 jelentése Pro, Asp, Ala, Arg vagy Pro-Thr a B lánc 29-es pozíciójában,

X_3 jelentése Pro, Asp, Lys vagy Ile a B lánc 28-as pozíciójában, és

Y jelentése Lys vagy Arg.

Az egyik megvalósítási mód szerint X_1 1-15, 1-10, 1-8, 1-5 vagy 1-3 aminosav csoportból áll.

A jelen találmány tárgyát képezik továbbá az olyan inzulin prekurzorok vagy inzulin prekurzor analógok, amik az alábbi általános képlettel írhatók le:



és amikben X_1 legalább egy Gly aminosav csoportot tartalmaz,

X_2 jelentése Pro, Asp, Ala, Arg vagy Pro-Thr a B lánc 29-es pozíciójában,

X_3 jelentése Pro, Asp, Lys vagy Ile a B lánc 28-as pozíciójában, és

Y jelentése Lys vagy Arg,

és amiben a B27-nek (CG2 atom) az A1-től (CA atom) távolsága kisebb mint 5 Angström.

Ebben a megvalósítási módban X_1 tipikus esetben 1-15, 1-10, 1-9, 1-8, 1-5, 1-4 vagy 1-3 aminosav csoportból áll.

A fenti képletben X_1 tipikus esetben 1-5, előnyösen 1-3 és legelőnyösebben csak egy Gly molekulát tartalmaz.

Az X_1 -ben levő aminosav csoport lehet bármilyen kódolható aminosav csoport, és lehet azonos vagy eltérő, azzal a feltétellel, hogy X_1 -ben legalább egy aminosav csoport Gly.

Az egyik megvalósítási mód szerint X_3 jelentése Asp és X_2 jelentése Lys. Ez a megvalósítási mód magában foglalja azokat az inzulin prekursor analógokat, amik egy Asp csoportot tartalmaznak a B lánc B28 pozíciójában (a továbbiakban az „Asp^{B28}” jelölést kapja). Egy másik megvalósítási mód szerint X_2 jelentése Lys, X_3 jelentése Pro. Egy további megvalósítási mód szerint az X_1 -Y szekvenciát az alábbi csoportból választjuk ki:

- a) Glu-Glu-Gly-Lys (1. számú szekvencia)
- b) Glu-Gly-Lys
- c) Ser-Gly-Lys
- d) Asn-Gly-Lys
- e) Thr-Gly-Lys
- f) Asp-Gly-Lys
- g) Met-Gly-Lys
- h) Ala-Gly-Lys
- i) His-Gly-Lys
- j) Gly-Lys

Egy további megvalósítási mód szerint X_1 1-3 aminosav csoportból áll; X_3 jelentése Lys, X_2 jelentése Pro. Egy további megvalósítási mód szerint X_1 1-3 aminosav csoportból áll; X_3 jelentése Asp, X_2 jelentése Lys. Egy további megvalósítási mód szerint X_2 jelentése Pro, X_3 jelentése Lys, és X_1 jelentése 1-2 aminosav csoport, amik közül az egyik Trp vagy Phe.



Egy további megvalósítási mód szerint X_3 jelentése Lys, X_2 jelentése Pro-Thr, és X_1 maximum 15 aminosav csoportot tartalmaz, amiből legalább az egyik Gly. Ebben a megvalósítási módban X_1 tartalmaz egy hasítási helyet a C-terminálison, azaz például egy monobázisos vagy dibázisos (Lys, Arg) hasítási helyet.

Egy specifikus megvalósítási mód szerint a mini C-peptid a Glu-Gly-Lys, Asn-Gly-Lys vagy Asp-Gly-Lys szekvenciát tartalmazza.

A jelen találmány tárgyát képezik továbbá azok a polinukleotid szekvenciák, amik az igénypontokban szereplő inzulin prekurzorokat vagy inzulin prekurzor analógokat kódolják. A jelen találmány tárgyát képezik továbbá azok a vektorok, amik ezeket a polinukleotid szekvenciákat tartalmazzák, valamint az ilyen polinukleotid szekvenciákat vagy vektorokat tartalmazó gazdasejtek.

A jelen találmány tárgya továbbá eljárás inzulin prekurzorok vagy inzulin prekurzor analógok előállítására egy gazdasejtben, azzal jellemezve, hogy az említett eljárásban a következő lépéseket alkalmazzuk:

- a) a találmány szerinti inzulin prekurzorokat vagy inzulin prekurzor analógokat kódoló polinukleotid szekvenciát tartalmazó gazdasejtet az említett prekurzor vagy prekurzor analóg expressziójához szükséges körülmények között tenyésztjük; és
- b) a prekurzort vagy prekurzor analógot izoláljuk a tenyésztő táptalajból

A jelen találmány tárgya továbbá eljárás inzulin vagy inzulin analóg előállítására egy gazdasejtben, azzal jellemezve, hogy az alábbi lépéseket alkalmazzuk:

- a) a találmány szerinti inzulin prekursorokat vagy inzulin prekursor analógokat kódoló polinukleotid szekvenciát tartalmazó gazdasejtet az említett prekursor vagy prekursor analóg expressziójához szükséges körülmények között tenyésztjük;
- b) a prekuzort vagy prekuzor analógot izoláljuk a tenyésztő táptalajból; és
- c) a prekuzort vagy a prekuzor analógot inzulinná vagy inzulin analóggá konvertáljuk egy *in vitro* enzimatis konverziós eljárással.

A jelen találmány egyik megvalósítási módja szerint a gazdasejt élesztő gazdasejt, egy további megvalósítási mód szerint a gazdasejt a *Saccharomyces* nembe tartozik. Egy további megvalósítási mód szerint az élesztő gazdasejt a *Saccharomyces cerevisiae*.

Egy rokon megvalósítási mód szerint egy inzulin prekursor vagy egy inzulin prekursor analóg egy mini C-peptidet tartalmaz, amiben a C-peptid aminosav csoportjai elég flexibilitással rendelkeznek ahhoz, hogy a C-peptid számos geometriai elrendeződést vegyen fel, hogy kialakuljon a B27 CG2 és az A1 CA közötti, 1 Angströmnél kisebb atomtávolság.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a mellékelt ábrákat.

Az 1. ábra a LA19-vezér-EEAEAEAEPAK (2. számú szekvencia)-IP(AlaAlaLys) fúziós fehérjét kódoló pAK721 *Saccharomyces cerevisiae* expressziós plazmidot mutatja be.

A 2. ábrán a kódolt fúziós fehérje a pAK1150 plazmid 4. és 5. számú szekvencia) (α -faktor-vezér-EEAEAEAEPAK (3. számú szekvencia)-Asp^{B28} IP rész DNS szekvenciáját, és az ebből következtetett aminosav szekvenciáját mutatjuk be, amit polimeráz láncreakció templátként használunk.

A 3. ábrán az Asp^{B28}IP(GluTrpLys) fúziós fehérjét kódoló DNS szekvencia látható egy szintetikus mini AspGlyLys (DGK) C-peptiddel, amit randomizált optimalizációval állítottunk elő (6. és 7. számú szekvencia). A mini C-peptidet (EWK) aláhúzással jelöljük.

A 4. ábra az Asp^{B28}IP(AspGlyLys) oldatban felvett struktúráját mutatja, 20 konvergens struktúra együttes gerincvonalaként.

Az 5. ábra az Asp^{B28}IP(AspGlyLys) szalag-prezentációja. Az ábrát MOLSCRIPT programmal állítottuk elő [Kraulis: J. Appl. Crystallog. 24, 946-950 (1991)]. Az aminosavak jelölése a következő: B1-B29 (B lánc), 1-29-es sorszámot kapják, a C1-C1 csoportok (összekötő peptid) a 30-32-es sorszámot kapják, és az A1-A21 csoportok (A lánc) sorszáma 33-53.

A 6. ábra az Asp^{B28}IP(AspGlyLys) ID proton NMR spektruma, 27 °C-on felvéve 1 mmol/l koncentrációban, 10%/90% D₂O/H₂O-ban, 10 mmol/l foszfát pufferrel (pH=8,0).



A 7. ábra a YAP3-TA39-GluGluGlyGluProLys(8. számú szekvencia)-Asp^{B28}IP fúziós fehérjét egy szintetikus mini AspGlyLys (DGK) C-peptiddel (9. és 10. számú szekvencia) expresszázó expressziós kazetta DNS és kikövetkeztetett aminosav szekvenciája.

A 8. ábra a YAP3-TA57- GluGluGlyGluProLys (8. számú szekvencia)-Asp^{B28}IP fúziós fehérjét egy szintetikus mini AspGlyLys (DGK) C-peptiddel (11. és 12. számú szekvencia) expresszázó expressziós kazetta DNS és kikövetkeztetett aminosav szekvenciája.

Az „összekötő peptid” vagy „C-peptid” szakkifejezés egy egyláncú preproinzulin molekula B-C-A polipeptid szekvenciája „C” egységét jelenti. Pontosabban, a természetes inzulin láncban, a C-peptid a B lánc 30-as pozícióját kapcsolja össze az A lánc 1-es pozíciójával. Egy „mini C-peptid” vagy „összekötő peptid”, azaz az itt ismertetettek, a B29-et vagy a B30-at köti össze az A1-gyel, szekvenciája és hossza eltér a természetes C-peptidétől.

Az „IP” kifejezés jelentése egyláncú inzulin prekursor, ami- ben az inzulin desB30 láncát az A láncával köti össze az összekötő peptiden keresztül. Az egyláncú inzulin prekursor helyesen pozicionált diszulfid-hidakat (hármát) tartalmaz, mint a humán inzulinban.

A „desB30” vagy „B(1-29)” kifejezés olyan természetes inzulin B láncot jelent, amiből hiányzik a B30 aminosav csoport, az „A(1-21)” kifejezés jelentése a természetes inzulin A lánc, a „B(1-27)” kifejezés jelentése olyan természetes B lánc, amiből hiányzik

a B28, B29 és B30 aminosav csoport; az „Asp^{B28}IP” kifejezés jelentése egyláncú inzulin prekursor, amiben a B lánc 28-as pozíciójában aszparaginsav van, és nincs benne C-peptid (a B29 az A1-hez kapcsolódik). A mini C-peptidet és aminosav szekvenciáját a hárombetűs aminosav kódban mutatjuk be, az IP után zárójelben; tehát az „Asp^{B28}IP(MetTrpLys)” kifejezés egyláncú inzulin prekursor, amiben a B lánc 28-as pozíciójában aszparaginsav csoport van, és egy Met-Trp-Lys mini C-peptid kapcsolja a B29-et az A1-hez.

Az „inzulin prekursor” szakkifejezés jelentése egyláncú polipeptid, ami egy vagy több kémiai és/vagy enzimatisz eljárással humán inzulinná alakítható.

Az „inzulin prekursor analóg” szakkifejezés olyan jelentése inzulin prekursor molekula, ami a humán inzulin molekulához viszonyítva egy vagy több mutációt, helyettesítést, deléciót és/vagy addíciót tartalmaz az A és/vagy B aminosav láncokban. Az inzulin analógok előnyösen olyanok, amikben egy vagy több természetes aminosav csoportot, előnyösen egyet, kettőt vagy hármat egy másik, kódolható aminosav csoporttal helyettesítünk. Az egyik megvalósítási mód szerint a jelen találmány tárgyát olyan analóg molekulák képezik, amiknek a B lánc természetes humán inzulin molekulához viszonyítva a 28-as pozícióban meg van változtatva. Ebben a megvalósítási módban a 28-as pozíciót a természetes Pro csoportról Asp-ra, Lys-re vagy Ile-re módosítjuk. Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint a B28-as pozícióban levő természetes Pro csoportot Asp csoportra módo-

sítjuk. Egy másik megvalósítási mód szerint a B29-es pozícióban levő Lys csoportot Pro-ra változtatjuk; emellett az A21 pozícióban levő Asn csoportot Ala, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr vagy Val csoportra változtathatjuk, főleg Gly, Ala, Ser vagy Thr csoportra, előnyösen Gly csoportra. Emellett a B3 pozícióban levő Asn csoportot Lys csoportra módosítjuk. Az inzulin prekursor analógok további példái a des(B30) humán inzulin, az olyan inzulin analógok, amikből a Phe^{B1} csoportot kivágtuk; az olyan inzulin analógok, amikben az A lánc és/vagy a B lánc N-terminális extenziót hordoz, és az olyan inzulin analógok, amikben az A lánc és/vagy a B lánc C-terminális extenziót hordoz. Ekkor egy vagy több Arg csoportot adhatunk a B1 pozícióhoz.

A „közvetlenül N-terminális” szakkifejezés azt a helyzetet illusztrálja, amiben egy aminosav csoportot vagy peptidet egy peptidkötéssel közvetlenül a C-terminálisán keresztül egy másik aminosav csoport vagy aminosav szekvencia N-terminálisához kapcsolunk.

Ebben a szövegösszefüggésben az „inzulin funkcionális analógja” és hasonló szakkifejezés azt jelenti, hogy a szóban forgó polipeptidnek a természetes humán inzulinéhez hasonló a biológiai aktivitása.

Az „5 Angströmnél rövidebb” távolság két aminosav csoport között azt jelenti, hogy az atomok közötti legrövidebb távolság 5 Angströmnél kisebb az első aminosav bármelyik atomja és a második aminosav bármelyik atomja között. Az atomok távolságát a

molekula háromdimenziós struktúrája alapján mérjük meg, amit NMR-rel [Wüthrich, K.: NMR of Proteins and Nucleic Acids, Wiley-Interscience, New York (1986)], vagy röntgenkrisztallográfiával [Drenth, J.: Principles of Protein X-ray crystallography, Springer Verlag, Berlin (1994)] állapítunk meg. A két aminosav közötti távolságot azzal a legrövidebb atomok közötti távolsággal mérjük ami az első aminosav bármelyik atomja és a második aminosav bármelyik atomja között van, hacsak külön nem jelezzük az eltérést.

A jelen találmány tárgyát új mini C-peptidek képezik, amik az inzulin B láncának 29-es pozícióját kötik össze az inzulin A láncának 1-es pozíciójával, ezzel élesztő gazdasejtben szignifikánsan nagyobb hozamot eredményezve. A „szignifikánsan megnőtt termelés”, vagy a „szignifikánsan megnőtt fermentációs hozam” és hasonló szakkifejezés azt jelenti, hogy az inzulin prekursor molekula, vagy az inzulin prekursor analóg molekula szekretált mennyisége megnő a tenyészet felülúszójában, az olyan inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg hozamához viszonyítva, ami nem tartalmaz a mini C-peptidben aromás aminosav csoportot. A „megnőtt” fermentációs hozam a kontrollnál nagyobb abszolút értékű szám; a növekedés előnyösen 50%-kal vagy többel nagyobb, mint a kontroll (Asp^{B28}IP) szintje; még előnyösebben, a növekedés 100%-kal, vagy még többel nagyobb, mint a kontroll szint.

A „POT” jelentése a *Schizosaccharomyces pombe* foszfát-izomeráz gén, és a „TPI1” jelentése a *Saccharomyces cerevisiae* triózfoszfát izomeráz génje.

A „vezér(szekvencia)” szakkifejezés alatt egy prepeptidet (szignálpeptid) és egy propeptidet tartalmazó aminosav szekvenciát értünk.

A „szignálpeptid” szakkifejezés jelentése egy olyan pre-peptid, ami N-terminális szekvenciaként van jelen a fehérje prekursor formájában. A szignálpeptid funkciója az, hogy lehetővé teszi, hogy a heterológ fehérje kijusson az endoplazmatikus retikulumba. Ebben a folyamatban a szignálpeptid normális körülmények között lehasad. A fehérjét termelő élesztő szervezethez viszonyítva a szignálpeptid lehet heterológ vagy homológ. A jelen találmány szerinti DNS konstrukcióval használható sok különböző szignálpeptid közé tartozik az élesztő aszpartát proteáz 3 (YAP3) szignálpeptid, vagy ennek bármilyen funkcionális analógja [Egel-Mitani és mtsai: YEAST 6, 127-137 (1990) és az 5,726,038 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás], valamint az MF α 1 gén α -faktor szignálja [Thorner: *In: The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae*, 143-180. oldal, szerk.: Strathern és munkatársai, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1981); és a 4,870,000 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás].

A „propeptid” szakkifejezés jelentése egy olyan polipeptid szekvencia, aminek az a funkciója, hogy lehetővé tegye, hogy az expresszált polipeptid az endoplazmatikus retikulumból a Golgi

készülékbe kerüljön át, majd innen a szekréciós vezikulumokba, hogy azokból a tenyésztő közegbe jusson ki (azaz a polipeptid exportálása a sejtfalon keresztül, vagy legalább a celluláris membránon keresztül az élesztő periplazmatikus terébe). A propeptid lehet az élesztő α -faktor propeptid (lásd a 4,456,082 és 4,870,008 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírást). Egy másik változat szerint a propeptid lehet szintetikus propeptid, ami egy olyan propeptid, ami nem található meg a természetben. Azok a megfelelő szintetikus propeptidek, amiket az 5,395,922; 5,795,746; 5,162,498 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban és a WO 98/32867 számú szabadalmi leírásban ismertettek. A propeptid előnyösen tartalmaz egy endopeptidáz processzási helyet a C-terminális végen, azaz például egy Lys-Arg szekvenciát, vagy ennek bármilyen funkcionális analógiát.

A jelen találmány szerinti polinukleotid szekvenciát előállíthatjuk szintetikusan, a már kidolgozott standard módszerek használatával, azaz például a Beaucage és munkatársai által ismertetett foszforamidit módszerrel [Beaucage és mtsai: Tetrahedron Letters 22, 1859-1869 (1981)], vagy a Matthes és munkatársai által ismertetett módszerrel [Matthes és mtsai: EMBO Journal 3, 801-805 (1984)]. A foszforamidit módszer szerint az oligonukleotidokat egy automata DNS szintetizátorban szintetizáljuk meg, megtisztítjuk, duplexet készítünk belőle, majd összeligáljuk, így kapjuk a szintetikus DNS konstrukciót. A DNS

konstrukció jelenleg előnyben részesített módja a polimeráz láncreakció (PCR).

A jelen találmány szerinti polinukleotid szekvencia lehet kevert genomiális, cDNS és szintetikus eredetű. Például egy vezérpeptidet kódoló genomiális vagy cDNS szekvenciát az A és B láncot kódoló genomiális vagy cDNS szekvenciához kapcsolhatjuk, ezután a DNS szekvenciát egy pontban úgy módosíthatjuk, hogy a homológ rekombinációhoz szükséges aminosav szekvenciát kódoló szintetikus oligonukleotidot építünk be, jól ismert módszerek alkalmazásával, vagy előnyösen a kívánt szekvenciát megfelelő oligonukleotidok alkalmazásával polimeráz láncreakcióval állítjuk elő.

A jelen találmány tárgyát egy olyan vektor képezi, ami képes a kiválasztott mikroorganizmusban vagy gazdasejtben replikálódni, és olyan polinukleotid szekvenciát hordoz, ami a jelen találmány szerinti inzulin prekurzorokat vagy inzulin prekurzor analógokat kódolja. A rekombináns vektor lehet egy autonóm replikációra képes vektor, azaz egy olyan vektor, ami extrakromoszómálisan marad fenn, és replikációja független a kromoszóma replikációjától, azaz például egy plazmid, egy extrakromoszómális elem, egy mini-kromoszóma, vagy egy mesterséges kromoszóma. A vektor bármilyen elemet tartalmazhat az önálló replikációhoz. Egy másik változat szerint a vektor egy olyan vektor lehet, ami, ha bejuttatjuk a gazdasejtbe, a genomba integrálódik, és azzal a kromoszómával együtt replikálódik, amibe integrálódott. Továbbá, egyetlen vektor vagy plazmid,



illetve két vagy több vektor vagy plazmid, amik együtt tartalmazzák a gazdasejt genomjába bejuttatandó összes DNS-t, vagy egy transzpozon használható. A vektor lehet lineáris vagy zárt cirkuláris plazmid, és előnyösen tartalmaz olyan elemeket, amik lehetővé teszik a vektor stabil integrálódását a gazdasejt genomjába, vagy a vektor autonóm, a genomtól független replikációját a sejtben.

Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint a rekombináns expressziós vektor képes élesztőben replikálódni. Például az élesztő 2 μ m-es plazmidjának REP 1-3 replikációs génjei és replikációs origója teszik lehetővé, hogy a vektor replikálódjon élesztőben.

A jelen találmány szerinti vektorok előnyösen tartalmaznak egy vagy több szelekciós markert, amik lehetővé teszik a transzformált sejtek könnyű szelekcióját. A szelekciós marker egy olyan gén, aminek a terméke biocid vagy virális rezisztenciát, nehézfémekkel szembeni rezisztenciát biztosít, az auxotrófokban prototrófiát biztosít, és hasonló hatásai vannak. A bakteriális szelekciós markerek közé tartoznak például a *Bacillus subtilis* vagy a *Bacillus licheniformis* dal génjei, vagy az olyan markerek, amik, antibiotikum rezisztenciát biztosítanak, azaz például ampicillin, kanamicin, kloramfenikol vagy tetraciklin rezisztenciát. A fonalas gombasejtekben használható szelekciós markerek közé tartozik az *amdS* (acetamidáz), az *argB* (ornitin karbamoil-transzferáz, a *pyrG* (orotidin-5'-foszfát dekarboxiláz) és a *trpC* (antranilát szintetáz). Az élesztősejtekben használható markerek közé tartozik az

ADE2, a HIS3, a LEU2, a LYS2, a MET3, a TRP1 és az URA3. Az élesztőben előnyben részesített szelekciós marker a *Schizosaccharomyces pombe* TPI génje [Russell: Gene 40, 125-130 (1985)].

A vektorban a polinukleotid szekvencia működés szempontjából egy megfelelő promoter szekvenciához kötődik. A promoter lehet bármilyen nukleinsav szekvencia, ami transzkripció aktivítással rendelkezik a kiválasztott gazdasejtben, ideértve a mutáns, csonkított és hibrid promotereket, amik olyan génekből állíthatók elő, amik a gazdasejthez viszonyítva homológ vagy heterológ extracelluláris vagy intracelluláris polipeptideket kódolnak.

Egy bakteriális gazdasejtben a transzkripció vezérlésére alkalmas promoterek közé tartoznak azok a promoterek, amik az *Escherichia coli* lac operonból, a *Streptomyces coelicolor* agaráz génből (*dagA*), a *Bacillus subtilis* levánszukráz génből (*sacB*), a *Bacillus licheniformis* alfa-amiláz génből (*amyL*), a *Bacillus stearothermophilus* maltogén amiláz génből (*amyM*), a *Bacillus amiloliquefaciens* alfa-amiláz génből (*amyQ*) és a *Bacillus licheniformis* penicillináz génből (*PenP*) származnak. A transzkripció fonalas gomba gazdasejtben való vezérlésére alkalmas promoterek közé tartoznak azok a promoterek, amiket az *Aspergillus oryzae* TAKA amiláz, a *Rhizomucor miehei* aszpartikus proteáz, az *Aspergillus niger* semleges alfa-amiláz és az *Aspergillus niger* savstabil alfa-amiláz génből származnak. Egy élesztő gazdasejt-

ben használható promoterek közé tartoznak a *Saccharomyces cerevisiae* Malm TPI, ADF vagy PGK promoterei.

A jelen találmány szerinti polinukleotid konstrukciók tipikus esetben működés szempontjából egy megfelelő terminátorhoz vannak kapcsolva. Élesztőben a megfelelő terminátor a TPI terminátor [Alber és mtsai: J. Mol. Appl. Genet. 1, 419-434 (1982)].

A jelen találmány szerinti polinukleotid szekvenciák, azaz a promoter és a terminátor ligálására, valamint ezeknek a megfelelő, az élesztőben való replikációhoz szükséges információkat tartalmazó élesztő vektorokba való inszertálására használt eljárások a szakterületen jártas szakember számára jól ismertek. Az nyilvánvaló, hogy a vektort többféleképpen állíthatjuk elő, azaz például úgy, hogy először előállítjuk a jelen találmány szerinti inzulin prekursorokat vagy inzulin prekursor analógokat kódoló teljes DNS szekvenciát tartalmazó DNS konstrukciót, majd ezt a fragmenst egy megfelelő expressziós vektorba juttatjuk be, vagy úgy, hogy az egyes genetikai elemekre (azaz például szignálpeptid, propeptid, mini C-peptid, A és B lánc) vonatkozó információkat tartalmazó DNS fragmenseket egyenként juttatjuk be, ligálás után.

A jelen találmány tárgyát képezik továbbá rekombináns gazdasejtek is, amik olyan polinukleotid szekvenciát tartalmaznak, ami a jelen találmány szerinti inzulin prekursorokat vagy inzulin prekursor analógokat kódolja. Az ilyen polinukleotid szekvenciát tartalmazó vektort úgy juttatjuk be a gazdasejtbe, hogy a vektor kromoszómális integránsként, vagy autonóm repli-

kációra képes extrakromoszómális vektorként maradjon fenn, az előzőekben ismertetett módon. A „gazdasejt” szakkifejezés a kiindulási sejt bármilyen utódjára vonatkozik, ami nem azonos a kiindulási sejttel, a replikáció során fellépő mutációk miatt. A gazdasejt kiválasztása nagymértékben függ a polipeptidet kódoló géntől és annak forrásától. A gazdasejt lehet egysejtű mikroorganizmus, azaz például prokarióta, vagy nem-egysejtű mikroorganizmus, azaz például eukarióta. A jól használható egysejtű sejtek közé tartoznak a bakteriális sejtek, azaz például a Gram-pozitív baktériumok, beleértve, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a *Bacillus*, a *Streptomyces* sejtet, vagy Gram-negatív baktériumokat, azaz például az *Escherichia coli* és a *Pseudomonas* sp. sejteket. Az eukarióta sejtek lehetnek emlős, rovar, növényi vagy gombasejtek. Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint a gazdasejt egy élesztősejt. A jelen találmány szerinti eljárásban használt élesztő szervezet lehet bármilyen élesztő szervezet, ami a tenyésztés során nagymennyiségben termeli a jelen találmány szerinti inzulin prekurzorokat és inzulin prekurzor analógokat. A megfelelő élesztő szervezetek közé tartozik például a *Saccharomyces cerevisiae*, a *Saccharomyces kluyveri*, a *Schizosaccharomyces pombe*, a *Saccharomyces uvarum*, a *Kluyveromyces lactis*, a *Hansenula polymorpha*, a *Pichia pastoris*, a *Pichia methanolica*, a *Pichia kluyveri*, a *Yarrowia lipolytica*, a *Candida* sp., a *Candida utilis*, a *Candida cacaoi*, a *Geotrichum* sp. és a *Geotrichum fermentans*.

Az élesztősejteket például protoplaszt képzésen keresztül transzformálhatjuk, önmagában ismert módon hajtva végre a transzformációt. A sejtek tenyésztésére használt táptalaj bármelyik, az élesztő szervezetek tenyésztésére hagyományosan használt táptalaj lehet. A jelen találmány szerinti szekretált inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, aminek szignifikáns része a táptalajban lesz, helyesen processzált formában, a táptalajból hagyományos eljárásokkal nyerhető ki, beleértve az élesztősejtek centrifugálással való elválasztását a táptalajtól, az inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg kiszűrését vagy befogását egy ioncserélő mátrixon, vagy fordított fázisú abszorpciós mátrixon, a felülúszó vagy szűrlet fehérjetermészetű anyagainak sókkal, azaz például ammónium-szulfáttal való kicsapását, majd számos különböző kromatográfiás eljárással, azaz például ioncserélő kromatográfiával, affinitáskromatográfiával vagy hasonlókkal való tisztítását.

A jelen találmány szerinti inzulin prekursorok és inzulin prekursor analógok egy N-terminális aminosav csoport extenzióval expresszáltathatók (5,395,922 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás és 765,395A számú európai szabadalmi leírás, amely publikációkat a továbbiakban referenciaként kezelünk). Az extenzió stabilan kötődik a jelen találmány szerinti inzulin prekursorhoz vagy az inzulin prekursor analóghoz, ezzel megvédve az inzulin prekursor vagy az inzulin prekursor analóg N-terminálisát az élesztő proteázok, azaz például a DPAP proteolitikus aktivitásával szemben. Egy N-terminális ex-

tenzió jelenléte az inzulin prekuzoron vagy az inzulin prekuzor analógon azt a célt is szolgálhatja, hogy megvédi az N-terminális aminosav csoportot a fehérje kémiai processzálása során, azaz például egy BOC (t-butyl-oxikarbonil), vagy hasonló védőcsoport helyettesítőjeként.

A N-terminális extenziót egy olyan proteolitikus enzimmal távolíthatjuk el a kinyert inzulin prekuzorról vagy inzulin prekuzor analógról, ami egy bázikus aminosavra (azaz például a lizinre) specifikus, és így a terminális extenzió a Lys csoportnál lehasad. Ilyen proteolitikus enzim például az *Achromobacter lyticus* proteáz.

A tenyésztő táptalajba való szekréció és kinyerés után a jelen találmány szerinti inzulin prekuzort vagy inzulin prekuzor analógot különböző *in vitro* eljárásoknak vetjük alá, hogy eltávolítsuk a lehetséges N-terminális extenzió szekvenciát és a mini C-peptidet, ezzel megkapva az inzulint vagy inzulin analógot. Az ilyen módszerek közé tartozik az enzimes konverzió tripszinnel vagy az *Achromobacter lyticus* proteázzal, egy L-treonin észter jelenlétében, majd az inzulin vagy inzulin analóg treonin észterét bázikus vagy savas hidrolízissel inzulinná vagy inzulin analóggá alakítjuk át, a 4,343,898 vagy 4,916,212 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban és az 1994/487 számú Kutatási Jelentés-ben ismertetett módon, amely publikációkat a továbbiakban referenciaként kezelünk.

Amint azt az alábbiakban ismertetjük, szintetikus C-peptideket tartalmazó IP-eket készítünk, amik egy Gly csoportot tar-

talmaznak (1. példa). A I általános képletű DNS szekvenciákat tartalmazó *Saccharomyces cerevisiae* expressziós plazmidot polimeráz láncreakcióval állítjuk elő, majd *Saccharomyces cerevisiae* gazdasejt transzformálására használjuk. A termelt inzulin analóg mennyiségét az expresszált, mini C-peptid nélküli Asp^{B28}IP (1. táblázat) kontroll szint százalékában mérjük. A jelen találmány szerinti, a mini C-peptidek X₁ szekvenciájában Gly csoportot tartalmazó új C-peptidek a termelési hozamot négyszeresre emelik.

Amint azt az alábbi, 2. példában az Asp^{B28}IP(AspGlyLys)-re ismertetjük, a jelen találmány szerinti mini C-peptidek egy flexibilis régiót eredményeznek a B27 és az A1 között, ami lehetővé teszi, hogy az A1 és a B27 között az atomok távolsága az A1 CA atomja és a B27 CG2 atomja között 5 Angströmnél kisebb legyen. Ennek megfelelően, a jelen találmány tárgyát olyan mini C-konstrukciók képezik, amik az alábbi, 2. példában bemutatott strukturális hatásokat indukálják.

A jelen találmányt az alábbi példák segítségével részletesebben ismertetjük, amik viszont semmilyen módon nem korlátozzák a jelen találmány oltalmi körét. A mellékelt ábrákat a jelen találmány leírása és specifikációja integráns részének tekintjük. Az összes idézett publikáció teljes szövegét referenciának tekintjük.

Példák

Általános eljárások

Minden expressziós plazmid C-POT típusú, az EP 171,142 szabadalmi leírásban ismerttetthez hasonlóan, amiket az jellemmez, hogy a *Schizosaccharomyces pombe* trióz-foszfát izomeráz (POT) gént tartalmazzák, a plazmid szelekciója és *Saccharomyces cerevisiae*-ben való stabilizációja miatt. A plazmidok tartalmazzák a *Saccharomyces cerevisiae* trióz-foszfát izomeráz promotert és terminátort is. Ezek a szekvenciák hasonlítanak a pKFN1003 plazmid (amit a WO 90/100075 számú szabadalmi leírásban ismertettek) megfelelő szekvenciáihoz, azzal az eltéréssel, hogy a vezérszekvencia és az inzulin prekursor termék fúziós fehérjéjét kódoló EcoRI/XbaI fragmensnek más a szekvenciája. Ahhoz, hogy különböző fúziós fehérjéket expresszáljunk, a pKFN1003 plazmid EcoRI-XbaI fragmensét egyszerűen a számunkra érdekes vezérszekvencia-inzulin prekursor fúziót kódoló EcoRI-XbaI fragmenssel helyettesítjük. Az ilyen EcoRI-XbaI fragmenseket standard technikákkal, szintetikus oligonukleotidok és polimeráz láncreakció használatával szintetizálhatjuk meg.

Az élesztő transzformánsokat a *Saccharomyces cerevisiae* MT663 (*MATaIMaTa pep4-3/pep-4-3 HIS4/his4 tpi::LEU2/tpi::LEU2 Cir⁺*) gazdatörzs transzformációjával állítjuk elő. Az MT663 élesztőtörzset a Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen-nél helyeztük letétbe, a WO 92/11378 benyújtásával kapcsolatban, a törzs a DSM 6278 letéti számot kapta.

Az MT663 törzset YPGAL táptalajon (1% Bacto élesztőkivonat, 2% bacto pepton, 2% galaktóz, 1% laktát) tenyésztjük, amíg a sejtsűrűség eléri az $OD_{600}=0,6$ értéket. 100 ml tenyészetet centrifugálunk, 10 ml vízzel mossuk, újra centrifugáljuk, majd 10 ml oldatban reszuszpendáljuk, aminek az összetétele: 1,2 mol/l szorbit, 25 mmol/l Na_2EDTA pH=8,0 és 6,7 mg/ml ditiotreitol. A szuszpenziót 15 percig 30 °C-on inkubáljuk, centrifugáljuk, majd a sejteket 10 ml oldatban reszuszpendáljuk, aminek összetétele: 1,2 mol/l szorbit, 25 mmol/l Na_2EDTA , 0,1 mol/l nátrium-citrát pH=5,8 és 2 mg Novozym 234. A szuszpenziót 30 percig 30 °C-on inkubáljuk, a sejteket centrifugálással összegyűjtjük, majd 10 ml, következő összetételű oldattal: 1,2 mol/l szorbit, 10 ml CAS (1,2 mol/l szorbit, 10 mmol/l $CaCl_2$, 10 mmol/l TRIS-HCl (Tris=tris(hidroximetil)aminometán, pH=7,5) mossuk, majd 2 ml CAS oldatban reszuszpendáljuk. A transzformációhoz 1 ml CAS-ban szuszpendált sejtet keverünk össze körülbelül 0,1 mg plazmid DNS-sel, majd szobahőmérsékleten 15 percig hagyjuk állni. 1 ml 20% polietilén-glikol 4000, 10 mmol/l $CaCl_2$, 10 mmol/l TRIS-HCl pH=7,5 összetételű oldatot adunk hozzá, és a keveréket további 30 percig szobahőmérsékleten hagyjuk állni. A keveréket centrifugáljuk, és az üledéket 0,5 ml 1,2 mol/l szorbit összetételű oldatban reszuszpendáljuk. Ezután 6 ml fedőagart adunk hozzá [SC táptalaj, Sherman és mtsai: Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory (1982)], ami 1,2 mol/l szorbitot plusz 2,5% agart tartalmaz, 52 °C-on, majd a szuszpenziót az azonos

összetételű, agarral szilárdított, szorbitot tartalmazó lemezekre öntjük.

Az expressziós plazmiddal transzformált *Saccharomyces cerevisiae* MT663 törzset 72 óra hosszat 30 °C-on YPD táptalajban szaporítjuk. A tenyészet felülúszójában az inzulin prekursor hozam mennyiségi meghatározását fordított fázisú HPLC elemzéssel hajtjuk végre, külső standardként humán inzulint használva [Snel & Damgaard: „Proinsulin heterogeneity in pigs”, *Horm. Metabol. Res.* 20, 476-488 (1988)].

1. Példa

Gly csoportokat tartalmazó szintetikus C-peptidek készítése

A szintetikus géneket, amik olyan fúziós fehérjéket kódolnak, amik Asp^{B28}-at tartalmaznak egy vezérszekvenciával kapcsolatban, amiben van egy prepeptid (szignálpeptid) és propeptid, polimeráz láncreakcióval állítjuk elő, standard körülmények között [Sambrook és mtsai: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; 2. kiadás, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)], és E.H.F. polimerázzal (Boehringer Mannheim GmbH, Sandhofer Strasse 116, Mannheim, Németország). A kapott DNS fragmenseket izoláljuk és endonukleázzal emésztjük, majd a Gene Clean kit-tel (Bio101 Inc., LaJolla Ca, USA) tisztítjuk. Standard módszereket használunk a DNS ligáláshoz és az *Escherichia coli* sejtek CaCl₂ módszerekkel való transzformálásához [Sambrook és mtsai: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; 2. kiadás, Cold Spring Harbor Press, Cold

Spring Harbor, N.Y. (1989)]. A plazmidokat a transzformált *Escherichia coli* sejtekből QIAGEN oszlopok (QIAGEN, Hilden, Németország) alkalmazásával izoláljuk. A nukleotid-szekvenciákat az ALF Pharmacia Biotech DNS szekvenáló rendszerrel határozzuk meg, tisztított kétszálú plazmid DNS-t használva templátként. A polimeráz láncreakcióhoz az oligonukleotid primereket a DNA technology-tól (Arhus, Dánia) szereztük be.

Az Asp^{B28}IP *Saccharomyces cerevisiae*-ben való szekréciós expresszióját a *Saccharomyces cerevisiae* MT663 törzzsel és a CPOT 2 µm-es élesztő expressziós vektorral (lásd 1. ábra) hajtjuk végre, a szakirodalomban ismertetett módon [Thim, L. és mtsai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 83, 6766-6770 (1986)]. Az élesztő expressziós vektor a *Schizosaccharomyces pombe* trióz-foszfát izomeráz (POT) gént tartalmazza a plazmid szelektálásához és stabilizálásához *Saccharomyces cerevisiae*-ben. Továbbá, a *Saccharomyces cerevisiae* trióz-foszfát izomeráz gén (TPI1) promoterét és terminátorát használjuk a vezérszekvencia-Asp^{B28}IP fúziós fehérjét kódoló rekombináns gén transzkripciójának iniciálására és terminációjára. Az Asp^{B28}IP szekrécióját megkönnyíti az α-faktor vezérszekvencia, bár számos ismert élesztő vezérszekvencia használható.

Amint az az 1. ábrán látható, a *Saccharomyces cerevisiae* pAK721 expressziós plazmidot, ami az LA19 vezérszekvencia-EEAEAEAEPK (2. számú szekvencia)-IP fúziós fehérjét expresszálja, a *Saccharomyces cerevisiae*-*Escherichia coli* ingázó POT

plazmid alapján állítjuk elő (5,871,957 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás). L-IP jelzi a vezérszekvencia-IP fúziós fehérjét kódoló fúziós fehérje expressziós kazettát; a TPI-PROMOTER a *Saccharomyces cerevisiae* TPI1 promoter, a TPI-TERMINÁTOR a *Saccharomyces cerevisiae* TPI1 terminátor; a TPI-POMBE jelzi a *Saccharomyces cerevisiae*-ben szelekcióra használt *Schizosaccharomyces pombe* POT gént; az ORIGIN jelzi a 2 μ m-es plazmidból származó *Saccharomyces cerevisiae* replikációs origót; AMP-R jelzi az ampicillin-rezisztenciát biztosító béta-laktamáz gént, ami megkönnyíti a szelekciót *Escherichia coli*-ban; és pBR322-ORIGO jelzi az *Escherichia coli* replikációs origót.

A vezérszekvenciák és az Asp^{B28} különböző fúziós fehérjeit különböző mini C-peptidekkel kódoló DNS-t polimeráz láncreakcióval állítjuk elő, primerekként a megfelelő oligonukleotidokat használva. Standard módszereket használunk a vezérszekvencia-Asp^{B28} fúziós fehérjét kódoló DNS fragmenseknek a CPOT expressziós vektorba való szubklónozására, az alábbi konfigurációban: vezérszekvencia-Lys-Arg-térkitöltő-Asp^{B28}IP, ahol Lys-Arg egy potenciális kétbázisos endoproteáz processzási hely, és a térkitöltő egy N-terminális extenzió. Ahhoz, hogy a fúziós fehérje *Saccharomyces cerevisiae* Kex2 endoproteázzal való processzálsát optimalizáljuk, a térkitöltő peptidet (N-terminális extenzió) azaz például az EEAEAEAEPAK kódoló DNS-szekvenciát (4. számú szekvencia), inszertáljuk a vezérszekvenciát és az Asp^{B28}IP-t kódoló DNS közé [Kjeldsen és mtsai: Gene 170, 107-112 (1996)]. Azonban térkitöltő peptid jelenléte nem szükséges. Az érett



Asp^{B28} egyláncú, N-terminálisán meghosszabbított inzulin prekurzor formájában, egy mini C-peptiddel, expresszálódik, ami a Lys^{B29}-et és a Gly^{A1}-et köti össze. Az Asp^{B28}IP tisztítása és az N-terminális extenzió, valamint a mini C-peptid proteolitikus eltávolítása után a Lys^{B28}-hez enzimmel közvetített transzpeptidációval hozzáadjuk a Thr^{B30}-at, hogy ezzel előállítsuk az Asp^{B28} humán inzulint [Markussen és mtsai: „Peptides 1986”, 189-194. oldal, szerk.: Theodoropoulos, D.E., Walter de Gruyter & Co., Berlin (1987)].

A szintetikus mini C-peptidek kifejlesztését egy vagy több olyan kodon randomizálásával hajtjuk végre, amik a mini C-peptidben az aminosavakat kódolják. Mindegyik szintetikus mini C-peptid tulajdonsága, hogy a C-terminálison rendelkezik egy enzim processzási hellyel (Lys), ami lehetővé teszi a szintetikus mini C-peptid enzimes eltávolítását (4,916,212 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás, amely publikációt a továbbiakban referenciaként kezelünk). A randomizációt kitalált oligonukleotidokkal hajtjuk végre, amik a szintetikus mini C-peptidek egy vagy több pozíciójába kodonvariációkat visznek be. Tipikus esetben a polimeráz láncreakcióhoz használt egy vagy több primer (oligonukleotidok) kitalált. Az egyik oligonukleotid pár példa, amit a vezérszekvencia-Asp^{B28}IP - randomizált szintetikus mini C-peptidekkel - polimeráz láncreakcióval való generálására használunk, ezt használjuk a következő általános képletű szintetikus mini C-peptidek generálására: Xaa-Gly-Lys (XGK):

A primer:

5'-TAAATCTATAACTACAAAAACACATA-3'

(13. számú szekvencia) és

B primer:

3'-CCAAAGAAGATGTGACTGTTCNNMACCTTCCCATAGCAACTT-
GTTACAACATGAAGATAGACAAGAAACATGGTTAACCTTTTGATGA
CATTGATCAGATCTTTGA-TTC-5'

(14. számú szekvencia), amiben N jelentése A, C, G vagy T, M jelentése C vagy A.

A polimeráz láncreakciót tipikus esetben az alábbiak szerint hajtjuk végre: 5 µl A primer (20 pmol), 5 µl B primer (20 pmol), 10 µl 10× polimeráz láncreakció puffer, 8 µl dNTP keverék, 0,75 µl E.H.F. enzim, 1 µl pAK1150 plazmid templátként (körülbelül 0,2 µg DNS) (3. számú szekvencia), és 70,25 µl desztillált víz.

Tipikus esetben 10-15 ciklust hajtunk végre, egy ciklus tipikus esetben 94 °C 45 másodperc, 55 °C 1 perc, 72 °C 1,5 perc. A polimeráz láncreakció elegyet ezt követően 2%-os agaróz gélre visszük, majd az elektroforézist standard technikákkal hajtjuk végre. A kapott DNS fragmenst kivágjuk az agaróz gélből, majd a Gene Clean kittel izoláljuk.

A 2. ábra mutatja a pAK1150 DNS-t, amit a polimeráz láncreakcióhoz templátként használunk, valamint a pAK1150 (4. és 5. számú szekvencia) által kódolt fúziós fehérje kikövetkeztetett

aminosav szekvenciáját (α -faktor-vezérszekvencia- (EEAEAEAEPK) (3. számú szekvencia)-Asp^{B28}IP. A pAK1150 hasonlít az 1. ábrán bemutatott pAK721-hez. Az α -faktor-vezérszekvenciák C-terminálisát módosítjuk, egy NcoI restriktációs endonukleáz hasítási helyet inszertálva, ami a kikövetkeztetett aminosav szekvenciát SerLeuAsp-ról SerMetAla-ra változtatja. Továbbá, a kódolt Asp^{B28}IP nem rendelkezik mini C-peptiddel, de a Lys^{B29} közvetlenül kapcsolódik a Gly^{A1}-hez.

A tisztított polimeráz láncreakció DNS fragmenst vízben és restriktációs endonukleáz pufferben oldjuk, és a megfelelő restriktációs endonukleázokkal (azaz például BglII és XbaI) emésztjük, standard technikák alkalmazásával. A BglII-XbaI DNS fragmenst agaróz gélelektroforézisnek vetjük alá és a Gene Clean kittel tisztítjuk.

A pAK1150 expressziós plazmidot vagy egy hasonló, CPOT típusú plazmidot (lásd 1. ábra) BglII és XbaI restriktációs endonukleázokkal emésztjük, majd a 10765 nukleotid bázis méretű vektor fragmenst a Gene Clean kittel izoláljuk.

A két emésztett és izolált DNS fragmenst (a vektor fragmenst és a polimeráz láncreakció fragmenst) T4 DNS ligázzal, standard körülmények között összeligáljuk. A ligáló elegyet ezután kompetens *Escherichia coli* törzsbe (R-, M+) transzformáljuk, majd ampicillin-rezisztencia alapján szelektáljuk a transzformánsokat. A kapott *Escherichia coli* klónokból QIAGEN oszlopokkal izoláljuk a plazmidokat.



A plazmidokat ezután megfelelő *Saccharomyces cerevisiae* gazdatörzs, azaz például MT663 (*MATaIMaTa pep4-3/pep-4-3 HIS4/his4 tpi::LEU2/tpi:: LEU2 Cir⁺*) transzformációjára használjuk. Az egyedileg transzformált *Saccharomyces cerevisiae* klónokat folyékony táptalajban szaporítjuk, majd a tenyészet felülúszójába szekretált Asp^{B28}IP mennyiségét fordított fázisú HPLC-vel határozzuk meg. A megnőtt mennyiségű Asp^{B28}IP-t szekretáló *Saccharomyces cerevisiae* klónokból származó expressziós plazmidok szintetikus mini C-peptidet kódoló DNS szekvenciáját meghatározzuk. Ezt követően, az azonosított szintetikus mini C-peptid szekvenciát egy újabb randomizálásos optimalizálásnak vethetjük alá.

Az egyik, vezérszekvencia-Asp^{B28}IP(AspGlyLys) fúziós fehérjét kódoló DNS szekvencia egy olyan szintetikus mini C-peptidet (AspGlyLys) tartalmaz, ami a 3. ábrán bemutatott randomizált optimalizálási eljárásból származik (6. és 7. számú szekvencia).

Az 1. táblázatban azokat az inzulin prekursor analógokat mutatjuk be, amiket az előzőekben említett módszerrel állítottunk elő, és a terméshozamot a kontroll százalékában fejezzük ki. A fermentációt 30 °C-on hajtjuk végre, 72 óra hosszat, 5 ml YPD táptalajban. Az inzulin prekursor hozamát a tenyészet felülúszójának fordított fázisú HPLC-jével határozzuk meg, és a kontroll törzs hozamához viszonyítva fejezzük ki. A táblázatokban „α*” jelentése egy α-faktor vezérszekvencia, amiben a C-terminális a LysArg-ig módosítva van, „SLD-ről (SerLeuAsp)” „SMA-ra

(SerMetAla)”, és „ex4” jelentése N-terminális extenzió, aminek aminosav szekvenciája EEAEAEPK (3. számú szekvencia).

1. Táblázat

vezér-N-terminális extenzió	Prekurzor	mini C-peptid	Hozam*	A szekvencia száma
α^* -ex4	Asp ^{B28} IP	nincs	100	
α^* -ex4	Asp ^{B28} IP	GluGluGlyLys	245	1. számú szekvencia
α^* -ex4	Asp ^{B28} IP	GluGlyLys	350	
α^* -ex4	Asp ^{B28} IP	SerGlyLys	294	
α^* -ex4	Asp ^{B28} IP	AsnGlyLys	341	
α^* -ex4	Asp ^{B28} IP	ThrGlyLys	258	
α^* -ex4	Asp ^{B28} IP	AspGlyLys	428	
α^* -ex4	Asp ^{B28} IP	MetGlyLys	225	
α^* -ex4	Asp ^{B28} IP	AlaGlyLys	243	
α^* -ex4	Asp ^{B28} IP	HisGlyLys	225	
α^* -ex4	Asp ^{B28} IP	TyrGlyLys	214	

2. Példa

Az Asp^{B28}IP(AspGlyLys) szerkezetének meghatározása vizes oldatban, NMR spektroszkópiával

NMR spektroszkópia

A mintákat az NMR-hez úgy készítjük elő, hogy a liofilezett fehérjeport 10/90 D₂O/H₂O elegyben oldjuk (10 mmol/l foszfát puffer), majd a pH-t szükség szerint kismennyiségű 1 mol/l DCl

vagy NaOD hozzáadásával állítjuk be. Minden pH leolvasást az izotóphatásra való korrekció nélkül végzünk. Az NMR-hez az Asp^{B28}IP(AspGlyLys) mintákat 25 $\mu\text{mol/l}$ - mmol/l koncentrációban készítjük el, pH=8,0. Kétdimenziós ^1H - ^1H NMR spektrumokat veszünk fel az 1 mmol/l-es mintákból, DQF-COSY [Piantini és mtsai: Journal of the American Chemical Society 104, 6800-6801 (1982); Rance és mtsai: Biochemical and Biophysical Research Communications 117, 479-485 (1983)], TOCSY [Braunschweiler és mtsai: J. Magn. Reson. 53, 521-528 (1983); Bax és mtsai: J. Magn. Reson. 65, 355-360 (1985)] és NOESY [Jeener és mtsai: J. Chem. Phys. 71, 4546-4553 (1979)] felvételeket készítünk 600 MHz-en egy Varian Unity Inova NMR spektrométeren, ami $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ tripla rezonancia próbával van felszerelve, valamint egy önmagát árnyékoló háromtengelyű gradiens tekerccsel, a Varian felhasználói könyvtárból származó standard impulzus szekvenciákkal. A működési hőmérséklet 27 °C volt. Minden egyes fázis-érzékeny kétdimenziós NMR spektrumhoz 512 t_1 növekményre volt szükség, mindegyik 2048 vagy 4096 reális adatponttal, a TPI-States módszer szerint [Marion és mtsai: J. Magn. Reson. 85, 393-399 (1989)]. Mindkét dimenzióban 6983 Hz spektrális szélességet használunk, a hordozót pontosan a víz rezonanciára helyezve, amit telítettünk, vagy a letapogatások között 1,5 másodpercig telítve, vagy gradiens-illesztett gerjesztési impulzus szekvenciával szelektíven gerjesztve [WATERGATE, Piotto és mtsai: J. Biomol. NMR 2, 661-665 (1992)]. A DQFCOSY spektrumokat gradiens fokozott

verzióval rögzítettük, mágikus-látószög gradiensek használatával [Mattiello és mtsai: Journal of the American Chemical Society 118, 3253-3261 (1996)]. A TOCSY spektrumokhoz 30 és 80 ms közötti keverési időket használtunk, és a NOESY-hez a keverési idő 50 és 200 ms között volt.

A kétdimenziós NMR spektrumok feldolgozását az Xwinnmr szoftvercsomaggal hajtottuk végre (2.5-ös verzió, NMR feldolgozó szoftver a Bruker Analytische Messtechnik GmbH-től, D-76275 Ettlingen, Németország). Mindegyik dimenziót eltolt szinusz-harang apodizációval dolgoztuk fel, és a zéró feltöltést mindegyik dimenzióban egyszer hajtottuk végre. Az alapvonal korrekciókat szükség esetén alkalmaztuk, az Xwinnmr standard eljárások használatával. A spektrális hozzárendelést, a csúcsok közötti integrálást, a szekvencia-specifikus hozzárendelést, a sztereo-specifikus hozzárendelést és minden más könyvelést a PRONTO szoftverrel hajtottuk végre (PRONTO software Development és Distribution, Koppenhága, Dánia) [Kjaer és mtsai: NATI ASI Series, szerk.: Hoch, J. C., Redfield, C. & Poulsen, F. M., Plenum, New York (1991)]. A kémiai eltolódásokat ppm-ben mérjük, a víz rezonanciáját 4,75 ppm-re állítjuk.

Szerkezet-számítások

A távolsági korlátozásokat az utánuk következő szerkezet-számításokhoz integrált NOESY kereszt-csúcsokból kapjuk, amiket gyenge, közepes vagy erős osztályba sorolunk, attól függően, hogy a felső távolsági korlátozás 5,5, 3,3 vagy 2,7 Angström.



A metil-csoportokra vonatkozó távolsági korlátozások esetében további 0,5 Angströmöt adunk a felső korláthoz [Wagner és mtsai: *Journal of Molecular Biology* 196, 611-639 (1985)]. A szerkezet-számításokat a hibrid módszerrel hajtottuk végre, kombinálva a távolsági geometriát [Crippen és mtsai: *Distance Geometry and Molecular Conformation*, Research Studies Press, Taunton, Soemrset, Nagy-Britannia (1988); Kuszewski és mtsai: *J. Biomol. NMR* 2, 33-56 (1992)] és a szimulált illeszkedést, Nilges és munkatársai elképzelése alapján [Nilges és mtsai: *FEBS Letters* 229, 317-324 (1989)], az X-PLOR 3.0 használatával [Brünger: *X-PLOR Version 3.1: A System for X-ray Crystallography and NMNR*, Yale University Press, New Haven (1992)], az X-PLOR kézikönyvben megadott példáknak megfelelően (dg_sub_embed.inp, dg_sa.inp, refine.inp). A csoportok számozása a standard inzulin csoportok számozására alapul, a B láncban levő csoportok sorszáma B1-B29, a C-peptidben (azaz például AspGlyLys) levő csoportok sorszáma C1-C1, és az A láncban levő peptidek sorszáma A1-A21.

Az NMR spektrumok spektrális hozzárendelése a legtöbb rezonancia esetében a standard szekvenciális hozzárendelési eljárást követi, amit Wüthrich publikált [Wüthrich: *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley New York (1986)]. A standard hozzárendelési eljárás csődöt mond, ha egy bizonyos aminosav csoport amid protonja túl gyorsan kicserélődik a víz protonjaival. pH=8,0 értéken ez számos aminosav csoport esetében megtörténik, ha összehasonlítjuk a korábbi mutáns inzulin NMR

spektrális hozzárendelésekkel, és a térben szomszédos aminosav csoportok NOE-ken keresztül való azonosítása majdnem teljes spektrális hozzárendelést eredményez. A NOESY spektrumok elemzése azt mutatta, hogy számos aminosav csoportnak van NOE hálózata a környező csoportokkal, ami hasonlít ahhoz, amit korábban már más inzulin molekulák, például a humán inzulin His^{B16} mutáns esetében meghatároztak [Ludvigsen és mtsai: *Biochemistry* 33, 7998-8006 (1994)], és ezek a hasonló kapcsolatok megtalálhatók a B1-B10, B13-B14, B17-B24 és A4-A21 csoportok esetében. Emellett a trihedrális korlátozások a fent említett csoportokra adoptálva vannak, a mások által korábban használtak közül [Ludvigsen és mtsai: *Biochemistry* 33, 7998-8006 (1994)].

Számos aminosav, főleg a B27-B29, C1-C3, A1-A3 kereszt-csúcs mintázatot mutat, ami összhangban van az olyan peptid láncokkal, amik kevésbé rendezettek, mint az általában jól definiált szekunder szerkezeti elemek. Így a további NOE-eket távolság-korlátozásokká alakítottuk, mindenféle további osztályozás nélkül, azaz a felső korlát 5,5 Angström illetve 6,0 Angström, ha metilcsoport van jelen. 20 konvergáló struktúra együttesét (5. ábra) számítjuk ki, és a konvergáló struktúrákkal releváns paramétereket a 2. táblázatban soroljuk fel. Mindegyik NOE-t, ami itt azonos egy távolság korlátozással, csak egyszer vesszük figyelembe, bár a NOESY spektrumban többször is előfordulhat. A Ramachandran ábrázolások minőség-bebecslés standard minőségi paraméter, amivel a lokális geometria minő-

ségét lehet kiértékelni. Az ismertetett minőségi paraméterek általában összehasonlíthatók egy 2,5 Angström felbontású, röntgensugárzás alapú fehérje-struktúrával [Laskowski és mtsai: J. Biomol. NMR 8, 477-486 (1996)].

2. Táblázat

Szerkezeti minőség becslése		Asp ^{B28} IP(AspGlyLys)
A NOE-k száma	Összes	913
	Intra	454
	rövid távú (5 csoport-pozíció távolságon belül, de nem intra NOS-k)	294
	hosszú távú (több mint 5 csoport-pozíció távolságra)	162
A NOE-k megsértése > A (20 struktúra átlaga)		0
A NOE megsértések RMS-e		0,020(±0,002) Å
Dihedrális szög korlátozások RMS-e		0,32(±0,12)°
Eltérés az ideális geometriától	helytelenek	0,37(±0,05)°
	szögek	0,43(±0,03)°
	Kötések	0,0034(±0,0002 Å)

Ramachandran ábrázolás (Prochek, Laskowski és munkatársai 1996)	előnyben részesített régiók	76,1%
	További engedélyezett régiók	20,8%
	általánosan engedélyezett régiók	2,2%
	nem engedélyezett régiók	1,0%

A számított struktúra leírása

Az együttes átlagára leginkább hasonlító reprezentatív struktúrát mutatjuk be az 5. ábrán. Az Asp^{B28}IP(AspGlyLys) szerkezetileg hasonlít a természetes inzulin struktúrájának azokra a régióira, amik a B1-B10, B14-B23, A4-A21 csoportokat tartalmazzák. A különbségek a leginkább az összekötő peptid szomszédságában nyilvánulnak meg, a B26-29, C1-C3, A1-A3 pozíciókban, és legkevésbé a B11-B13 régiókban nyilvánulnak meg. Az Asp^{B28}IP(AspGlyLys) struktúrája oldatban a C-peptid közelében jelentősen eltér a természetes struktúrától [Ludvigsen és mtsai: Biochemistry 33, 7998-8006 (1994)], és a kristály-fázisban az Asp^{B28}IP(AlaAlaLys) struktúrától [Wittingham és mtsai: Biochemistry 37, 11516-11523 (1998)]. Az Asp^{B28}IP(AspGlyLys) összekötő peptid a pontosság szerint gyengén meghatározott, de a NOESY spektrumokból (a Thr^{B27} és Gly^{C2}, valamint a Thr^{B27} és

a Gly^{A1} közötti NOESY-k) kapott néhány strukturális korlátozás világosan jelzi a C-peptid fontos strukturális elrendeződését. A viszonylag erős NOE-k a Thr^{B27} (metilcsoport HG2) és a Gly^{C2} (HA atom) és a Thr^{B27} (metilcsoport HG2) valamint a Gly^{A1} (HA atom) között a flexibilis régiókban azt mutatják, hogy ezek a proton-párok térben egymáshoz közel vannak (<5 Angström). A Thr^{B27}, a Gly^{C2} és a Gly^{A1} közötti szoros elrendeződés, amit a B27 (CG2) és az A1 (CA) közötti, 5 Angströmnél kisebb atomtávolság definiál, ami korábban nem volt látható egyetlen egyláncú inzulin molekulában sem, azt mutatja, a C-peptid felveszi ezt a szerkezeti elrendeződést, és tény, hogy a C-peptid számos különböző módon megteheti ezt, és úgy tűnik, hogy ez a C-peptid előfeltétele. Az azonban világos, hogy a glicin jelenléte az összekötő peptidben nagyobb flexibilitást biztosít az összekötő peptidnek, és ennek következtében kevesebb strukturális korlátozás érvényes a szomszédos aminosavakra, amikor megpróbálják felvenni az optimális elrendeződést az inzulin molekula többi részével. Másodszor, az Asp^{B28}, Lys^{B28}, Asp^{C1} és Lys^{C3} töltött oldalláncok elrendeződése erősen poláros felszínt biztosít, a többi összekötő peptiddel összehasonlítva.

Az NMR felvételénél használt körülmények között Asp^{B28}IP(AspGlyLys) spektrumát bizonyos mértékig befolyásolja az ön-asszociáció, de a monomer és a dimer közötti csere az NMR időskáláján csak a két állapot közötti átlag képében figyelhető meg. 0,2 mmol/l koncentráció alatt az ön-asszociáció mértéke nem változik, amint az az NMR-en még alacsonyabb koncentrá-

cióban is (legalábbis 25 $\mu\text{mol/l}$ -ig) látható. A 3. táblázat az Asp^{B28}IP(AspGlyLys) kémiai eltolódásait mutatja 27 °C-on, 600 MHz-en, pH=8, 10%/90% D₂O/H₂O-ban készített 10 mmol/l foszfát pufferben. A kémiai eltolódásokat a 4,75 ppm-re állított reziduális víz jelhez viszonyítjuk. N/A azt jelenti, hogy nincs hozzárendelés. Az Asp^{B28}IP(AspGlyLys) hozzárendelések (1-29=B1-B29; 30-32=C1-C3 és 33-53=A1-A21). A 4. táblázat adja meg az Asp^{B28}IP(GlyLysLys) atom-koordinátáit PDB formátumban. Az összeállítás reprezentálására kiválasztott struktúra (5. ábra és a 4. táblázat atom-koordinátái) 84,8% csoportot tartalmaz a ramachandran ábrázolás „előnyben részesített” régióiban és 15,2%-ot a „még megengedett” régiókban, a 2. táblázatban ismertetett módon.

3. Táblázat

Spin rendszer HN	HA	Más:
Phe-1	4.52	HB#a: N/A, HB#b: 2.992, HD#: 7.087, HE#: 7.203, HZ: 7.195
Val-2	7.70 3.99	HH: 1.912, HG#a: 0.797, HG#b: N/A
Asn-3	4.50	HB#a: 2.989, HB#b: 2.321, HD2#a: 7.372, HD2#b: 6.920
Glu-4	4.38	HS#a: 1.999, HH#b: 2.103
His-5	4.31	HB#a: 3.319, HB#b: 2.978, HD2: 6.798, HEI: 7.595
Leu-6	9.99	HH#a: 1.698, HB#b: N/A, HG: 1.503, HD#a: 0.755, HD#b: 0.662
Cys-7	8.28 4.87	HB#a: 2.925, HB#b: 3.143
Gly-8	3.94, 3.76	
Ser-9	9.05	HB#: 3.812
His-10	8.55 4.38	HB#a: 3.124, HH#b: 3.282, HD2: 7.081, HEI: 7.708
Leu-11	6.93 3.85	HB#a: 1.749, HB#b: 1.175, HG: 1.222, HD#a: 0.602, HD#b: 0.722
Val-12	7.02 3.17	HB: 2.031, HG#a: 0.970, HG#b: N/A
Glu-13	7.84 3.97	HB#a: 2.025, HG#a: 2.222, HG#b: 2.383
Ala-14	7.55 3.94	HB#: 1.253
Leu-15	7.91 3.59	HB#a: 0.905, HB#b: 0.067, HG: 1.075, HD#a: 0.377, HD#b: -0.051
Tyr-16	8.10 4.30	H8#a: 3.069, HD#: 7.193, HE#: 6.771
Leu-17	7.66 4.02	HB#a: N/A, HB#b: 1.849, HG: 1.712, HD#a: 0.892, HD#b: 0.872
Val-18	8.27 3.68	HB: 1.882, HG#a: 0.995, HG#b: 0.792
Cys-19	8.69 4.76	HB#a: 2.759, HB#b: 3.254
Gly-20	7.78 3.90, 3.76	



Arg-22	8.03	9.08	HB#a:1.801, HH#b:1.845, HG#a:2.041, HG#b:2.088, HD#a:3.352, HD#b:3.280
Gly-23	7.23	9.07, 3.67	
Phe-24	7.37	5.37	HH#a: 2.857, HB#b: 3.013, HD#: 6.502, HE#: 6.688, HZ: 6.944
Phe-25	8.51	9.87	HB#a: 3.151, HB#b: 3.321, HD#: 7.162, HE#: 7.073
Tyr-26	8.17	4.69	HH#a: 2.920, HH#b: 3.168, HD#: 7.029, HE#: 6.662
Thr-27	7.80	5.06	HB: 3.965, HG2#: 1.198
Asp-28	8.43	4.50	HH#a: 2.764, HB#b: 2.660
Lys-29			
Asp-30	8.06	4.76	HB#a: 2.615, HH#b: 2.821
Gly-31	8.15	4.14, 3.58	
Lys-32			
Gly-33		4.03, 4.87	
Ile-34	8.16	3.78	HH: N/A, HG1#a: 0.730, HG1#b: 0.885, HG2#: 0.722, HD#:0.395
Val-35	8.08	3.54	HH: 1.966, HB: N/A, HG#a: 0.862, HG#b: 0.957
Glu-36	8.23	4.11	HB#a: 2.094, HG#a: 2.249
Gln-37	7.79	4.09	HB#: N/A, HG#: N/A
Cys-38	8.11	5.09	HH#a: 3.273, HH#b: 2.695
Cys-39	8.33	4.86	HB#a: 3.732, HB#b: 3.275
Thr-40		9.06	HH: 4.402, HG2#: 1.188
Ser-41	7.23	4.62	HB#a: 3.732, HH#b: 3.874
Ile-42	7.74	4.18	HB: 1.488, HG1#a: 1.038, HG2#: 0.604, HD#: 0.496
Cys-43	9.61	4.95	HB#a: 3.125
Ser-44	8.52	4.58	HB#a: 9.084, HB#b: 3.930
Leu-45		3.88	HB#a: N/A, HH#b: 1.452, HG: 1.543, HD#a: 0.812, HD#b: 0.750
Tyr-46	7.58	9.28	H8#a: 2.956, HD#: 7.074, HE#: 6.806 I
Gln-47	7.93	3.95	HB#a: 2.287, HB#b: 1.983, HG#a: 2.382, HG#b: 2.140
Lau-48	7.70	3.99	HB#a: 1.905, HB#b: 1.329, HG: 1.658, HD#a:0.666,HD#b: 0.614
Glu-49	7.82	9.15	HB#a: N/A, HB#b: 1.946, HG#a: 2.307, HG#b: 2.171
Asn-50	7.27	4.49	HH#a: 2.716, HB#b: 2.592
Tyr-51	7.88	3.94	HS#a: 3.534, HB#b: 2.573, HD#: 7.192, HE#: 6.682
Cys-52	7.03	5.10	HH#a: 2.711, HH#b: 3.231
Asn-53	7.88	4.46	HH#a: 2.475, HH#b: 2.683, HD2#a: 7.980, HD2#b: 6.549

4. Táblázat

ATOM	1	CA	PHE	1	5.563	-10.343	1.925	1.00	0.00
ATOM	2	HA	PHE	1	5.191	-11.286	1.550	1.00	0.00
ATOM	3	CB	PHE	1	4.581	-9.224	1.558	1.00	0.00
ATOM	4	HB1	PHE	1	5.131	-8.325	1.323	1.00	0.00
ATOM	5	HB2	PHE	1	3.923	-9.037	2.393	1.00	0.00
ATOM	6	CG	PHE	1	3.765	-9.641	0.357	1.00	0.00
ATOM	7	CD1	PHE	1	3.789	-8.866	-0.809	1.00	0.00
ATOM	8	HD1	PHE	1	4.392	-7,970	-0.851	1.00	0.00

ATOM	9	CD2 PHE	1	2.985	-10.8000.410	1.00 0.00
ATOM	10	HD2 PHE	1	2.968	-11,3971.311	1.00 0.00
ATOM	11	CE1 PHE	1	3.033	-9.253 -1.921	1.00 0.00
ATOM	12	HE1 PHE	1	3.052	-8.657 -2.822	1.00 0.00
ATOM	13	CE2 PHE	1	2.229	-11.187-0.701	1.000.00
ATOM	14	HE2 PHE	1	1.627	-12.083-0.658	1.000.00
ATOM	15	CZ PHE	1	2.252	-10.414-1.867	1.000.00
ATOM	16	HZ PHE	1	1.670	-10.713-2.726	1.000.00
ATOM	17	C PHE	1	6.925	-10.0491.295	1.00 0.00
ATOM	18	O PHE	1	7.945	-10.0881.957	1.00 0.00
ATOM	19	N PHE	1	5.702	-10.4163.406	1.00 0.00
ATOM	20	HT1 PHE	1	6.005	-9.491 3.772	1.00 0.00
ATOM	21	HT2 PHE	1	6.412	-11.1363.653	1.00 0.00
ATOM	22	HT3 PHE	1	4.787	-10.6723.829	1.00 0.00
ATOM	23	N VAL	2	6.993	-9.757 0.020	1.00 0.00
ATOM	24	HN VAL	2	6.105	-9.735 -0.486	1.00 0.00
ATOM	25	CA VAL	2	8.231	-9.458 -0.667	1.00 0.00
ATOM	26	HA VAL	2	9.024	-10.032-0.210	1.000.00
ATOM	27	CB VAL	2	8.122	-9.830 -2.148	1.00 0.00
ATOM	28	HB VAL	2	7.420	-9.167 -2.633	1.00 0.00
ATOM	29	CG1 VAL	2	9.494	-9.691 -2.810	1.00 0.00
ATOM	30	HG11VAL	2	9.807	-8.658 -2.773	1.00 0.00
ATOM	31	HG12VAL	2	9.431	-10.012-3.840	1.000.00
ATOM	32	HG13VAL	2	10.211	-10.304-2.285	1.000.00
ATOM	33	CG2 VAL	2	7.638	-11.275-2.277	1.000.00
ATOM	34	HG21VAL	2	6.763	-11.917-1.660	1.000.00
ATOM	35	HG22VAL	2	8.418	-11.948-1.954	1.000.00
ATOM	36	HG23VAL	2	7.389	-11.481-3.308	1.000.00
ATOM	37	C VAL	2	8.592	-7.967 -0.542	1.00 0.00
ATOM	38	O VAL	2	7.869	-7.135 -1.120	1.00 0,00
ATOM	39	N ASN	3	9.562	-7.624 0.206	1.00 0,00
ATOM	40	HN ASN	3	10.089	-8.316 0.658	1.00 0,00
ATOM	41	CA ASN	3	9.926	-6.186 0.370	1.00 0.00
ATOM	42	HA ASN	3	9.083	-5.644 0.771	1.00 0.00

ATOM	43	CB	ASN	3	11.112	-6.067	1.329	1.00	0.00
ATOM	44	HB1	ASN	3	11.492	-5.057	1.310	1.00	0.00
ATOM	45	HB2	ASN	3	11.892	-6.752	1.025	1.00	0.00
ATOM	46	CG	ASN	3	10.659	-6.911	2.748	1.00	0.00
ATOM	47	OD1	ASN	3	9.911	-7.350	2.949	1.00	0.00
ATOM	98	ND2	ASN	3	11.070	-5.683	3.748	1.00	0.00
ATOM	49	HD21	ASN	3	11.669	-9.925	3.586	1.00	0.00
ATOM	50	HD22	ASN	3	10.781	-5.894	4.660	1.00	0.00
ATOM	51	C	ASN	3	10.308	-5.602	-0.991	1.00	0.00
ATOM	52	O	ASN	3	11.414	-5.782	-1.466	1.00	0.00
ATOM	53	N	GLN	4	9.395	-4.909	-1.623	1.00	0.00
ATOM	54	HN	GLN	4	8.512	-4.784	-1.217	1.00	0.00
ATOM	55	CA	GLN	4	9.688	-4.313	-2.957	1.00	0.00
ATOM	56	HA	GLN	4	10.705	-3.950	-2.973	1.00	0.00
ATOM	57	CB	GLN	9	9.509	-5.381	-4.038	1.00	0.00
ATOM	58	HB1	GLN	4	8.468	-5.655	-4.103	1.00	0.00
ATOM	59	HB2	GLN	4	10.096	-6.249	-3.779	1.00	0.00
ATOM	60	CG	GLN	9	9.977	-4.834	-5.389	1.00	0.00
ATOM	61	HG1	GLN	4	10.940	-4.358	-5.272	1.00	0.00
ATOM	62	HG2	GLN	4	9.260	-4.114	-5.754	1.00	0.00
ATOM	63	CD	GLN	4	10.102	-5.986	-6.387	1.00	0.00
ATOM	64	OE1	GLN	4	9.108	-6.515	-6.849	1.00	0.00
ATOM	65	NE2	GLN	4	11.285	-6.401	-6.744	1.00	0.00
ATOM	66	HE21	GLN	4	12.086	-5.975	-6.373	1.00	0.00
ATOM	67	HE22	GLN	4	11.374	-7.140	-7.381	1.00	0.00
ATOM	68	C	GLN	4	8.728	-3.150	-3.217	1.00	0.00
ATOM	69	O	GLN	4	7.710	-3.016	-2.564	1.00	0.00
ATOM	70	N	HIS	5	9.053	-2.304	-9.160	1.00	0.00
ATOM	71	HN	HIS	5	9.883	-2.434	-4.665	1.00	0.00
ATOM	72	CA	HIS	5	8.175	-1.136	-4.467	1.00	0.00
ATOM	73	HA	HIS	5	7.882	-0.660	-3.543	1.00	0.00
ATOM	74	CB	HIS	5	8.952	-0.133	-5.327	1.00	0.00
ATOM	75	HB1	HIS	5	8.355	0.752	-5.481	1.00	0.00
ATOM	76	HB2	HIS	5	9.190	-0.582	-6.281	1.00	0.00

ATOM	77	CG	HIS	5	10.221	0.235	-4.607	1.00	0.00
ATOM	78	ND1	HIS	5	10.323	1.365	-3.815	1.00	0.00
ATOM	79	HD1	HIS	5	9.636	2.051	-3.698	1.00	0.00
ATOM	80	CD2	HIS	5	11.431	-0.401	-4.505	1.00	0.00
ATOM	81	HD2	HIS	5	11.691	-1.314	-5.005	1.00	0.00
ATOM	82	CE1	HIS	5	11.553	1.366	-3.267	1.00	0.00
ATOM	83	HE1	HIS	5	11.906	2.105	-2.570	1.00	0.00
ATOM	84	NE2	HIS	5	12.270	0.312	-3.659	1.00	0.00
ATOM	85	C	HIS	5	6.922	-1.614	-5.206	1.00	0.00
ATOM	86	O	HIS	5	6.951	-2.590	-5.931	1.00	0.00
ATOM	87	N	LEU	6	5.819	-0.941	-5.005	1.00	0.00
ATOM	88	HN	LEU	6	5.824	-0.170	-4.403	1.00	0.00
ATOM	89	CA	LEU	6	4.546	-1.353	-5.667	1.00	0.00
ATOM	90	HA	LEU	6	4.633	-2.370	-6.017	1.00	0.00
ATOM	91	CB	LEU	6	3.398	-1.259	-4.658	1.00	0.00
ATOM	92	HB1	LEU	6	2.510	-1.694	-5.086	1.00	0.00
ATOM	93	HB2	LEU	6	3.213	-0.219	-4.425	1.00	0.00
ATOM	99	CG	LEU	6	3.766	-2.012	-3.378	1.00	0.00
ATOM	95	HG	LEU	6	4.726	-1.669	-3.022	1.00	0.00
ATOM	96	CD1	LEU	6	2.702	-1.755	-2.306	1.00	0.00
ATOM	97	HD11	LEU	6	2.518	-2.664	-1.752	1.00	0.00
ATOM	98	HD12	LEU	6	1.786	-1.429	-2.775	1.00	0.00
ATOM	99	HD13	LEU	6	3.052	-0.989	-1.629	1.00	0.00
ATOM	100	CD2	LEU	6	3.837	-3.510	-3.681	1.00	0.00
ATOM	101	HD21	LEU	6	4.620	-3.694	-4.401	1.00	0.00
ATOM	102	HD22	LEU	6	2.891	-3.840	-4.083	1.00	0.00
ATOM	103	HD23	LEU	6	4.050	-4.052	-2.771	1.00	0.00
ATOM	109	C	LEU	6	4.239	-0.428	-6.898	1.00	0.00
ATOM	105	O	LEU	6	3.838	0.706	-6.667	1.00	0.00
ATOM	106	N	CYS	7	4.4A8	-0.908	-8.052	1.00	0.00
ATOM	107	HN	CYS	7	4.721	-1.830	-8.171	1.00	0.00
ATOM	108	CA	CYS	7	4.113	-0.063	-9.246	1.00	0.00
ATOM	109	HA	CY3	7	3.509	0.781	-8.947	2.00	0.00
ATOM	110	HB1	CYS	7	5.206	1.052	-10.719	1.00	0.00



ATOM	111	H82	CYS	7	6.026	-0.406	-10.157	1.00	0.00
ATOM	112	C	CYS	7	3.348	-0.893	-10.279	1.00	0.00
ATOM	113	O	CYS	7	3.726	-2.004	-10.597	1.00	0.00
ATOM	114	C8	CYS	7	5.422	0.438	-9.857	1.00	0.00
ATOM	115	SG	CYS	7	6.321	1.417	-8.626	1.00	0.00
ATOM	116	N	GLY	8	2.272	-0.359	-10.798	1.00	0.00
ATOM	117	HN	GLY	8	1.989	0.538	-10.520	1.00	0.00
ATOM	118	CA	GLY	B	1.470	-1.108	-11.809	1.00	0.00
ATOM	119	HA1	GLY	8	2.057	-1.925	-12.201	1.00	0.00
ATOM	120	HA2	GLY	8	1.195	-0.442	-12.616	1.00	0.00
ATOM	121	C	GLY	8	0.206	-1.665	-11.152	1.00	0.00
ATOM	122	O	GLY	8	-0.493	-0.968	-10.441	1.00	0.00
ATOM	123	N	SER	9	-0.091	-2.917	-11.390	1.00	0.00
ATOM	124	HN	SER	9	0.492	-3.453	-11.968	1.00	0.00
ATOM	125	CA	SER	9	-1.309	-3.534	-10.788	1.00	0.00
ATOM	126	HA	SER	9	-2.073	-2.781	-10.672	1.00	0.00
ATOM	127	CB	SER	.9	-1.822	-4.640	-11.711	1.00	0.00
ATOM	128	HB1	SER	9	-1.181	-5.508	-11.621	1.00	0.00
ATOM	129	HB2	SER	9	-1.810	-4.293	-12.731	1.00	0.00
ATOM	130	OG	SER	9	-3.154	-4.977	-11.346	1.00	0.00
ATOM	131	HG	SER	9	-3.683	-5.002	-12.147	1.00	0.00
ATOM	132	C	SER	9	-0.972	-4.139	-9.415	1.00	0.00
ATOM	133	O	SER	9	-1.845	-4.340	-8.594	1.00	0.00
ATOM	134	N	HIS	10	0.284	-4.419	-9.164	1.00	0.00
ATOM	135	HN	HIS	10	0.969	-9.248	-9.841	1.00	0.00
ATOM	136	CA	HIS	10	0.677	-5.009	-7,849	1.00	0.00
ATOM	137	HA	HIS	10	0.159	-5.946	-7.710	1.00	0.00
ATOM	138	CB	HIS	10	2,188	-5.262	-7.841	1.00	0.00
ATOM	139	HB1	HIS	10	2.988	-5.607	-6.863	1.00	0.00
ATOM	190	HB2	HIS	10	2.705	-4.342	-8.070	1.00	0.00
ATOM	141	CG	HIS	10	2.548	-6.305	-8.872	1.00	0.00
ATOM	142	ND1	HIS	10	1.608	-6.886	-9.715	1.00	0.00
ATOM	143	HD1	HIS	10	0.648	-6.690	-9.733	1.00	0.00
ATOM	144	CD2	HIS	10	3.750	-6.882	-9.204	1.00	0.00



ATOM	195	HD2	HIS	10	9.697	-6.655	-8.738	1.00	0.00
ATOM	146	CE1	HIS	10	2.255	-7.766	-10.500	1.00	0.00
ATOM	147	HE1	HIS	10	1.775	-8.370	-11.255	1.00	0.00
ATOM	148	NE2	HIS	10	3.562	-7.802	-10.231	1.00	0.00
ATOM	149	C	HIS	10	0.314	-4.052	-6.702	1.00	0.00
ATOM	150	O	HIS	10	0.243	-4.455	-5.557	1.00	0.00
ATOM	151	N	LEI11	11	0.089	-2.792	-6.994	1.00	0.00
ATOM	152	HN	LEU	11	0.156	-2.485	-7.921	1.00	0.00
ATOM	153	CA	LEU	11	-0.264	-1.813	-5.918	1.00	0.00
ATOM	154	HA	LEI11	11	0.542	-1.764	-5.202	1.00	0.00
ATOM	155	CB	LEU	11	-0.474	-0.420	-6.548	1.00	0.00
ATOM	156	HB1	LEU	11	-1.303	-0.471	-7.239	1.00	0.00
ATOM	157	HB2	LEU	11	0.417	-0.143	-7.090	1.00	0.00
ATOM	158	CG	LEU	11	-0.771	0.668	-5.484	1.00	0.00
ATOM	159	HG	LEU	11	-0.601	1.639	-5.929	1.00	0.00
ATOM	160	CD1	LEU	11	-2.235	0.588	-5.040	1.00	0.00
ATOM	161	HD11	LEU11		-2.305	0.002	-4.134	1.00	0.00
ATOM	162	HD12	LEU11		-2.823	0.121	-5.817	1.00	0.00
ATOM	163	HD13	LEU11		-2.609	1.584	-4.853	1.00	0.00
ATOM	164	CD2	LEU	11	0.146	0.514	-4.260	1.00	0.00
ATOM	165	HD21	LEU11		-0.214	-0.294	-3.640	1.00	0.00
ATOM	166	HD22	LEU11		0.144	1.432	-3.691	1.00	0.00
ATOM	167	HD23	LEU11		1.151	0.296	-4.589	1.00	0.00
ATOM	168	C	LEU	11-	1.543	-2.259	-5.207	1.00	0.00
ATOM	169	O	LEU	11-	1.542	-2.522	-4.020	1.00	0.00
ATOM	170	N	VAL	12	-2.636	-2.322	-5.922	1.00	0.00
ATOM	171	HN	VAL	12	-2.608	-2.089	-6.874	1.00	0.00
ATOM	172	CA	VAL	12	-3.931	-2.729	-5.298	1.00	0.00
ATOM	173	HA	VAL	12	-4.203	-1.999	-4.550	1.00	0.00
ATOM	174	CB	VAL	12	-5.020	-2.770	-6.379	1.00	0.00
ATOM	175	HB	VAL	12	-5.052	-1.816	-6.884	1.00	0.00
ATOM	176	CG1	VAL	12	-4.715	-3.872	-7.406	1.00	0.00
ATOM	177	HG11	VAL12		-3.689	-4.192	-7.295	1.00	0.00
ATOM	178	HG12	VAL12		-4.864	-3.485	-8.403	1.00	0.00



ATOM	179	HG13	VAL12	-5.373	-4.713	-7.245	1.00	0.00
ATOM	180	CG2	VAL 12	-6.378	-3.035	-5.720	1.00	0.00
ATOM	181	HG21	VAL12	-6.885	-2.097	-5.560	1.00	0.00
ATOM	182	HG22	VAL12	-6.230	-3.531	-4.772	1.00	0.00
ATOM	183	HG23	VAL12	-6.975	-3.662	-6.365	1.00	0.00
ATOM	189	C	VAL 12	-3.795	-4.105	-4.629	1.00	0.00
ATOM	185	O	VAL 12	-4.496	-4.415	-3.684	1.00	0.00
ATOM	186	N	GLU 13	-2.897	-4.928	-5.112	1.00	0.00
ATOM	187	HN	GLU 13	-2.343	-9.655	-5.873	1.00	0.00
ATOM	188	CA	GLU 13	-2.716	-6.281	-4.505	1.00	0.00
ATOM	189	HA	GLU 13	-3.650	-6.802	-4.509	1.00	0.00
ATOM	190	CB	GLII13	-1.675	-7.072	-5.302	1.00	0.00
ATOM	191	HB1	GLU 13	-1.299	-7.882	-4.696	1.00	0.00
ATOM	192	HB2	GLU 13	-0.860	-6.418	-5.577	1.00	0.00
ATOM	193	CG	GLU 13	-2.319	-7.642	-6.567	1.00	0.00
ATOM	194	HG1	GLU 13	-2.926	-6.883	-7.038	1.00	0.00
ATOM	195	HG2	GLU 13	-2.939	-8.488	-6.306	1.00	0:00
ATOM	196	CD	GLU 13	-1.225	-8.091	-7.536	1.00	0.00
ATOM	197	OE1	GLU 13	-0.270	-8.698	-7.080	1.00	0.00
ATOM	198	OE2	GLU 13	-1.359	-7.822	-8.718	1.00	0.00
ATOM	199	C	GLU 13	-2.254	-6.129	-3.066	1.00	0.00
ATOM	200	O	GLU 13	-2.698	-6.838	-2.188	1.00	0.00
ATOM	201	N	ALA 14	-1.378	-5.204	-2.821	1.00	0.00
ATOM	202	HN	ALA 14	-1.044	-4.644	-3.552	1.00	0.00
ATOM	203	CA	ALA 14	-0.885	-4.986	-1.439	1.00	0.00
ATOM	204	HA	ALA 14	-0.531	-5.919	-1.027	1.00	0.00
ATOM	205	CB	ALA 14	0.254	-3.979	-1.975	1.00	0.00
ATOM	206	HB1	ALA 14	-0.159	-2.981	-1.506	1.00	0.00
ATOM	207	HB2	ALA 14	0.855	-4.148	-2.355	1.00	0.00
ATOM	208	HB3	ALA 14	0.862	-4.092	-0.591	1.00	0.00
ATOM	209	C	ALA 14	-2.010	-9.427	-0.563	1.00	0.00
ATOM	210	O	ALA 14	-1.948	-4.511	0.644	1.00	0.00
ATOM	211	N	LEU 15	-3.018	-3.829	-1.154	1.00	0.00
ATOM	212	HN	LEU 15	-3.038	-3.744	-2.129	1.00	0.00

ATOM	213	CA	LEU	15	-4.114	-3.237	-0.335	1.00	0.00
ATOM	214	HA	LEU	15	-3.678	-2.805	0.553	1.00	0.00
ATOM	215	CB	LEU	15	-4.815	-2.131	-1.125	1.00	0.00
ATOM	216	HB1	LEU	15	-5.783	-1.935	-0.691	1.00	0.00
ATOM	217	HB2	LEU	15	-4.936	-2.945	-2.153	1.00	0.00
ATOM	218	CG	LEU	15	-3.969	-0.854	-1.077	1.00	0.00
ATOM	219	HG	LEU	15	-2.977	-1.073	-1.450	1.00	0.00
ATOM	220	CD1	LEU	15	-4.617	0.221	-1.951	1.00	0.00
ATOM	221	HD11	LEU	15	-5.679	0.032	-2.029	1.00	0.00
ATOM	222	HD12	LEU	15	-4.176	0.199	-2.938	1.00	0.00
ATOM	223	HD13	LEU	15	-4.457	1.192	-1.507	1.00	0.00
ATOM	224	CD2	LEU	15	-3.873	-0.343	0.370	1.00	0.00
ATOM	225	HD21	LEU	15	-3.530	0.683	0.370	1.00	0.00
ATOM	226	HD22	LEU	15	-3.175	-0.955	0.927	1.00	0.00
ATOM	227	HD23	LEU	15	-4.847	-0.396	0.835	1.00	0.00
ATOM	228	C	LEU	15	-5.129	-4.291	0.108	1.00	0.00
ATOM	229	O	LEU	15	-5.380	-4.409	1.290	1.00	0.00
ATOM	230	N	TYR	16	-5.728	-5.057	-0.787	1.00	0.00
ATOM	231	HN	TYR	16	-5.524	-4.964	-1.743	1.00	0.00
ATOM	232	CA	TYR	16	-6.725	-6.069	-0.290	1.00	0.00
ATOM	233	HA	TYR	16	-7.339	-5.578	0.452	1.00	0.00
ATOM	234	CB	TYR	16	-7.655	-6.628	-1.371	1.00	0.00
ATOM	235	HB1	TYR	16	-8.424	-5.905	-1.580	1.00	0.00
ATOM	236	HB2	TYR	16	-8.115	-7.527	-1.002	1.00	0.00
ATOM	237	CG	TYR	16	-6.942	-6.954	-2.641	1.00	0.00
ATOM	238	CD1	TYR	16	-6.878	-5.998	-3.640	1.00	0.00
ATOM	239	HD1	TYR	16	-7.282	-5.020	-3.467	1.00	0.00
ATOM	240	CD2	TYR	16	-6.414	-8.230	-2.846	1.00	0.00
ATOM	241	HD2	TYR	16	-6.462	-8.969	-2.059	1.00	0.00
ATOM	292	CE1	TYR	16	-6.290	-6.298	-4.856	1.00	0.00
ATOM	243	HE1	TYR	16	-6.249	-5.541	-5.617	1.00	0.00
ATOM	244	CE2	TYR	16	-5.805	-8.541	-4.063	1.00	0.00
ATOM	245	HE2	TYR	16	-5.385	-9.525	-4.220	1.00	0.00
ATOM	246	CZ	TYR	16	-5.748	-7.574	-5.078	1.00	0.00

ATOM	247	OH	TYR	16	-5.159	-7.874	-6.289	1.00	0.00
ATOM	248	HH	TYR	16	-5.854	-7.948	-6.946	1.00	0.00
ATOM	249	C	TYR	16	-5.992	-7.206	0.394	1.00	0.00
ATOM	250	O	TYR	16	-6.522	-7.835	1.293	1.00	0.00
ATOM	251	N	LEU	17	-4.758	-7.955	0.025	1.00	0.00
ATOM	252	HN	LEU	17	-4.336	-6.915	-0.674	1.00	0.00
ATOM	253	CA	LEU	17	-3.980	-8.527	0.713	1.00	0.00
ATOM	254	HA	LEU	17	-4.465	-9.481	0.569	1.00	0.00
ATOM	255	CB	LEU	17	-2.558	-8.573	0.151	1.00	0.00
ATOM	256	HB1	LEU	17	-2.022	-7.685	0.448	1.00	0.00
ATOM	257	HB2	LEU	17	-2.602	-8.628	-0.925	1.00	0.00
ATOM	258	CG	LEU	17	-1.837	-9.805	0.688	1.00	0.00
ATOM	259	HG	LEU	17	-1.862	-9.793	1.769	1.00	0.00
ATOM	260	CD1	LEU	17	-2.536	-11.064	0.174	1.00	0.00
ATOM	261	HD11	LEU	17	-1.806	-11.843	0.011	1.00	0.00
ATOM	262	HD12	LEU	17	-3.044	-10.842	-0.759	1.00	0.00
ATOM	263	HD13	LEU	17	-3.259	-11.393	0.907	1.00	0.00
ATOM	264	CD2	LEU	17	-0.385	-9.787	0.207	1.00	0.00
ATOM	265	HD21	LEU	17	0.104	-8.898	0.578	1.00	0.00
ATOM	266	HD22	LEU	17	-0.363	-9.786	-0.873	1.00	0.00
ATOM	267	HD23	LEU	17	0.128	-10.661	0.578	1.00	0.00
ATOM	268	C	LEU	17	-3.939	-8.186	2.207	1.00	0.00
ATOM	269	O	LEU	17	-3.941	-9.052	3.060	1.00	0.00
ATOM	270	N	VAL	18	-3.940	-6.911	2.511	1.00	0.00
ATOM	271	HN	VAL	18	-3.959	-6.242	1.798	1.00	0.00
ATOM	272	CA	VAL	18	-3.943	-6.464	3.921	1.00	0.00
ATOM	273	HA	VAL	18	-3.358	-7.145	4.520	1.00	0.00
ATOM	274	CB	VAL	18	-3.370	-5.042	4.015	1.00	0.00
ATOM	275	HB	VAL	18	-4.051	-4.353	3.529	1.00	0.00
ATOM	276	CG1	VAL	18	-3.222	-4.647	5.484	1.00	0.00
ATOM	277	HG11	VAL	18	-4.150	-4.224	5.837	1.00	0.00
ATOM	278	HG12	VAL	18	-2.433	-3.917	5.584	1.00	0.00
ATOM	279	HG13	VAL	18	-2.980	-5.521	6.071	1.00	0.00
ATOM	280	CG2	VAL	18	-2.004	-4.964	3.327	1.00	0.00

ATOM	655	HG	SER	44	6.453	0.254	6.213	1.00	0.00
ATOM	656	C	SER	44	3.958	-2.582	4.966	1.00	0.00
ATOM	657	O	SER	44	2.988	-1.872	4.776	1.00	0.00
ATOM	658	N	LEU	45	3.831	-3.821	5.374	1.00	0.00
ATOM	659	HN	LEU	45	4.633	-4.366	5.523	1.00	0.00
ATOM	660	CA	LEU	45	2.479	-4.408	5.619	1.00	0.00
ATOM	661	HA	LEU	45	1.902	-4.381	4.707	1.00	0.00
ATOM	662	CB	LEU	45	2.642	-5.866	6.086	1.00	0.00
ATOM	663	HB1	LEU	45	2.210	-5.981	7.070	1.00	0.00
ATOM	664	HB2	LEU	45	3.693	-6.109	6.130	1.00	0.00
ATOM	665	CG	LEU	45	1.940	-6.828	5.113	1.00	0.00
ATOM	666	HG	LEU	45	2.092	-7.842	5.453	1.00	0.00
ATOM	667	CD1	LEU	45	0.437	-6.533	5.085	1.00	0.00
ATOM	668	HD11	LEU	45	0.254	-5.543	5.475	1.00	0.00
ATOM	669	HD12	LEU	45	-0.083	-7.259	5.692	1.00	0.00
ATOM	670	HD13	LEU	45	0.074	-6.591	4.068	1.00	0.00
ATOM	671	CD2	LEU	45	2.530	-6.674	3.700	1.00	0.00
ATOM	672	HD21	LEU	45	1.731	-6.619	2.977	1.00	0.00
ATOM	673	HD22	LEU	45	3.154	-7.528	3.478	1.00	0.00
ATOM	674	HD23	LEU	45	3.126	-5.774	3.650	1.00	0.00
ATOM	675	C	LEU	95	1.763	-3.590	6.700	1.00	0.00
ATOM	676	O	LEU	45	0.555	-3.464	6.698	1.00	0.00
ATOM	677	N	TYR	46	2.512	-3.032	7.616	1.00	0.00
ATOM	678	HN	TYR	46	3.486	-3.149	7.586	1.00	0.00
ATOM	679	CA	TYR	46	1.903	-2.213	8.702	1.00	0.00
ATOM	680	HA	TYR	46	1.032	-2.718	9.092	1.00	0.00
ATOM	681	CB	TYR	46	2.945	-2.040	9.826	1.00	0.00
ATOM	682	HB1	TYR	96	3.877	-1.704	9.396	1.00	0.00
ATOM	683	HB2	TYR	46	3.100	-2.989	10.316	1.00	0.00
ATOM	684	CG	TYR	46	2.474	-1.024	10.846	1.00	0.00
ATOM	685	CD1	TYR	46	1.239	-1.187	11.485	1.00	0.00
ATOM	686	HD1	TYR	96	0.620	-2.044	11.256	1.00	0.00
ATOM	687	CD2	TYR	46	3.274	0.084	12.139	1.00	0.00
ATOM	688	HD2	TYR	46	4.228	0.205	10.644	1.00	0.00

ATOM	689	CE1	TYR	46	0.806	-0.239	12.419	1.00	0.00
ATOM	690	HE1	TYR	96	-0.147	-0.362	12.913	1.00	0.00
ATOM	691	CE2	TYR	46	2.843	1.031	12.074	1.00	0.00
ATOM	692	HE2	TYR	46	3.462	1.886	12.298	1.00	0.00
ATOM	693	CZ	TYR	46	1.608	0.871	12.714	1.00	0.00
ATOM	694	OH	TYR	46	1.182	1.807	13.635	1.00	0.00
ATOM	695	HH	TYR	46	1.440	2.676	13.317	1.00	0.00
ATOM	696	C	TYR	46	1.489	-0.848	8.130	1.00	0.00
ATOM	697	O	TYR	46	0.498	-0.273	8.537	1.00	0.00
ATOM	698	N	GLN	47	2.250	-0.329	7.202	1.00	0.00
ATOM	699	HN	GLN	97	3.049	-0.812	6.900	1.00	0.00
ATOM	700	CA	GLN	47	1.917	0.999	6.609	1.00	0.00
ATOM	701	HA	GLN	47	1.816	1.727	7.398	1.00	0.00
ATOM	702	CB	GLN	47	3.037	1.432	5.663	1.00	0.00
ATOM	703	HB1	GLN	47	2.649	2.158	4.965	1.00	0.00
ATOM	704	HB2	GLN	47	3.403	0.573	5.123	1.00	0.00
ATOM	705	CG	GLN	47	4.180	2.060	6.463	1.00	0.00
ATOM	706	HG1	GLN	47	5.107	1.930	5.927	1.00	0.00
ATOM	707	HG2	GLN	47	4.251	1.582	7.429	1.00	0.00
ATOM	708	CD	GLN	47	3.908	3.555	6.649	1.00	0.00
ATOM	709	OE1	GLN	47	2.774	3.961	6.812	1.00	0.00
ATOM	710	NE2	GLN	47	4.907	4.396	6.632	1.00	0.00
ATOM	711	HE21	GLN	47	5.821	4.070	6.501	1.00	0.00
ATOM	712	HE22	GLN	47	4.740	5.355	6.751	1.00	0.00
ATOM	713	C	GLN	47	0.606	0.914	5.822	1.00	0.00
ATOM	714	O	GLN	47	-0.167	1.855	5.797	1.00	0.00
ATOM	715	N	LEU	48	0.356	-0.193	5.164	1.00	0.00
ATOM	716	HN	LEU	48	0.999	-0.932	5.186	1.00	0.00
ATOM	717	CA	LEU	48	-0.898	-0.317	4.361	1.00	0.00
ATOM	718	HA	LEU	48	-1.178	0.661	4.011	1.00	0.00
ATOM	719	CB	LEU	48	-0.653	-1.227	3.151	1.00	0.00
ATOM	720	HB1	LEU	48	-1.599	-1.466	2.688	1.00	0.00
ATOM	721	HB2	LEU	48	-0.178	-2.139	3.982	1.00	0.00
ATOM	722	CG	LEU	48	0.250	-0.524	2.127	1.00	0.00

ATOM	723	HG	LEU	48	1.213	-0.323	2.575	1.00	0.00
ATOM	724	CD1	LEU	48	0.434	-1.434	0.914	1.00	0.00
ATOM	725	HD11	LEU	48	-0.381	-1.278	0.222	1.00	0.00
ATOM	726	HD12	LEU	98	0.441	-2.465	1.236	1.00	0.00
ATOM	727	HD13	LEU	48	1.369	-1.202	0.427	1.00	0.00
ATOM	728	CD2	LEU	48	-0,391	0.793	1.667	1.00	0.00
ATOM	729	HD21	LEU	48	-0,293	1.532	2.447	1.00	0.00
ATOM	730	HD22	LEU	48	-1.437	0.629	1.455	1.00	0,00
ATOM	731	HD23	LEU	48	0,108	1.143	0.775	1.00	0.00
ATOM	732	C	LEU	48	-2.047	-0.892	5.201	1.00	0.00
ATOM	733	O	LEU	48	-3.135	-1.097	4.695	1.00	0.00
ATOM	734	N	GLU	49	-1.832	-1.150	6.468	1.00	0.00
ATOM	735	HN	GLU	49	-0.954	-0.979	6.864	1.00	0.00
ATOM	736	CA	GLU	49	-2.930	-1.700	7.315	1.00	0.00
ATOM	737	HA	GLU	49	-3.371	-2.553	6.822	1.00	0.00
ATOM	738	CB	GLU	49	-2.361	-2.134	8.669	1.00	0.00
ATOM	739	HB1	GLU	49	-3.148	-2.130	9.407	1.00	0.00
ATOM	740	HB2	GLII	49	-1.583	-1.445	8.968	1.00	0.00
ATOM	741	CG	GLU	49	-1.773	-3.547	8.552	1.00	0.00
ATOM	792	HG1	GLU	99	-0.698	-3.485	8.536	1.00	0.00
ATOM	743	HG2	GLU	49	-2.119	-4.009	7.640	1.00	0.00
ATOM	744	CD	GLU	49	-2.211	-4.392	9.751	1.00	0.00
ATOM	745	OE1	GLU	49	-2.509	-5.558	9.550	1.00	0.00
ATOM	746	OEZ	GLU	49	-2.237	-3.860	10.848	1.00	0.00
ATOM	747	C	GLII	49	-9.006	-0.631	7.530	1.00	0.00
ATOM	748	O	GLU	49	-5.146	-0.942	7.823	1.00	0.00
ATOM	799	N	ASN	50	-3.655	0.624	7.393	1.00	0.00
ATOM	750	HN	ASN	50	-2.730	0.851	7.163	1.00	0.00
ATOM	751	CA	ASN	50	-4.655	1.714	7.596	1.00	0.00
ATOM	752	HA	ASN	50	-5.281	1.470	8.441	1.00	0.00
ATOM	753	CB	ASN	50	-3.919	3.024	7.881	1.00	0.00
ATOM	754	HB1	ASN	50	-4.525	3.856	7.552	1.00	0.00
ATOM	755	HB2	ASN	50	-2.979	3.032	7.348	1.00	0.00
ATOM	756	CG	ASN	50	-3.657	3.151	9.383	1.00	0.00



ATOM	757	OD1 ASN	50	-4.068	4.112	10.004	1.00	0.00
ATOM	758	ND2 ASN	50	-2.983	2.218	9.997	1.00	0.00
ATOM	759	HD21ASN	50	-2.650	1.444	9.497	1.00	0.00
ATOM	760	HD22ASN	50	-2.810	2.291	10.959	1.00	0.00
ATOM	761	C ASN	50	-5.538	1.894	6.347	1.00	0.00
ATOM	762	O ASN	50	-6.396	2.757	6.321	1.00	0.00
ATOM	763	N TYR	51	-5.342	1.102	5.313	1.00	0.00
ATOM	764	HN TYR	51	-4.649	0.413	5.342	1.00	0.00
ATOM	765	CA TYR	51	-6.184	1.260	4.086	1.00	0.00
ATOM	766	HA TYR	51	-6.744	2.180	4.159	1.00	0.00
ATOM	767	CB TYR	51	-5.293	1.305	2.838	1.00	0.00
ATOM	768	HB1 TYR	51	-5.911	1.234	1.956	1.00	0.00
ATOM	769	HH2 TYR	51	-4.601	0.476	2.860	1.00	0.00
ATOM	770	CG TYR	51	-4.525	2.597	2.799	1.00	0.00
ATOM	771	CDI TYR	51	-5.154	3.766	2.364	1.00	0.00
ATOM	772	HD1 TYR	51	-6.189	3.738	2.061	1.00	0.00
ATOM	773	CD2 TYR	51	-3.187	2.625	3.189	1.00	0.00
ATOM	774	HD2 TYR	51	-2.706	1.719	3.518	1.00	0.00
ATOM	775	CE1 TYR	51	-4.442	4.970	2.323	1.00	0.00
ATOM	776	HE1 TYR	51	-4.924	5.873	1.980	1.00	0.00
ATOM	777	CE2 TYR	51	-2.470	3.824	3.147	1.00	0.00
ATOM	778	HE2 TYR	51	-1.435	3.843	3.448	1.00	0.00
ATOM	779	CZ TYR	51	-3.098	4.998	2.716	1.00	0.00
ATOM	780	OH TYR	51	-2.392	6.183	2.678	1.00	0.00
ATOM	781	HH TYR	51	-2.342	6.527	3.574	1.00	0.00
ATOM	782	C TYR	51	-7.163	0.085	3.961	1.00	0.00
ATOM	783	O TYR	51	-7.191	-0.606	2.958	1.00	0.00
ATOM	784	N CYS	52	-7.969	-0.146	4.964	1.00	0.00
ATOM	785	HN CYS	52	-7.933	0.419	5.764	1.00	0.00
ATOM	786	CA CYS	52	-8.945	-1.273	4.885	1.00	0.00
ATOM	787	HA CYS	52	-9.067	-1.561	3.852	1.00	0.00
ATOM	788	HS1 CYS	52	-9.205	-3.211	5.770	1.00	0.00
ATOM	789	HB2 CYS	52	-8.165	-2.127	6.692	1.00	0.00
ATOM	790	C CYS	52	-10.299	-0.835	5.445	1.00	0.00

```

ATOM  791 O   CYS  52   -10.402  0.139  6.168  1.00  0.00
ATOM  792 CB  CYS  52    -8.430  -2.462  5.700  1.00  0.00
ATOM  793 SG  CYS  52    -6.973  -3.180  4.902  1.00  0.00
ATOM  794 N   ASN  53   -11.337  -1.559  5.114  1.00  0.00
ATOM  795 HN  ASN  53   -11.218  -2.339  4.531  1.00  0.00
ATOM  796 CA  ASN  53   -12.699  -1.212  5.617  1.00  0.00
ATOM  797 HA  ASN  53   -12.919  -0.183  5.382  1.00  0.00
ATOM  798 CB  ASN  53   -13.733  -2.121  4.950  1.00  0.00
ATOM  799 HB1 ASN  53   -14.565  -2.272  5.621  1.00  0.00
ATOM  800 HB2 ASN  53   -13.279  -3.074  4.721  1.00  0.00
ATOM  801 CG  ASN  53   -14.234  -1.471  3.658  1.00  0.00
ATOM  802 OD1 ASN  53   -13.551  -0.657  3.069  1.00  0.00
ATOM  803 ND2 ASN  53   -15.407  -1.800  3.192  1.00  0.00
ATOM  804 HD21ASN  53   -15.958  -2.456  3.669  1.00  0.00
ATOM  805 HD22ASN  53   -15.737  -1.391  2.364  1.00  0.00
ATOM  806 C   ASN  53   -12.750  -1.410  7.133  1.00  0.00
ATOM  807 OT1 ASN  53   -12.763  -2.553  7.560  1.00  0.00
ATOM  808 OT2 ASN  53   -12.775  -0.416  7.840  1.00  0.00
END

```

3. Példa

Az Asp^{B28}IP(AspGlyLys) inzulin analóg prekuzort úgy állítjuk elő, hogy a YAP3-TA39-EEGEPK (8. számú szekvencia)-Asp^{B28}IP(DGK) fúziós fehérjét, vagy a YAP3-TA57-EEGEPK (8. számú szekvencia)-Asp^{B28}IP(DGK) fúziós fehérjét expresszálo expressziós plazmiddal transzformált MT663 élesztőtörzset tenyésztjük. A TA39 egy QPIDDTESNTTSVNMLADDTESRFATNTT-LAGGLDVNLISMAKR pro-szekvencia (15. számú szekvencia). Az EEGEPK (8. számú szekvencia) az inzulin analóg B-láncának N-terminális extenziója. A TA57 egy QPIDDTESQTTSVNLMADDTE-SAFATQTN SGGLDVVGLISMAKR pro-szekvencia (16. számú szek-

vencia). A YAP-TA39 és YAP-TA57 vezérszekvenciát kódoló cDNS-t, és az Asp^{B28I}IP(DGK)-t valamint az N-terminális extenziót kódoló cDNS-t C-POT típusú expressziós vektorba klónozzuk, standard technikák alkalmazásával [Sambrook és mtsai: Molecular Cloning: A Laboratory Manual; 2. kiadás, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)]. A DNS-, és a kikövetkeztetett aminosav szekvenciák a 7. ábrán (9. és 10. számú szekvencia) és a 8. ábrán (11. és 12. számú szekvencia) láthatók.

Az 5. táblázat mutatja a hozamot. A fermentációt 30 °C-on 72 óra hosszat hajtjuk végre 5 ml YPD táptalajban. Az IP hozamot a tenyészet felülúszójának fordított fázisú HPLC-jével határozzuk meg, és az yJB155 törzs IP hozamához viszonyítva fejezzük ki.

5. Táblázat

Vezér-szek-vencia	Pre-kurzor	N-terminális extenzió	C-peptid	Hozam *	Szekv. szám
α^* -ex4	Asp ^{B28I} P	GluGluAlaGlu AlaGluAla- ProLys	Nincs	100	3. számú szek- vencia
YAP3-TA39	Asp ^{B28I} P	GluGluGlyGlu ProLys	AspGlyLys	477%	8. számú szek- vencia

YAP3- TA57	Asp ^{B28I} P	GluGluGlyGlu ProLys	AspGlyLys	306%	8. számú szek- vencia
---------------	--------------------------	------------------------	-----------	------	--------------------------------

Az alábbiakban részletesen ismertetjük a leírásban említett szekvenciákat.

SZEKVENCIALISTA

<110> Novo Nordisk A/S

Kjeldsen, Thomas

Ludvigsen, Svend

<120> Eljárás élesztőben javított fermentációs hozammal rendelkező inzulin prekursorok és inzulin prekursor analógok előállítására

<130> 6148.204-WO

<150> DK PA 1999 011869

<151> 1999-12-29

<160> 16

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 4

<212> FEHÉRJE

<213> Mini C peptid

<400> 1

Glu Glu Gly Lys

1

<210> 2

<211> 10

<212> FEHÉRJE

<213> N-terminális extenzió

<400> 2

Glu Glu Ala Glu Ala Glu Ala Glu Pro Lys

1

5

10

<210> 3

<211> 9

<212> FEHÉRJE

<213> N-terminális

<400> 3

Glu Glu Ala Glu Ala Glu Ala Pro Lys

1 5

<210> 4

<211> 600

<212> DNS

<213> Alfa vezérszekvencia, N-terminálison meghosszabbított
Asp^{B28}-hoz fúzionáltatva

<220>

<221> CDS

<222> (114)..(545)

<400> 4

```

tcttgcttaa atctataact acaaaaaaca catacaggaa ttccattcaa gatctgttca 60
aacaagaaga ttacaaacta tcaatttcac acacaatata aacgattaaa aga atg 116
                                                    Met
                                                    1
aga ttt cct tca att ttt act gca gtt tta ttc gca gca tcc tcc gca 164
Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser Ala
           5                10                15
tta gct gct cca gtc aac act aca aca gaa gat gaa acg gca caa att 212
Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln Ile
           20                25                30
ccg gct gaa gct gtc atc ggt tac tca gat tta gaa ggg gat ttc gat 260
Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe Asp
           35                40                45
gtt gct gtt ttg cca ttt tcc aac agc aca aat aac ggg tta ttg ttt 308
Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu Phe
           50                55                60                65

```

ata aat act act att gcc agc att gct gct aaa gaa gaa ggg gta tcc 356
 Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser
 70 75 80
 atg gct aag aga gaa gaa gct gaa gct gaa gct cca aag ttc gtt aac 404
 Met Ala Lys Arg Glu Glu Ala Glu Ala Glu Ala Pro Lys Phe Val Asn
 85 90 95
 caa cac ttg tgt ggt tct cac ttg gtt gaa gct ttg tac ttg gtt tgt 452
 Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys
 100 105 110
 ggt gaa aga ggt ttc ttc tac act gac aag ggt atc gtt gaa caa tgt 500
 Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Asp Lys Gly Ile Val Glu Gln Cys
 115 120 125
 tgt act tct atc tgt tct ttg tac caa ttg gaa aac tac tgt aac 545
 Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 130 135 140
 tagacgcagc ccgcaggctc tagaaactaa gattaatata attatataaa aatat 600

<210> 5

<211> 144

<212> FEHÉRJE

<213> Alfa vezérszekvencia, N-terminálison meghosszabbított
 Asp^{B28}-hoz fúzionáltatva

<400> 5

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

ATOM	281	HG21	VAL18	-1.909	-5.774	2.622	1.00	0.00
ATOM	282	HG22	VAL18	-1.223	-5.030	4.066	1.00	0.00
ATOM	283	HG23	VAL18	-1.924	-4.019	2.805	1.00	0.00
ATOM	284	C	VAL 18	-5.395	-6.419	4.421	1.00	0.00
ATOM	285	O	VAL 18	-5.660	-6.559	5.599	1.00	0.00
ATOM	286	N	CYS 19	-6.334	-6.183	3.528	1.00	0.00
ATOM	287	HN	CYS 19	-6.095	-6.041	2.586	1.00	0.00
ATOM	288	CA	CY5 19	-7.765	-6.079	3.939	1.00	0.00
ATOM	289	HA	CYS 19	-7.813	-5.715	4.955	1.00	0.00
ATOM	290	HB1	CYS 19	-9.470	-4.891	3.352	1.00	0.00
ATOM	291	HB2	CYS 19	-8.498	-5.465	2.012	1.00	0.00
ATOM	292	C	CYS 19	-8.452	-7.954	3.872	1.00	0.00
ATOM	293	O	CYS 19	-8.550	-8.144	4.870	1.00	0.00
ATOM	294	CB	CYS 19	-8.466	-5.071	3.012	1.00	0.00
ATOM	295	SG	CYS 19	-7.549	-3.504	2.992	1.00	0.00
ATOM	296	N	GLY 20	-8.933	-7,860	2.718	1.00	0.00
ATOM	297	HN	GLY 20	-8.849	-7.297	1.925	1.00	0.00
ATOM	298	CA	GLY 20	-9.613	-9.186	2.613	1.00	0.00
ATOM	299	HA1	GLY 20	-10.029	-9.451	3.574	1.00	0.00
ATOM	300	HAZ	GLY 20	-8.895	-9.935	2.311	1.00	0.00
ATOM	301	C	GLY 20	-10.741	-9.110	1.580	1.00	0.00
ATOM	302	O	GLY 20	-10.548	-8.649	0.472	1.00	0.00
ATOM	303	N	GLU 21	-11.914	-9.569	1.937	1.00	0.00
ATOM	304	HN	GLU 21	-12.038	-9.939	2.837	1.00	0.00
ATOM	305	CA	GLU 21	-13.064	-9.539	0.983	1.00	0.00
ATOM	306	HA	GLU 21	-12.693	-9.624	-0.028	1.00	0.00
ATOM	307	CB	GLU 21	-14.004	-10.713	1.283	1.00	0.00
ATOM	308	HB1	GLU 21	-15.030	-10.392	1.186	00	0.00
ATOM	309	HB2	GLU 21	-13.831	-11.061	2.292	1.00	0.00
ATOM	310	CG	GLU 21	-13.736	-11.855	0.299	1.00	0.00
ATOM	311	HG1	GLU 21	-13.882	-12.801	0.797	1.00	0.00
ATOM	312	HG2	GLU 21	-12.719	=11.790	-0.060	1.00	0.00
ATOM	313	CD	GLU 21	-14.702	-11.748	-0.882	1.00	0.00
ATOM	319	OE1	GLU 21	-14.275	-11.299	-1.932	1.00	0.00

ATOM	315	OE2	GLU	21	-15.853	-12.118	-0.716	1.00	0.00
ATOM	316	C	GLU	21	-13.835	-8.223	1.132	1.00	0.00
ATOM	317	O	GLU	21	-14.459	-7.753	0.199	1.00	0.00
ATOM	318	N	ARG	22	-13.808	-7.631	2.302	1.00	0.00
ATOM	319	HN	ARG	22	-13.304	-8.035	3.040	1.00	0.00
ATOM	320	CA	ARG	22	-14.548	-6.350	2.524	1.00	0.00
ATOM	321	HA	ARG	22	-15.605	-6.522	2.398	1.00	0.00
ATOM	322	CB	ARG	22	-14.288	-5.853	3.944	1.00	0.00
ATOM	323	HB1	ARG	22	-14.444	-4.788	3.983	1.00	0.00
ATOM	329	HB2	ARG	22	-13.269	-6.080	4.225	1.00	0.00
ATOM	325	CG	ARG	22	-15.251	-6.543	4.912	1.00	0.00
ATOM	326	HG1	ARG	22	-14.802	-7.452	5.281	1.00	0.00
ATOM	327	HG2	ARG	22	-16.172	-6.778	4.395	1.00	0.00
ATOM	328	CD	ARG	22	-15.549	-5.610	6.085	1.00	0.00
ATOM	329	HD1	ARG	22	-16.250	-6.085	6.755	1.00	0.00
ATOM	330	HD2	ARG	22	-15.973	-4.689	5.714	1.00	0.00
ATOM	331	NE	ARG	22	-14.285	-5.315	6.818	1.00	0.00
ATOM	332	HE	ARG	22	-13.502	-4.985	6.331	1.00	0.00
ATOM	333	CZ	ARG	22	-14.224	-5.496	8.107	1.00	0.00
ATOM	334	NH1	ARG	22	-13.711	-6.595	8.589	1.00	0.00
ATOM	335	HH11	ARG	22	-13.363	-7.298	7.968	1.00	0.00
ATOM	336	HH12	ARG	22	-13.666	-6.735	9.578	1.00	0.00
ATOM	337	NH2	ARG	22	-14.679	-4.579	8.917	1.00	0.00
ATOM	338	HH21	ARG	22	-15.074	-3.737	8.547	1.00	0.00
ATOM	339	HH22	ARG	22	-14.634	-4.717	9.905	1.00	0.00
ATOM	340	C	ARG	22	-14.086	-5.290	1.520	1.00	0.00
ATOM	341	O	ARG	22	-14.890	-4.676	0.843	1.00	0.00
ATOM	342	N	GLY	23	-12.799	-5.074	1.417	1.00	0.00
ATOM	343	HN	GLY	23	-12.173	-5.585	1.972	1.00	0.00
ATOM	349	CA	GLY	23	-12.281	-4.057	0.456	1.00	0.00
ATOM	395	HA1	GLY	23	-13.077	-3.381	0.182	1.00	0.00
ATOM	346	HA2	GLY	23	-11.913	-4.556	-0.429	1.00	0.00
ATOM	347	C	GLY	23	-11.146	-3.266	1.102	1.00	0.00
ATOM	348	O	GLY	23	-10.816	-3.465	2.256	1.00	0.00

ATOM	349	N	PHE	24	-10.547	-2.370	0.361	1.00	0.00
ATOM	350	HN	PHE	24	-10.835	-2.236	-0.565	1.00	0.00
ATOM	351	CA	PHE	24	-9.425	-1.556	0.914	1.00	0.00
ATOM	352	HA	PHE	24	-9.307	-1.785	1.957	1.00	0.00
ATOM	353	CB	PHE	24	-8.124	-1.905	0.165	1.00	0.00
ATOM	359	HB1	PHE	24	-7.810	-2.901	0.433	1.00	0.00
ATOM	355	HB2	PHE	24	-7.355	-1.201	0.426	1.00	0.00
ATOM	356	CG	PHE	24	-8.358	-1.845	-1.319	1.00	0.00
ATOM	357	CD1	PHE	24	-8.560	-0.612	-1.925	1.00	0.00
ATOM	358	HD1	PHE	24	-8.529	0.279	-1.325	1.00	0.00
ATOM	359	CD2	PHE	24	-8.387	-3.019	-2.077	1.00	0.00
ATOM	360	HD2	PHE	24	-8.212	-3.981	-1.597	1.00	0.00
ATOM	361	CE1	PHE	24	-8.800	-0.532	-3.300	1.00	0.00
ATOM	362	HE1	PHE	24	-8.956	0.429	-3.768	1.00	0.00
ATOM	363	CE2	PHE	24	-8.625	-2.943	-3.457	1.00	0.00
ATOM	364	HE2	PHE	24	-8.657	-3.844	-4.051	1.00	0.00
ATOM	365	CZ	PHE	24	-8.833	-1.700	-4.068	1.00	0.00
ATOM	366	HZ	PHE	24	-9.018	-1.643	-5.130	1.00	0.00
ATOM	367	C	PHE	24	-9.755	-0.061	0.759	1.00	0.00
ATOM	368	O	PHE	24	-10.883	0.304	0.486	1.00	0.00
ATOM	369	N	PHE	25	-8.782	0.806	0.931	1.00	0.00
ATOM	370	HN	PHE	25	-7.883	0.493	1.152	1.00	0.00
ATOM	371	CA	PHE	25	-9.036	2.274	0.796	1.00	0.00
ATOM	372	HA	PHE	25	-10.093	2.450	0.662	1.00	0.00
ATOM	373	CB	PHE	25	-8.553	2.987	2.063	1.00	0.00
ATOM	374	HB1	PHE	25	-8.158	3.958	1.800	1.00	0.00
ATOM	375	HB2	PHE	25	-7.776	2.401	2.522	1.00	0.00
ATOM	376	CG	PHE	25	-9.693	3.162	3.040	1.00	0.00
ATOM	377	CD1	PHE	25	-9.908	4.410	3.637	1.00	0.00
ATOM	378	HD1	PHE	25	-9.267	5.244	3.392	1.00	0.00
ATOM	379	CD2	PHE	25	-10.524	2.082	3.360	1.00	0.00
ATOM	380	HD2	PHE	25	-10.359	1.119	2.900	1.00	0.00
ATOM	381	CE1	PHE	25	-10.955	9.579	4.550	1.00	0.00
ATOM	382	HE1	PHE	25	-11.118	5.542	5.010	1.00	0.00

ATOM	383	CE2	PHE	25	-11.570	2.252	4.271	1.00	0.00
ATOM	384	HE2	PHE	25	-12.210	1.421	4.514	1.00	0.00
ATOM	385	CZ	PHE	25	-11.787	3.500	4.867	1.00	0.00
ATOM	386	HZ	PHE	25	-12.594	3.629	5.572	1.00	0.00
ATOM	387	C	PHE	25	-8.263	2.828	-0.409	1.00	0.00
ATOM	388	O	PHE	25	-7.421	2.161	-0.979	1.00	0.00
ATOM	389	N	TYR	26	-8.540	4.051	-0.784	1.00	0.00
ATOM	390	HN	TYR	26	-9.216	4.567	-0.297	1.00	0.00
ATOM	39i	CA	TYR	26	-7.825	4.671	-1.938	1.00	0.00
ATOM	392	HA	TYR	26	-6.785	4.381	-1.915	1.00	0.00
ATOM	393	CB	TYR	26	-8.463	4.196	-3.248	1.00	0.00
ATOM	394	HB1	TYR	26	-9.171	4.934	-3.593	1.00	0.00
ATOM	395	HB2	TYR	26	-8.975	3.259	-3.078	1.00	0.00
ATOM	396	CG	TYR	26	-7.391	4.000	-4.295	1.00	0.00
ATOM	397	CD1	TYR	26	-7.086	5.034	-5.188	1.00	0.00
ATOM	398	HD1	TYR	26	-7.617	5.973	-5.129	1.00	0.00
ATOM	399	CD2	TYR	26	-6.701	2.783	-4.373	1.00	0.00
ATOM	400	HD2	TYR	26~	-6.936	1.985	-3.684	1.00	0.00
ATOM	401	CE1	TYR	26	-6.093	4.852	-6.159	1.00	0.00
ATOM	402	HE1	TYR	26	-5.858	5.650	-b.847	1.00	0.00
ATOM	403	CE2	TYR	26	-5.708	2.602	-5.344	1,00	0,00
ATOM	404	HE2	TYR	26	-5.177	1.663	-5.404	1,00	0.00
ATOM	405	CZ	TYR	26	-5.403	3.637	-6.236	1.00	0.00
ATOM	406	OH	TYR	26	-4.425	3.459	-7.192	1.00	0.00
ATOM	407	HH	TYR	26	-4.787	2.908	-7.890	1.00	0.00
ATOM	408	C	TYR	26	-7.934	6.195	-1.835	1.00	0.00
ATOM	409	O	TYR	26	-8.901	6.787	-2.277	1.00	0.00
ATOM	410	N	THR	27	-6.953	6.830	-1.241	1.00	0.00
ATOM	411	HN	THR	27	-6.191	6,325	-0.888	1.00	0.00
ATOM	412	CA	THR	27	-6.994	8.316	-1.090	1.00	0.00
ATOM	413	HA	THR	27	-7.965	8.612	-0.720	1.00	0.00
ATOM	414	CB	THR	27	-5.915	8,758	-0.091	1.00	0.00
ATOM	415	HB	THR	27	-6.127	8.330	0.876	1.00	0.00
ATOM	416	OG1	THR	27	-5.920	10.175	0.008	1.00	0.00



ATOM	417	HG1	THR	27	-6.818	10.458	0.194	1.00	0.00
ATOM	418	CG2	THR	27	-4.535	8.282	-0.562	1.00	0.00
ATOM	419	HG21	THR	27	-4.643	7.648	-1.931	1.00	0.00
ATOM	420	HG22	THR	27	-4.058	7.725	0.231	1.00	0.00
ATOM	921	HG23	THR	27	-3.926	9.137	-0.814	1.00	0.00
ATOM	422	C	THR	27	-6.743	8.988	-2.442	1.00	0.00
ATOM	423	O	THR	27	-b.319	8.357	-3.392	1.00	0.00
ATOM	424	N	ASP	28	-6.999	10.268	-2.527	1.00	0.00
ATOM	425	HN	ASP	28	-7.337	10.750	-1.743	1.00	0.00
ATOM	426	CA	ASP	28	-6.779	11.004	-3.806	1.00	0.00
ATOM	427	HA	ASP	28	-5.809	10.748	-4.207	1.00	0.00
ATOM	428	CB	ASP	28	-7.870	10.622	-4.812	1.00	0.00
ATOM	429	HB1	ASP	28	-8.163	11.495	-5.377	1.00	0.00
ATOM	430	HBZ	ASP	28	-8.726	10.231	-4.281	1.00	0.00
ATOM	431	CG	ASP	28	-7.333	9.556	-5.771	1.00	0.00
ATOM	432	OD1	ASP	28	-6.648	9.924	-6.711	1.00	0.00
ATOM	433	OD2	ASP	28	-7.617	8.390	-5.549	1.00	0.00
ATOM	434	C	ASP	28	-6.837	12.509	-3.534	1.00	0.00
ATOM	435	O	ASP	28	-5.850	13.209	-3.651	1.00	0.00
ATOM	436	N	LYS	29	-7.992	13.007	-3,169	1.00	0.00
ATOM	437	HN	LYS	29	-8.770	12.418	-3,083	1.00	0.00
ATOM	438	CA	LYS	29	-8.126	14.466	-2.885	1.00	0.00
ATOM	439	HA	LYS	29	-7.666	15.029	-3.684	1.00	0.00
ATOM	440	CB	LYS	29	-9.619	14.835	-2.798	1.00	0.00
ATOM	441	HB1	LYS	29	-10.092	14.617	-3.741	1.00	0.00
ATOM	442	HB2	LYS	29	-9.708	15.890	-2.585	1.00	0.00
ATOM	443	CG	LYS	29	-10.293	14.027	-1.685	1.00	0.00
ATOM	444	HG1	LYS	29	-10.315	14.614	-0.779	1.00	0.00
ATOM	445	HG2	LYS	29	-9.741	13.116	-1.510	1.00	0.00
ATOM	446	CD	LYS	29	-11.725	13.685	-2.101	1.00	0.00
ATOM	447	HD1	LYS	29	-11.719	12.806	-2.728	1.00	0.00
ATOM	448	HD2	LYS	29	-12.149	14.515	-2.648	1.00	0.00
ATOM	449	CE	LYS	29	-12.565	13.413	-0.853	1.00	0.00
ATOM	450	HE1	LYS	29	-13.613	13.525	-1.093	1.00	0.00

ATOM	451	HE2	LYS	29	-12.297	14.115	-0.078	1.00	0.00
ATOM	952	NZ	LYS	29	-12.311	12.024	-0.375	1.00	0.00
ATOM	453	HZ1	LYS	29	-11.297	11.810	-0.453	1.00	0.00
ATOM	454	HZ2	LYS	29	-12.854	11.353	-0.957	1.00	0.00
ATOM	455	H23	LYS	29	-12.605	11.939	0.618	1.00	0.00
ATOM	456	C	LYS	29	-7.429	14.801	-1.562	1.00	0.00
ATOM	457	O	LYS	29	-6.940	15.899	-1.369	1.00	0.00
ATOM	458	N	ASP	30	-7.387	13.862	-0.651	1.00	0.00
ATOM	459	HN	ASP	30	-7.793	12.989	-0.833	1.00	0.00
ATOM	460	CA	ASP	30	-6.730	14.112	0.667	1.00	0.00
ATOM	461	HA	ASP	30	-7.187	14.969	1.138	1.00	0.00
ATOM	462	CB	ASP	30	-6.905	12.884	1.562	1.00	0.00
ATOM	963	H81	ASP	30	-6.222	12.109	1.249	1.00	0.00
ATOM	464	HB2	ASP	30	-7.920	12.523	1.481	1.00	0.00
ATOM	465	CG	ASP	30	-6.612	13.262	3.016	1.00	0.00
ATOM	466	OD1	ASP	30	-6.960	14.367	3.402	1.00	0.00
ATOM	467	OD2	ASP	30	-6.045	12.442	3.719	1.00	0.00
ATOM	968	C	ASP	30	-5.238	14.384	0.456	1.00	0.00
ATOM	469	O	ASP	30	-4.735	15.434	0.811	1.00	0.00
ATOM	470	N	GLY	31	-4.526	13.444	-0.116	1.00	0.00
ATOM	471	HN	GLY	31	-4.956	12.607	-0.392	1.00	0.00
ATOM	472	CA	GLY	31	-3.066	13.643	-0.351	1.00	0.00
ATOM	473	HA1	GLY	31	-2.510	12.870	0.158	1.00	0.00
ATOM	479	HA2	GLY	31	-2.769	14.611	0.028	1.00	0.00
ATOM	475	C	GLY	31	-2.772	13.569	-1.851	1.00	0.00
ATOM	476	O	GLY	31	-3.342	14.300	-2.639	1.00	0.00
ATOM	477	N	LYS	32	-1.887	12.690	-2.246	1.00	0.00
ATOM	478	HN	LYS	32	-1.495	12.114	-1.589	1.00	0.00
ATOM	479	CA	LYS	32	-1.550	12.559	-3.694	1.00	0.00
ATOM	480	HA	LYS	32	-2.213	13.182	-4.274	1.00	0.00
ATOM	481	CB	LYS	32	-0.102	13.003	-3.922	1.00	0.00
ATOM	482	HB1	LYS	32	0.545	12.139	-3.929	1.00	0.00
ATOM	483	HB2	LYS	32	0.198	13.675	-3.131	1.00	0.00
ATOM	484	CG	LYS	32	0.004	13.719	-5.269	1.00	0.00

ATOM	485	HG1	LYS	32	-0.951	14.154	-5.522	1.00	0.00
ATOM	486	HG2	LYS	32	0.290	13.010	-6.032	1.00	0.00
ATOM	487	CD	LYS	32	1.058	14.827	-5.180	1.00	0.00
ATOM	488	HD1	LYS	32	2.023	14.427	-5.452	1.00	0.00
ATOM	489	HD2	LYS	32	1.097	15.203	-4.168	1.00	0.00
ATOM	490	CE	LYS	32	0.695	15.967	-6.137	1.00	0.00
ATOM	491	HE1	LYS	32	-0.301	15.816	-6.527	1.00	0.00
ATOM	492	HE2	LYS	32	1.401	15.990	-6.953	1.00	0.00
ATOM	493	NZ	LYS	32	0.746	17.263	-5.402	1.00	0.00
ATOM	494	HZ1	LYS	32	1.615	17.304	-4.833	1.00	0.00
ATOM	495	HZ2	LYS	32	-0.083	17.339	-4.777	1.00	0.00
ATOM	496	HZ3	LYS	32	0.791	18.048	-6.082	1.00	0.00
ATOM	497	C	LYS	32	-1.712	11.100	-4.127	1.00	0.00
ATOM	498	O	LYS	32	-1.028	10.629	-5.015	1.00	0.00
ATOM	499	N	GLY	33	-2.614	10.385	-3.504	1.00	0.00
ATOM	500	HN	GLY	33	-3.152	10.792	-2.792	1.00	0.00
ATOM	501	CA	GLY	33	-2.831	8.956	-3.872	1.00	0.00
ATOM	502	HA1	GLY	33	-2.770	8.848	-4.945	1.00	0.00
ATOM	503	HAZ	GLY	33	-3.808	8.643	-3.532	1.00	0.00
ATOM	504	C	GLY	33	-1.758	8.085	-3.216	1.00	0.00
ATOM	505	O	GLY	33	-0.590	8.419	-3.217	1.00	0.00
ATOM	506	N	ILE	34	-2.151	6.971	-2.656	1.00	0.00
ATOM	507	HN	ILE	34	-3.101	6.728	-2.667	1.00	0.00
ATOM	508	CA	ILE	34	-1.166	6.063	-1.993	1.00	0.00
ATOM	509	HA	ILE	34	-0.651	6.600	-1.211	1.00	0.00
ATOM	510	CB	ILE	34	-1.905	4.872	-1.389	1.00	0.00
ATOM	511	HB	ILE	34	-1.184	9.158	-1.016	1.00	0.00
ATOM	512	CG1	ILE	34	-2.780	4.208	-2.463	1.00	0.00
ATOM	513	HG11	ILE	34	-2.953	4.521	-3.443	1.00	0.00
ATOM	514	HG12	ILE	34	-3.812	4.497	-2.320	1.00	0.00
ATOM	515	CG2	ILE	34	-2.783	5.348	-0.237	1.00	0.00
ATOM	516	HG21	ILE	34	-3.214	4.491	0.255	1.00	0.00
ATOM	517	HG22	ILE	34	-3.572	5.977	-0.621	1.00	0.00
ATOM	518	HG23	ILE	34	-2.185	5.906	0.466	1.00	0.00

ATOM	519	CD1	ILE	34	-2.660	2.686	-2.356	1.00	0.00
ATOM	520	HD11	ILE	34	-3.421	2.221	-2.965	1.00	0.00
ATOM	521	HD12	ILE	34	-2.791	2.387	-1.326	1.00	0.00
ATOM	522	HD13	ILE	34	-1.685	2.376	-2.700	1.00	0.00
ATOM	523	C	ILE	34	-0.146	5.536	-3.011	1.00	0.00
ATOM	524	O	ILE	34	0.905	5.052	-2.691	1.00	0.00
ATOM	525	N	VAL	35	-0.460	5.593	-4.280	1.00	0.00
ATOM	526	HN	VAL	35	-1.324	5.962	-4.555	1.00	0.00
ATOM	527	CA	VAL	35	0.479	5.063	-5.316	1.00	0.00
ATOM	528	HA	VAL	35	0.679	4.022	-5.111	1.00	0.00
ATOM	529	CB	VAL	35	-0.172	5.185	-6.695	1.00	0.00
ATOM	530	HB	VAL	35	-0.280	6.229	-6.951	1.00	0.00
ATOM	531	CG1	VAL	35	0.706	4.491	-7.739	1.00	0.00
ATOM	532	HG11	VAL	35	0.080	4.041	-8.496	1.00	0.00
ATOM	533	HG12	VAL	35	1.299	3.725	-7.259	1.00	0.00
ATOM	534	HG13	VAL	35	1.360	5.218	-8.198	1.00	0.00
ATOM	535	CG2	VAL	35	-1.551	4.518	-6.665	1.00	0.00
ATOM	536	HG21	VAL	35	-1.505	3.626	-6.058	1.00	0.00
ATOM	537	HG22	VAL	35	-1.847	4.255	-7.669	1.00	0.00
ATOM	538	HG23	VAL	35	-2.273	5.204	-6.245	1.00	0.00
ATOM	539	C	VAL	35	1.802	5.840	-5.303	1.00	0.00
ATOM	540	O	VAL	35	2.820	5.331	-5.726	1.00	0.00
ATOM	541	N	GLU	36	1.799	7.063	-4.833	1.00	0.00
ATOM	542	HN	GLU	36	0.965	7.458	-4.504	1.00	0.00
ATOM	543	CA	GLU	36	3.066	7.861	-4.814	1.00	0.00
ATOM	544	HA	GLU	36	3.623	7.664	-5.718	1.00	0.00
ATOM	545	CB	GLU	36	2.737	9.359	-4.745	1.00	0.00
ATOM	546	HB1	GLU	36	2.149	9.635	-5.608	1.00	0.00
ATOM	547	HB2	GLU	36	3.657	9.926	-4.745	1.00	0.00
ATOM	548	CG	GLU	36	1.940	9.671	-3.469	1.00	0.00
ATOM	549	HG1	GLU	36	1.907	8.794	-2.840	1.00	0.00
ATOM	550	HG2	GLU	36	0.934	9.957	-3.739	1.00	0.00
ATOM	551	CD	GLU	36	2.607	10.817	-2.704	1.00	0.00
ATOM	552	OE1	GLU	36	2.693	11.902	-3.257	1.00	0.00

ATOM	553	OE2	GLU	36	3.017	10.591	-1.577	1.00	0.00
ATOM	554	C	GLU	36	3.931	7.469	-3.607	1.00	0.00
ATOM	555	O	GLU	36	5.117	7.727	-3.586	1.00	0.00
ATOM	556	N	GLN	37	3.350	6.870	-2.599	1.00	0.00
ATOM	557	HN	GLN	37	2.392	6.686	-2.626	1.00	0.00
ATOM	558	CA	GLN	37	4.148	6.481	-1.397	1.00	0.00
ATOM	559	HA	GLN	37	4.977	7.165	-1.285	1.00	0.00
ATOM	560	CB	GLN	37	3.261	6.559	-0.153	1.00	0.00
ATOM	561	HB1	GLN	37	2.696	5.644	-0.056	1.00	0.00
ATOM	562	HB2	GLN	37	2.583	7.396	-0.247	1.00	0.00
ATOM	563	CG	GLN	37	4.141	6.748	1.085	1.00	0.00
ATOM	564	HG1	GLN	37	4.996	7.357	0.829	1.00	0.00
ATOM	565	HG2	GLN	37	4.479	5.783	1.435	1.00	0.00
ATOM	566	CD	GLN	37	3.337	7.438	2.188	1.00	0.00
ATOM	567	OE1	GLN	37	3.428	8.637	2.363	1.00	0.00
ATOM	568	NE2	GLN	37	2.549	6.726	2.946	1.00	0.00
ATOM	569	HE21	GLN	37	2.476	5.760	2.806	1.00	0.00
ATOM	570	HE22	GLN	37	2.033	7.159	3.658	1.00	0.00
ATOM	571	C	GLN	37	4.689	5.053	-1.548	1.00	0.00
ATOM	572	O	GLN	37	5.778	4.749	-1.099	1.00	0.00
ATOM	573	N	CYS	38	3.930	4.169	-2.150	1.00	0.00
ATOM	574	HN	CYS	38	3.049	4.430	-2.488	1.00	0.00
ATOM	575	CA	CYS	38	4.396	2.753	-2.299	1.00	0.00
ATOM	576	HA	CYS	38	5.053	2.514	-1.480	1.00	0.00
ATOM	577	HB1	CYS	38	3.526	0.793	-2.375	1.00	0.00
ATOM	578	HB2	CYS	38	2.520	2.059	-3.077	1.00	0.00
ATOM	579	C	CYS	38	5.164	2.558	-3.610	1.00	0.00
ATOM	580	O	CYS	38	6.166	1.873	-3.639	1.00	0.00
ATOM	581	CB	CYS	38	3.188	1.813	-2.264	1.00	0.00
ATOM	582	SG	CYS	38	2.305	1.990	-0.686	1.00	0.00
ATOM	583	N	CYS	39	4.717	3.135	-4.695	1.00	0.00
ATOM	584	HN	CYS	39	3.906	3.683	-4.666	1.00	0.00
ATOM	585	CA	CYS	39	5.459	2.950	-5.982	1.00	0.00
ATOM	586	HA	CYS	39	5.633	1.897	-6.130	1.00	0.00

ATOM	587	HB1	CYS	39	4.453	4.551	-6.994	1.00	0.00
ATOM	588	HB2	CYS	39	3.678	2.985	-7.182	1.00	0.00
ATOM	589	C	CYS	39	6.813	3.671	-5.901	1.00	0.00
ATOM	590	O	CYS	39	7.723	3.370	-6.650	1.00	0.00
ATOM	591	CB	CYS	39	4.626	3.499	-7.149	1.00	0.00
ATOM	592	SG	CYS	39	5.492	3.260	-8.732	1.00	0.00
ATOM	593	N	THR	40	6.958	4.611	-9.994	1.00	0.00
ATOM	594	HN	THR	40	6.216	9.837	-4.397	1.00	0.00
ATOM	595	CA	THR	40	8.256	5.337	-4.866	1.00	0.00
ATOM	596	HA	THR	40	8.733	5.391	-5.833	1.00	0.00
ATOM	597	CB	THR	40	8.000	6.751	-4.343	1.00	0.00
ATOM	598	HB	THR	40	8.990	7.258	-4.199	1.00	0.00
ATOM	599	OG1	THR	40	7.305	6.680	-3.107	1.00	0.00
ATOM	600	HG1	THR	40	7.327	7.550	-2.702	1.00	0.00
ATOM	601	CG2	THR	40	7.164	7.527	-5.364	1.00	0.00
ATOM	602	HG21	THR	40	7.651	7.496	-6.326	1.00	0.00
ATOM	603	HG22	THR	40	7.066	8.554	-5.042	1.00	0.00
ATOM	604	HG23	THR	40	6.183	7.080	-5.442	1.00	0.00
ATOM	605	C	THR	40	9.166	4.582	-3.891	1.00	0.00
ATOM	606	O	THR	40	10.293	4.253	-4.215	1.00	0.00
ATOM	607	N	SER	41	8.686	4.300	-2.702	1.00	0.00
ATOM	608	HN	SER	41	7.775	4.572	-2.467	1.00	0.00
ATOM	609	CA	SER	41	9.524	3.562	-1.709	1.00	0.00
ATOM	610	HA	SER	41	10.499	3.375	-2.134	1.00	0.00
ATOM	611	CB	SER	41	9.670	4.394	-0.435	1.00	0.00
ATOM	612	HB1	SER	41	8.877	4.137	0.255	1.00	0.00
ATOM	613	HB2	SER	41	9.604	5.441	-0.679	1.00	0.00
ATOM	614	OG	SER	41	10.936	4.128	0.153	1.00	0.00
ATOM	615	HG	SER	41	10.794	3.925	1.080	1.00	0.00
ATOM	616	C	SER	41	8.860	2.225	-1.377	1.00	0.00
ATOM	617	O	SER	41	7.796	1.921	-1.867	1.00	0.00
ATOM	618	N	ILE	42	9.489	1.418	-0.567	1.00	0.00
ATOM	619	HN	ILE	42	10.357	1.676	-0.193	1.00	0.00
ATOM	620	CA	ILE	42	8.897	0.088	-0.235	1.00	0.00

ATOM	621	HA	ILE	42	8.391	-0.300	-1.106	1.00	0.00
ATOM	622	CB	ILE	42	10.011	-0.883	0.172	1.00	0.00
ATOM	623	HB	ILE	42	10.391	-0.610	1.147	1.00	0.00
ATOM	624	CG1	ILE	42	11.145	-0.836	-0.860	1.00	0.00
ATOM	625	HG11	ILE	42	11.496	0.180	-0.962	1.00	0.00
ATOM	626	HG12	ILE	42	10.777	-1.186	-1.813	1.00	0.00
ATOM	627	CG2	ILE	42	9.443	-2.298	0.224	1.00	0.00
ATOM	628	HG21	ILE	42	9.306	-2.663	-0.783	1.00	0.00
ATOM	629	HG22	ILE	42	8.494	-2.287	0.737	1.00	0.00
ATOM	630	HG23	ILE	42	10.131	-2.941	0.750	1.00	0.00
ATOM	631	CD1	ILE	42	12.301	-1.729	-0.400	1.00	0.00
ATOM	632	HD11	ILE	42	12.203	-2.705	-0.859	1.00	0.00
ATOM	633	HD12	ILE	42	12.275	-1.825	0.675	1.00	0.00
ATOM	634	HD13	ILE	42	13.239	-1.285	-0.700	1.00	0.00
ATOM	635	C	ILE	42	7.888	0.233	0.907	1.00	0.00
ATOM	636	O	ILE	42	8.249	0.470	2.044	1.00	0.00
ATOM	637	N	CYS	43	6.621	0.082	0.604	1.00	0.00
ATOM	638	HN	CY3	43	6.363	-0.113	-0.322	1.00	0.00
ATOM	639	CA	CYS	43	5.569	0.198	1.656	1.00	0.00
ATOM	640	HA	CYS	43	5.746	1.082	2.251	1.00	0.00
ATOM	641	HB1	CYS	43	3.453	-0.182	1.629	1.00	0.00
ATOM	642	HB2	CYS	43	4.214	-0.215	0.039	1.00	0.00
ATOM	643	C	CYS	43	5.621	-1.042	2.550	1.00	0.00
ATOM	644	O	CYS	43	5.914	-2.131	2.093	1.00	0.00
ATOM	645	CB	CYS	43	4.189	0.289	0.993	1.00	0.00
ATOM	646	SG	CYS	43	3.742	2.028	0.741	1.00	0.00
ATOM	647	N	SER	44	5.342	-0.887	3.820	1.00	0.00
ATOM	648	HN	SER	94	5.111	0.002	4.163	1.00	0.00
ATOM	649	CA	SER	44	5.377	-2.057	4.746	1.00	0.00
ATOM	650	HA	SER	44	5.988	-2.837	4.317	1.00	0.00
ATOM	651	CB	SER	44	5.970	-1.626	6.089	1.00	0.00
ATOM	652	HB1	SER	44	7.044	-1.758	6.065	1.00	0.00
ATOM	653	HB2	SER	44	5.555	-2.229	6.880	1.00	0.00
ATOM	654	OG	SER	44	5.652	-0.261	6.327	1.00	0.00



```

Ser Met Ala Lys Arg Glu Glu Ala Glu Ala Glu Ala Pro Lys Phe Val
           85                      90                      95
Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val
           100                     105                     110
Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Asp Lys Gly Ile Val Glu Gln
           115                     120                     125
Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
           130                     135                     140

```

<210> 6

<211> 600

<212> DNS

<213> Alfa vezérszekvencia, N-terminálison meghosszabbított
Asp^{B28}(AspGlyLys)-hez fuzionáltatva

<220>

<221> CDS

<222> (114)..(554)

<400> 6

```

tcttgcttaa atctataact acaaaaaaca catacaggaa ttccattcaa gatctgttca 60
aacaagaaga ttacaaacta tcaatttcat acacaatata aacgattaaa aga atg 116
                                           Met
                                           1
aga ttt cct tca att ttt act gca gtt tta ttc gca gca tcc tcc gca 164
Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser Ala
           5                      10                      15
tta gct gct cca gtc aac act aca aca gaa gat gaa acg gca caa att 212
Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln Ile
           20                      25                      30
ccg gct gaa gct gtc atc ggt tac tca gat tta gaa ggg gat ttc gat 260

```



```

Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe Asp
   35                40                45
gtt gct gtt ttg cca ttt tcc aac agc aca aat aac ggg tta ttg ttt 308
Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu Phe
   50                55                60                65
ata aat act act att gcc agc att gct gct aaa gaa gaa ggg gta tcc 356
Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser
                70                75                80
atg gct aag aga gaa gaa gct gaa gct gaa gct cca aag ttc gtt aac 404
Met Ala Lys Arg Glu Glu Ala Glu Ala Glu Ala Pro Lys Phe Val Asn
                85                90                95
caa cac ttg tgt ggt tct cac ttg gtt gaa gct ttg tac ttg gtt tgt 452
Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys
                100                105                110
ggg gaa aga ggt ttc ttc tac act gac aag gag tgg aag ggt atc gtt 500
Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Asp Lys Glu Trp Lys Gly Ile Val
                115                120                125
gaa caa tgt tgt act tct atc tgt tct ttg tac caa ttg gaa aac tac 548
Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr
130                135                140                145
tgt aac tagacgcagc ccgcaggctc tagaaactaa gattaatata attata 600

```

Cys Asn

<210> 7

<211> 147

<212> FEHÉRJE

<213> Alfa vezérszekvencia, N-terminálison meghosszabbított
Asp^{B28}(AspGlyLys)-hez fúzionáltatva

<400> 7

```

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 Met Ala Lys Arg Glu Glu Ala Glu Ala Glu Ala Pro Lys Phe Val
 85 90 95
 Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val
 100 105 110
 Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Asp Lys Glu Trp Lys Gly Ile
 115 120 125
 Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn
 130 135 140
 Tyr Cys Asn
 145

<210> 8

<211> 6

<212> Fehérje

<213> N-terminális extenzió

<400> 8

Glu Glu Gly Glu Pro Lys

1

5

<210> 9

<211> 550

<212> DNS

<213> TA39 vezérszekvencia, N-terminálison meghosszabbított
 Asp^{B28}(AspGlyLys)-hez fúzionáltatva



<220>

<221> CDS

<222> (115)..(489)

<400> 9

```

ttcttgctta aatctataac tacaaaaaac acatacagga attccattca agaatagttc 60
aaacaagaag attacaaact atcaatttca tacacaatat aaacgattaa aaga atg 117
                                                    Met
                                                    1
aaa ctg aaa act gta aga tct gcg gtc ctt tcg tca ctc ttt gca tct 165
Lys Leu Lys Thr Val Arg Ser Ala Val Leu Ser Ser Leu Phe Ala Ser
           5                10                15
cag gtc ctt ggc caa cca att gac gac act gaa tct aac act act tct 213
Gln Val Leu Gly Gln Pro Ile Asp Asp Thr Glu Ser Asn Thr Thr Ser
           20                25                30
gtc aac ttg atg gct gac gac act gaa tct aga ttc gct act aac act 261
Val Asn Leu Met Ala Asp Asp Thr Glu Ser Arg Phe Ala Thr Asn Thr
           35                40                45
act ttg gct ggt ggt ttg gat gtt gtt aac ttg atc tcc atg gct aag 309
Thr Leu Ala Gly Gly Leu Asp Val Val Asn Leu Ile Ser Met Ala Lys
           50                55                60                65
aga gaa gaa ggt gaa cca aag ttc gtt aac caa cac ttg tgt ggt tcc 357
Arg Glu Glu Gly Glu Pro Lys Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser
           70                75                80
cac ttg gtt gaa gct ttg tac ttg gtt tgt ggt gaa aga ggt ttc ttc 405
His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe
           85                90                95
tac act gac aag gaa tgg aag ggt atc gtt gaa caa tgt tgt act tct 453
Tyr Thr Asp Lys Glu Trp Lys Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser
           100               105               110
atc tgt tct ttg tac caa ttg gaa aac tac tgt aac tagacgcagc 499
Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
           115               120               125
ccgcaggctc tagaaactaa gattaatata attatataaa aatattatct t 550

```

<210> 10

<211> 125

<212> FEHÉRJE

<213> TA39 vezérszekvencia, N-terminálison meghosszabbított
Asp^{B28}(AspGlyLys)-hez fúzionáltatva

<400> 10

```

Met Lys Leu Lys Thr Val Arg Ser Ala Val Leu Ser Ser Leu Phe Ala
  1              5              10              15
Ser Gln Val Leu Gly Gln Pro Ile Asp Asp Thr Glu Ser Asn Thr Thr
      20              25              30
Ser Val Asn Leu Met Ala Asp Asp Thr Glu Ser Arg Phe Ala Thr Asn
      35              40              45
Thr Thr Leu Ala Gly Gly Leu Asp Val Val Asn Leu Ile Ser Met Ala
      50              55              60
Lys Arg Glu Glu Gly Glu Pro Lys Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly
      65              70              75              80
Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
      85              90              95
Phe Tyr Thr Asp Lys Glu Trp Lys Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr
      100              105              110
Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
      115              120              125

```

<210> 11

<211> 550

<212> DNS

<213> TA57 vezérszekvencia, N-terminálison meghosszabbított
Asp^{B28}(AspGlyLys)-hez fúzionáltatva

<220>

<221> CDS



<222> (115)..(486)

<400> 11

```

ttctttgotta aatctataac tacaaaaaac acatacagga attccattca agaatagttc 60
aaacaagaag attacaaact atcaatttca tacacaatat aaacgattaa aaga atg 117
Met
1
aaa ctg aaa act gta aga tct gcg gtc ctt tcg tca ctc ttt gca tct 165
Lys Leu Lys Thr Val Arg Ser Ala Val Leu Ser Ser Leu Phe Ala Ser
5 10 15
cag gtc ctt ggc caa cca att gac gac act gaa tct caa act act tct 213
Gln Val Leu Gly Gln Pro Ile Asp Asp Thr Glu Ser Gln Thr Thr Ser
20 25 30
gtc aac ttg atg gct gac gac act gaa tct gct ttc gct act caa act 261
Val Asn Leu Met Ala Asp Asp Thr Glu Ser Ala Phe Ala Thr Gln Thr
35 40 45
aac tct ggt ggt ttg gat gtt gtt ggt ttg atc tcc atg gct aag aga 309
Asn Ser Gly Gly Leu Asp Val Val Gly Leu Ile Ser Met Ala Lys Arg
50 55 60 65
gaa gaa ggt gaa cca aag ttc gtt aac caa cac ttg tgc ggt tcc cac 357
Glu Glu Gly Glu Pro Lys Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His
70 75 80
ttg gtt gaa gct ttg tac ttg gtt tgc ggt gaa aga ggt ttc ttc tac 405
Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr
85 90 95
act gac aag gaa tgg aag ggt atc gtt gaa caa tgc tgt acc tcc atc 453
Thr Asp Lys Glu Trp Lys Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile
100 105 110
tgc tcc ttg tac caa ttg gaa aac tac tgc aac tagacgcagc ccgcaggctc 506
Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
115 120
tagaaactaa gattaatata attatataaa aatattatct tctt 550

```

<210> 12

<211> 124

<212> FEHÉRJE

<213> TA57 vezérszekvencia, N-terminálison meghosszabbított
Asp^{B28}(AspGlyLys)-hez fúzionáltatva

<400> 12

```

Met Lys Leu Lys Thr Val Arg Ser Ala Val Leu Ser Ser Leu Phe Ala
 1             5             10             15
Ser Gln Val Leu Gly Gln Pro Ile Asp Asp Thr Glu Ser Gln Thr Thr
      20             25             30
Ser Val Asn Leu Met Ala Asp Asp Thr Glu Ser Ala Phe Ala Thr Gln
      35             40             45
Thr Asn Ser Gly Gly Leu Asp Val Val Gly Leu Ile Ser Met Ala Lys
      50             55             60
Arg Glu Glu Gly Glu Pro Lys Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser
      65             70             75             80
His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe
      85             90             95
Tyr Thr Asp Lys Glu Trp Lys Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser
      100            105            110
Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
      115            120

```

<210> 13

<211> 27

<212> DNS

<213> Primer

<400> 13

taaatctata actacaaaaa acacata

27

<210> 14

<211> 109

<212> DNS

<213> Primer

<220>

<221> vegyes tulajdonság

<222> (22)..(24)

<223> n jelentése a, t, g vagy c és m jelentése c vagy a

<400> 14

```
ccaaagaaga tgtgactgtt cnnmcccttc ccatagcaac ttgttacaac atgaagatag 60
acaagaaaca tggttaacct tttgatgaca ttgatcagat ctttgattc 109
```

<210> 15

<211> 45

<212> FEHÉRJE

<213> TA39 szintetikus propeptid

<400> 15

```
Gln Pro Ile Asp Asp Thr Glu Ser Asn Thr Thr Ser Val Asn Leu Met
  1             5             10             15
Ala Asp Asp Thr Glu Ser Arg Phe Ala Thr Asn Thr Thr Leu Ala Gly
             20             25             30
Gly Leu Asp Val Val Asn Leu Ile Ser Met Ala Lys Arg
          35             40             45
```

<210> 16

<211> 44

<212> FEHÉRJE

<213> TA57 szintetikus propeptid

<400> 16

Gln	Pro	Ile	Asp	Asp	Thr	Glu	Ser	Gln	Thr	Thr	Ser	Val	Asn	Leu	Met
1				5				10					15		
Ala	Asp	Asp	Thr	Glu	Ser	Ala	Phe	Ala	Thr	Gln	Thr	Asn	Ser	Gly	Gly
			20					25					30		
Leu	Asp	Val	Val	Gly	Leu	Ile	Ser	Met	Ala	Lys	Arg				
			35					40							

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

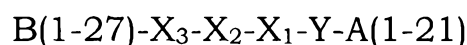
1. Inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, ami egy összekötő peptidet (C-peptid) tartalmaz, ami lehasítható az A és B láncról, és az említett összekötő peptid legalább egy Gly csoportot tartalmaz, és a B27 (CG2 atom) és az A1 (CA atom) között a távolság kisebb mint 5 Angström.
2. Az 1. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben az összekötő peptid maximum 10 aminosav csoportot tartalmaz.
3. Az 1. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben az összekötő peptid maximum 9 aminosav csoportot tartalmaz.
4. Az 1. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben az összekötő peptid maximum 5 aminosav csoportot, előnyösen maximum 3 aminosav csoportot tartalmaz.
5. Az 1. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben az összekötő peptid maximum 5 Gly csoportot tartalmaz.
6. Az 1. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben az összekötő peptid maximum 3 Gly csoportot, előnyösen csak egy Gly csoportot tartalmaz.
7. Az 1. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben az összekötő peptid egy C-terminális



Lys vagy Arg csoportot tartalmaz, az A lánchoz viszonyítva közvetlenül N-terminális pozícióban.

8. A 7. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben egy Gly csoport a Lys vagy Arg csoporthoz viszonyítva közvetlenül N-terminális pozícióban van.

9. Az 1. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, ami a I képletű általános szekvenciát tartalmazza:



amiben

X_1 legalább egy Gly aminosav csoportot tartalmaz,

X_2 jelentése Pro, Asp, Ala, Arg vagy Pro-Thr a B lánc 29-es pozíciójában,

X_3 jelentése Pro, Asp, Lys vagy Ile a B lánc 28-as pozíciójában, és

Y jelentése Lys vagy Arg.

10. A 9. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben X_1 1-15 aminosav csoportból áll.

11. A 9. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben X_1 1-10 aminosav csoportból áll.

12. A 9. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben X_1 1-8 aminosav csoportból áll.

13. A 9. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben X_1 1-5 aminosav csoportból áll.

14. A 9. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben X_1 1-3 aminosav csoportból áll.

15. A 9. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben X_1 maximum 5 Gly csoportot tartalmaz.

16. A 9. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben X_1 maximum 3, előnyösen csak egy Gly csoportot tartalmaz.

17. A 9. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben X_3 jelentése Asp, X_2 jelentése Lys.

18. A 9. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben X_1 -Y-t az alábbi csoportból választjuk ki:

- a) Glu-Glu-Gly-Lys (1. számú szekvencia)
- b) Glu-Gly-Lys
- c) Ser-Gly-Lys
- d) Asn-Gly-Lys
- e) Thr-Gly-Lys
- f) Asp-Gly-Lys
- g) Met-Gly-Lys
- h) Ala-Gly-Lys
- i) His-Gly-Lys
- j) Gly-Lys

19. A 9. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben egy Gly csoport az Y-hoz viszonyítva N-terminális pozícióban helyezkedik el.

20. Inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, ami egy összekötő peptidet (C-peptid) tartalmaz, ami lehasítható az A

és B láncról, és az említett összekötő peptid legalább egy Gly csoportot és egy hasítási helyet tartalmaz, ami lehetővé teszi, hogy az A-lánc és az összekötő peptid között elhasítsuk a peptidkötést, és az egy Gly csoport az említett hasítási helyhez viszonyítva közvetlenül N-terminális pozícióban van.

21. A 20. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben az összekötő peptid maximum 15 aminosav csoportot tartalmaz.

22. A 20. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben az összekötő peptid maximum 10 aminosav csoportot tartalmaz.

23. A 20. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben az összekötő peptid maximum 9 aminosav csoportot tartalmaz.

24. A 20. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben az összekötő peptid maximum 5 aminosav csoportot tartalmaz.

25. A 20. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben az összekötő peptid maximum 3 aminosav csoportot tartalmaz.

26. A 20. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben a B27 (CG2 atom) és az A1 (CA atom) közötti távolság 5 Angströmnél kisebb.

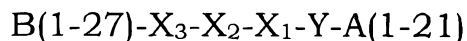
27. A 20. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben az összekötő peptid maximum 5 Gly csoportot tartalmaz.



28. A 20. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben az összekötő peptid maximum 3 Gly csoportot, előnyösen csak 1 Gly csoportot tartalmaz.

29. A 20. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben az A-lánc és az összekötő peptid közötti peptidkötés hasítását lehetővé tevő hasítási hely Lys vagy Arg.

30. A 20. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, ami a I általános képletű szekvenciát tartalmazza:



amiben

X_1 egy Gly aminosav csoportot tartalmaz, az Y csoporthoz viszonyítva közvetlenül N-terminális pozícióban

X_2 jelentése Pro, Asp, Ala, Arg vagy Pro-Thr a B lánc 29-es pozíciójában,

X_3 jelentése Pro, Asp, Lys vagy Ile a B lánc 28-as pozíciójában, és

Y jelentése Lys vagy Arg.

31. A 30. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben X_1 1-15 aminosav csoportot tartalmaz.

32. A 30. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben X_1 1-10 aminosav csoportot tartalmaz.

33. A 30. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben X_1 1-8 aminosav csoportot tartalmaz.



34. A 30. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben X_1 1-5 aminosav csoportot tartalmaz.

35. A 30. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben X_1 1-3 aminosav csoportot tartalmaz.

36. A 30. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben X_1 maximum 5 Gly csoportot tartalmaz.

37. A 30. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben X_1 maximum 3, előnyösen csak egy Gly csoportot tartalmaz.

38. A 30. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben X_3 jelentése Asp, X_2 jelentése Lys.

39. A 30. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben X_1 -Y-t az alábbi csoportból választjuk ki:

- a) Glu-Glu-Gly-Lys (1. számú szekvencia)
- b) Glu-Gly-Lys
- c) Ser-Gly-Lys
- d) Asn-Gly-Lys
- e) Thr-Gly-Lys
- f) Asp-Gly-Lys
- g) Met-Gly-Lys
- h) Ala-Gly-Lys
- i) His-Gly-Lys
- j) Gly-Lys

40. A 30. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben a B27 (CG2 atom) és az A1 (CA atom) közötti távolság 5 Angströmnél kisebb.

41. Inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, ami olyan összekötő peptidet (C-peptid) tartalmaz, ami lehasítható az A és B láncokról, és az említett összekötő peptid legalább egy Gly csoportot tartalmaz, és az összekötő peptid hossza maximum 5 aminosav csoport.

42. A 41. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben az összekötő peptid hossza maximum 3 vagy maximum 2 aminosav csoport.

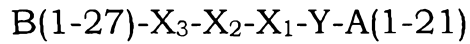
43. A 41. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben az összekötő peptid maximum 3, előnyösen csak egy Gly csoportot tartalmaz.

44. A 41. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben az összekötő peptid egy Lys vagy egy Arg csoportot tartalmaz az A lánchoz viszonyítva közvetlenül N-terminális pozícióban.

45. A 41. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben egy Gly csoport a Lys vagy Arg csoporthoz viszonyítva közvetlenül N-terminális pozícióban van.

46. A 41. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben a B27 (CG2 atom) és az A1 (CA atom) közötti távolság 5 Angströmnél kisebb.

47. A 41. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, ami a I általános képletű szekvenciát tartalmazza:



amiben

X_1 1-5 aminosav csoportból áll, és legalább egy Gly csoportot tartalmaz,

X_2 jelentése Pro, Asp, Ala, Arg vagy Pro-Thr a B lánc 29-es pozíciójában,

X_3 jelentése Pro, Asp, Lys vagy Ile a B lánc 28-as pozíciójában, és

Y jelentése Lys vagy Arg.

48. A 47. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben X_1 1-4 aminosav csoportot tartalmaz.

49. A 47. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben X_1 1-3 aminosav csoportot tartalmaz.

50. A 47. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben X_1 maximum három, előnyösen csak egy Gly csoportot tartalmaz.

51. A 47. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben X_3 jelentése Asp és X_2 jelentése Lys.

52. A 47. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben X_1 -Y-t az alábbi csoportból választjuk ki:

- a) Glu-Glu-Gly-Lys (1. számú szekvencia)
- b) Glu-Gly-Lys

- c) Ser-Gly-Lys
- d) Asn-Gly-Lys
- e) Thr-Gly-Lys
- f) Asp-Gly-Lys
- g) Met-Gly-Lys
- h) Ala-Gly-Lys
- i) His-Gly-Lys
- j) Gly-Lys

53. A 47. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben egy Gly csoport az Y-hoz viszonyítva közvetlenül N-terminális pozícióban van.

54. A 47. igénypont szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analóg, amiben a B27 (CG2 atom) és az A1 (CA atom) közötti távolság 5 Angströmnél kisebb.

55. Polinukleotid szekvencia, ami az 1-55. igénypontok bármelyike szerinti inzulin prekursor vagy inzulin prekursor analógot kódol.

56. Expressziós vektor, ami az 55. igénypont szerinti polinukleotid szekvenciát tartalmaz.

57. Gazdasejt, ami az 56. igénypont szerinti vektorral van transzformálva.

58. Eljárás inzulin prekursorok vagy inzulin prekursor analógok előállítására, azzal jellemezve, hogy az említett eljárásban a következő lépéseket alkalmazzuk:

- a) az 1-54. igénypontok bármelyike szerinti inzulin prekursorokat vagy inzulin prekursor analógokat kódoló

polinukleotid szekvenciát tartalmazó gazdasejtet az említett prekursor vagy prekursor analóg expressziójához szükséges körülmények között tenyésztjük; és

- b) az expresszált prekuzort vagy prekuzor analógot izoláljuk.

59. Az 58. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a gazdasejt élesztő gazdasejt.

60. Eljárás inzulin prekuzorok vagy inzulin prekuzor analógok előállítására, azzal jellemezve, hogy az említett eljárásban a következő lépéseket alkalmazzuk:

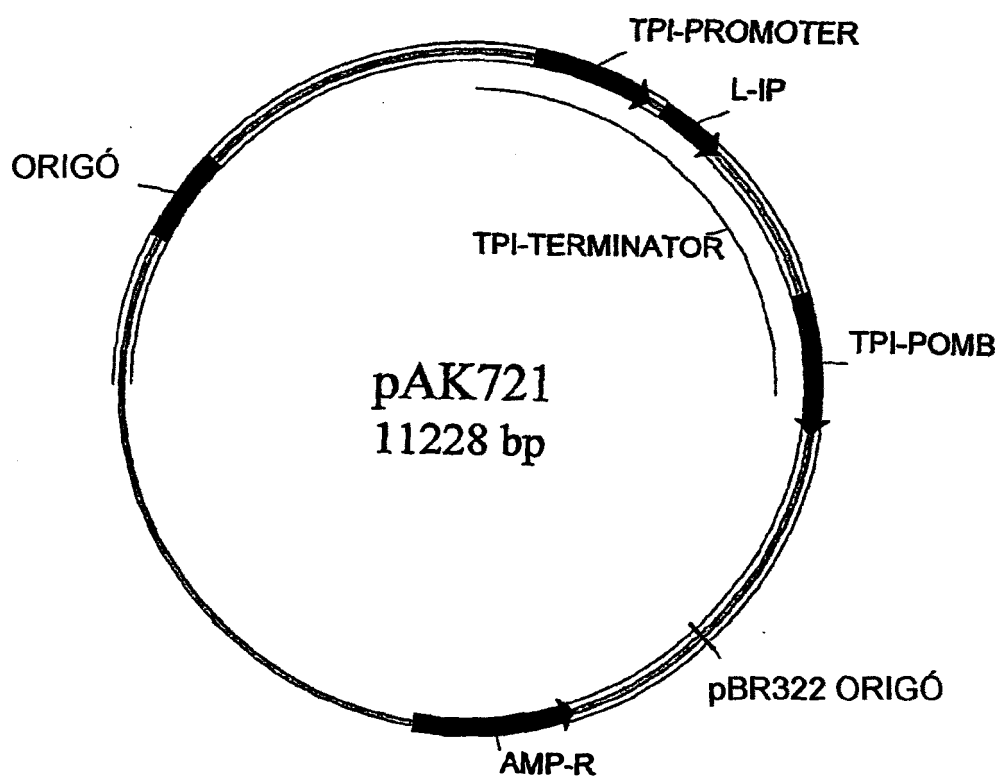
- a) az 1-54. igénypontok bármelyike szerinti inzulin prekuzorokat vagy inzulin prekuzor analógokat kódoló polinukleotid szekvenciát tartalmazó gazdasejtet az említett prekuzor vagy prekuzor analóg expressziójához szükséges körülmények között tenyésztjük; és
- b) a prekuzort vagy prekuzor analógot izoláljuk a tenyésztő táptalajból
- c) a prekuzort vagy prekuzor analógot inzulinná vagy inzulin analóggá konvertáljuk *in vitro* kémiai vagy enzimatisus konverzióval.

61. A 60. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a gazdasejt élesztő gazdasejt-vonal.

91 oldal
8 oldal
99 oldal
Fertő

ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Szabadalmi Ügyvédi Iroda
tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 461-1000 Fax: 461-1099

1. ábra



ECORI BglII

Bq111

1451 GCAGCCCGCA GGCTCTAGAA ACTAAGATTAT ATATAATTAT ATAAAAATAT
CGTCGGGGCGT CCGAGATCTT TGATTCTAAT TATATTAATA TATTTTATA

3. ábra

```

                                EcoRI   BglII
-----
901  TCTTGCTTAA ATCTATAACT ACAAAAAACA CATAACAGGAA TTCCATTCAA
    AGAACGAATT TAGATATTGA TGTTTTTTGT GTATGTCCTT AAGGTAAGTT
    BglII
-----
951  GATCTGTTCA AACAGAAGA TTACAACTA TCAATTCAT ACACAATATA
    CTAGACAAGT TTGTTCTTCT AATGTTTGAT AGTTAAAGTA TGTGTTATAT
+3      M R F P S I F T A V L F
                                PstI
-----
1001 AACGATTAAA AGAATGAGAT TTCCTTCAAT TTTTACTGCA GTTTTATTCTG
    TTGCTAATTT TCTTACTCTA AAGGAAGTTA AAAATGACGT CAAAATAAGC

+3  A A S S A L A A P V N T T T E D E
1051 CAGCATCCTC CGCATTAGCT GCTCCAGTCA AACTACAAC AGAAGATGAA
    GTCGTAGGAG GCGTAATCGA CGAGGTCAGT TGTGATGTTG TCTTCTACTT

+3  T A Q I P A E A V I G Y S D L E G
1101 ACGGCACAAA TTCCGGCTGA AGCTGTCATC GGTACTCAG ATTTAGAAGG
    TGCCGTGTTT AAGGCCGACT TCGACAGTAG CCAATGAGTC TAAATCTTCC

+3  D F D V A V L P F S N S T N N G
1151 GGATTTCGAT GTTGCTGTTT TGCCATTTTC CAACAGCACA AATAACGGGT
    CCTAAGCTA CAACGACAAA ACGGTAAAAG GTTGTCGTGT TTATTGCCCA

+3  L L F I N T T I A S I A A K E E G
1201 TATTGTTTAT AAATACTACT ATTGCCAGCA TTGCTGCTAA AGAAGAAGGG
    ATAACAAATA TTTATGATGA TAACGGTCGT AACGACGATT TCTTCTTCCC

+3  V S M A K R E E A E A E A P K F V
    NcoI                                     HpaI
-----
1251 GTATCCATGG CTAAGAGAGA AGAAGCTGAA GCTGAAGCTC CAAAGTTCGT
    CATAGGTACC GATTCTCTCT TCTTCGACTT CGACTTCGAG GTTTCAGCA

+3  N Q H L C G S H L V E A L Y L V.
    HpaI                                     HindIII
-----
1301 TAACCAACAC TTGTGTGGTT CTCACTTGGT TGAAGCTTTG TACTTGGTTT
    ATTGGTTGTG AACACACCAA GAGTGAACCA ACTTCGAAAC ATGAACCCAA

+3  C G E R G F F Y T D K D G K G I V
1351 GTGGTGAAAG AGGTTTCTTC TACACTGACA AGGACGGTAA GGGTATCGTT
    CACCACTTTC TCCAAAGAAG ATGTGACTGT TCCTGCCATT CCCATAGCAA

+3  E Q C C T S I C S L Y Q L E N Y C
1401 GAACAATGTT GTACTTCTAT CTGTTCTTTG TACCAATTGG AAAACTACTG
    CTTGTTACAA CATGAAGATA GACAAGAAAC ATGGTTAACC TTTTGATGAC

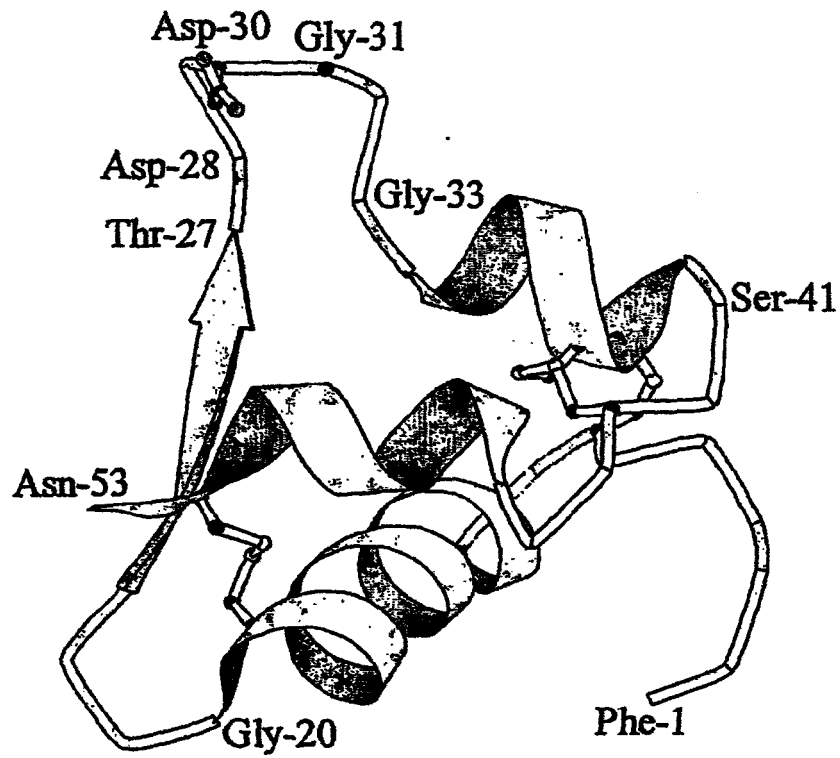
+3  N *
                                XbaI
-----
1451 TAACTAGACG CAGCCCGCAG GCTCTAGAAA CTAAGATTAA TATAATTATA
    ATTGATCTGC GTCGGGCGTC CGAGATCTTT GATTCTAATT ATATTAATAT

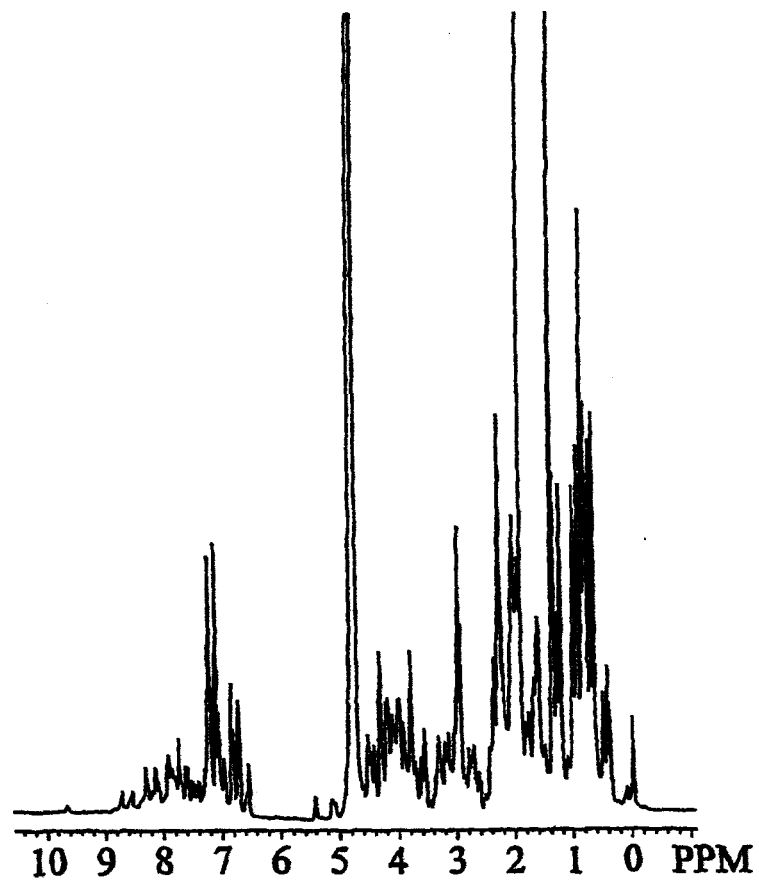
```

4. ábra



5. ábra



6. ábra

7. ábra

```

901 TTCTTGCTTA AATCTATAAC TACAAAAAAC ACATACAGGA ATTCCATTCA
    AAGAACGAAT TTAGATATTG ATGTTTTTTG TGTATGTCCT TAAGGTAAGT

951 AGAANTAGTTC AAACARGAAG ATTACAAACT ATCAATTTCA TACACAATAT
    TCTTATCAAG TTTGTTCTTC TAATGTTTGA TAGTTAAAGT ATGTGTTATA

+1      M K L K T V R S A V L S
          BglII
          -----
1001 AAACGATTAA AAGAATGAAA CTGAAAACTG TAAGATCTGC GGTCCCTTTCG
    TTTGCTAATT TTCTTACTTT GACTTTTGAC ATTCTAGACG CCAGGAAAGC

+1 S L F A S Q V L G Q P I D D T E S
          MscI
          -----
1051 TCACTCTTTG CATCTCAGGT CCTTGGCCAA CCAATTGACG ACACTGAATC
    AGTGAGAAAC GTAGAGTCCA GGAACCGGTT GGTAACTGC TGTGACTTAG

+1 N T T S V N L M A D D T E S R F
          XbaI
          -----
1101 TAACACTACT TCTGTCAACT TGATGGCTGA CGACACTGAA TCTAGATTTCG
    ATTGTGATGA AGACAGTTGA ACTACCGACT GCTGTGACTT AGATCTAAGC

+1 A T N T T L A G G L D V V N L I S
          HpaI NcoI
          -----
1151 CTAATAACAC TACTTTGGCT GGTGGTTTGG ATGTTGTTAA CTTGATCTCC
    GATGATTGTG ATGAAACCGA CCACCAAACC TACAACAATT GAACTAGAGG

+1 M A K R E E G E P K F V N Q H L C
    NcoI HpaI
    -----
1201 ATGGCTAAGA GAGAAGAAGG TGAACCAAAG TTCGTTAACC AACACTTGTG
    TACCGATTCT CTCTTCTTCC ACTTGGTTTC AAGCAATTGG TTGTGAACAC

+1 G S H L V E A L Y L V C G E R G
          HindIII
          -----
1251 TGGTTCCAC TTGGTTGAAG CTTTGTACTT GGTTTGTGGT GAAAGAGGTT
    ACCAAGGGTG AACCAACTTC GAAACATGAA CCAACACCA CTTTCTCCAA

+1 F F Y T D K D W K G I V E Q C C T
1301 TCTTCTACAC TGACAAGGAC TGGAAGGGTA TCGTTGAACA ATGTTGTACT
    AGAAGATGTG ACTGTTCCCTG ACCTTCCCAT AGCAACTTGT TACAACATGA

+1 S I C S L Y Q L E N Y C N *
1351 TCTATCTGTT CTTTGTACCA ATTGGAAAAC TACTGTAACT AGACGCAGCC
    AGATAGACAA GAAACATGGT TAACCTTTTG ATGACATTGA TCTGCGTCGG

          XbaI
          -----
1401 CGCAGGCTCT AGAAACTAAG ATTAATATAA TTATATAAAA ATATTATCTT
    GCGTCCGAGA TCTTTGATTC TAATTATATT AATATATTTT TATAATAGAA
  
```

8. ábra

901 TTCTTGCTTA AATCTATAAC TACAAAAAAC ACATACAGGA ATTCCATTCA
AAGAACGAAT TTAGATATTG ATGTTTTTTG TGTATGTCCT TAAGGTAAGT

951 AGAATAGTTC AAACAAGAAG ATTACAACT ATCAATTTC TACACAATAT
TCTTATCAAG TTTGTTCTTC TAATGTTTGA TAGTTAAAGT ATGTGTTATA

+1 M K L R T V R S A V L S
BgIII

1001 AAACGATTAA AAGAATGAAA CTGAAAAC TGATCTGTC GGTCCCTTTCG
TTTGCTAATT TTCTTACTTT GACTTTTGAC ATTCTAGACG CCAGGAAAGC

+1 S L F A S Q V L G Q P I D D T E S
MscI

1051 TCACTCTTTG CATCTCAGGT CCTTGGCCAA CCAATTGACG ACACTGAATC
AGTGAGAAAC GTAGAGTCCA GGAACCGGT GGTAACTGC TGTGACTTAG

+1 Q T T S V N L M A D D T E S A F

1101 TCAAACTACT TCTGTCAACT TGATGGCTGA CGACACTGAA TCTGCTTTG
AGTTTGATGA AGACAGTTGA ACTACCGACT GCTGTGACTT AGACGAAAGC

+1 A T Q T N S G G L D V V G L I S M
NcoI

1151 CTACTCAAAC TAACTCTGGT GGTITGGATG TTGTTGGTTT GATCTCCATG
GATGAGTTTG ATTGAGACCA CCAAACCTAC AACAACCAAA CTAGAGGTAC

+1 A K R E E G E P R F V N Q H L C G
NcoI HpaI

1201 GCTAAGAGAG AAGAAGGTGA ACCAAAGTTC GTTAACCAAC ACTTGTGCGG
CGATTCTCTC TTCTTCCACT TGGTTTCAAG CAATTGGTTG TGAACACGCC

+1 S H L V E A L Y L V C G E R G F
HindIII

1251 TTCCCACTTG GTTGAAGCTT TGTACTTGGT TTGCGGTGAA AGAGGTTTCT
AAGGGTGAAC CAACTTCGAA ACATGAACCA AACGCCACTT TCTCCAAAGA

+1 F Y T D K D G K G I V E Q C C T S

1301 TCTACACTGA CAAGGACGGT AAGGGTATCG TTGAACAATG CTGTACCTCC
AGATGTGACT GTTCCTGCCA TTCCCATAGC AACTTGTTAC GACATGGAGG

+1 I C S L Y Q L E N Y C N *

1351 ATCTGCTCCT TGTACCAATT GGAAAACTAC TGCAACTAGA CGCAGCCCGC
TAGACGAGGA ACATGGTTAA CCITTTGATG ACGTTGATCT GCGTCGGGCG

XbaI

1401 AGGCTCTAGA AACTAAGATT AATATAATTA TATAAAAATA TTATCTTCTT
TCCGAGATCT TTGATTCTAA TTATATTAAAT ATATTTTTAT AATAGAAGAA