

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



ОПИСАНИЕ
НА ИЗОБРЕТЕНИЕ
ПО ПАТЕНТ

ИНСТИТУТ ЗА ИЗОБРЕТЕНИЯ И РАЦИОНАЛИЗАЦИИ

(19) BG (11) 51358A

5(51) C 12 P 21/00

C 12 N 15/31

//(C12 P 21/00,

C 12 R 1 :46)

(21) Регистров № 94614
(22) Заявено на 12.06.91
(23) Изложбен приоритет

Приоритетни данни

(31) 1989
(32) 16.12.88
(33) AU
(45) Отпечатано на 30.04.93
(46) Публикувано в бюл.№ 4 на 15.04.93
(56) Цитирани информационни източници:

(61) Доп. към №
(62) Разд. от рег. №

(72)(73) Изобретател(и) и патентопри-
жател(и):

James Cleland Paton
David John Hansman (AU)
Graham John Boulnois
Peter William Andrew
Timothy John Mitchell
John Arthur Walker (GB)

(86) PCT/AU 89/00539, 15.12.89

(87) WO 90/06951, 28.06.90

(89) № на документа
в страната-заявител :

(54) МЕТОД ЗА ПОЛУЧАВАНЕ НА РЕКОМБИНАНТЕН ПНЕУМОЛИЗИН И ПРИЛОЖЕНИЕ-
ТО МУ

(57) Рекомбинантният пнеумолизин е необходим за изготвяне на ваксини срещу заболяванията, при-
чинени от *Streptococcus pneumoniae*. Методът се осъществява с познати рекомбинантни техники с
участието както на прокариотни, така и на еукариотни клетки-гостоприемници за експресия, като се
получава нетоксичен за хората продукт. Приложението му като ваксина се основава на изготвяне на
конюгати с пневмококови капсуларни полизахариди.

5 претенции

BG 51358 A

(54) МЕТОД ЗА ПОЛУЧАВАНЕ НА РЕКОМБИНАНТЕН ПНЕУМОЛИЗИН И ПРИЛОЖЕНИЕТО МУ

Изобретението се отнася до метод за получаване на рекомбинантен пнеумолизин и приложението му като ваксина срещу пнеумококови заболявания.

Известно е, че *Streptococcus pneumoniae* е болестотворен агент, причиняващ заразените заболявания пнеумония, менингит и бактериемия. Дори там, където е възможна ефективна антибиотична терапия, степента на смъртност от пнеумококова пнеумония може да достигне 19% при хоспитализирани пациенти и да нарасне до 30-40% при пациентите с бактериемия. Степента на смъртност при пнеумококовия менингит е от 13 до 45%, но причинява по-малко сериозни, но широко разпространени инфекции като отитис медиа и синусит.

Известно е също, че за предпазване от сериозни инфекции, по-специално от бактериална пнеумония, и за предпазване на болни, които са с отстранен далак, и на малки деца, които са особено чувствителни на взривовите от преуминални заболявания, е създадена ваксина, съставена от пречистени капсуларни полизахариди, представляващи пневмококови повърхностни антигени. Известно е също, че всеки серотип от *S.pneumoniae* /на брой около 83/ има структурно различен капсуларен полизахарид и имунизацията с един серотип не води до предпазване срещу широк кръг други серотипове. Предпазването дори срещу серотиповете, включени във ваксината, не е пълно, като се известни сериозни, дори фатални, инфекции, проявяващи се у ваксинираните високорисковни индивиди.

Ефектът на ваксината е най-печален върху малките деца и няколко студий, включително тази, която се основава на изследвания в Аделаида, показват, че дадената формула има малка или никаква полза за клиниката в тази група. Този недостатък е свързан с лошата имуногенност на пнеумококовите полизахариди у деца на възраст под 5 години. Затова възниква необходимостта от създаване на ваксина, включваща антигени, различни от капсуларните полизахариди. Като такъв може да послужи пнеумолизиновия протеинов токсин, продуциран

от вирулентни изолати на *S.pneumoniae*. От друга страна той е токсичен за хората.

Задачата на изобретението е да се създаде метод за получаване на рекомбинантен пнеумолизин, който да е нетоксичен и същевременно да е имуногенетично еднакъв с токсичната форма, така че да предизвика имунен отговор, който да предпазва от заболявания, когато е включен във ваксина.

Задачата се решава с метод, съгласно който конфигурацията на базите на пнеумолизина се променят така, че имуногенетичният отговор, получаван от рекомбинантния протеин, да е имуногенетично различен от природния пнеумолизин, т.е. или да има повишен протективен капацитет, или да няма такъв. По този начин може пнеумолизинът да се използва сам по себе си за имунизация или да бъде конюгиран с пневмококов полизахарид, или да бъде включен във ваксина, където пневмококовият полизахарид да бъде конюгиран с друг протеин или пък да присъства в неконюгирана форма.

За конструиране на нетоксичния пнеумолизин, подходящ за прилагане на хора, са използвани рекомбинантни техники. За целта генът на *Streptococcus pneumoniae*, кодиращ пнеумолизин, се клонира в *E.coli* и се определя неговата пълна ДНК последователност. Последната е показана на фиг.1. На фиг.2 е изложена ДНК последователността на променения ген, кодиращ дивия тип пнеумолизин, приложим за клониране на пнеумолизиновия ген в експресионен вектор. Фиг.3 показва аминокиселинната последователност на дивия тип пнеумолизин, както е получен от ДНК последователността на гена, кодиращ дивия тип пнеумолизин, и фиг.4 показва аминокиселинната последователност на пнеумолизин, илюстрирайки аминокиселинното заместване, предизвикано от сайт-насочената мутагенеза.

На олигонуклеотид-насочена мутагенеза са подложени три области от пнеумолизиновия ген. Първата област кодира аминокиселините 427-437 и протеиновата последователност е означена с подчертаване (фиг.3). Тази, състояща се от 11 аминокиселини, последователност показва абсолютна хомогенност с аналогични области в други тиолсвързани активирани токсини, така че се смята, че са отговорни за хемо-

литичната активност и за токсичната активност на токсина. Другите две области, кодиращи аминокиселините 257-297 и аминокиселините 368-397 също са посочени с подчертаване (фиг.3). Тези две области на токсина имат съществена аминокиселинна хомоложност с човешкия С-реактивен протеин /CRP/ и оттук се налага изводът, че са отговорни за способността на пнеумолизина да свързва Fc областта на имуноглобулините и да активира комплемента.

Петнадесет отделни мутации в пнеумолизиновия ген, изразяващи се в единични аминокиселинни замествания, са конструирани така, както е показано на фиг.4. За да се поддържа структурата на променения пнеумолизин, са направени консервативни замествания, в които аминокиселините са субституирани с аминокиселини с аналогична природа.

За областта, отговорна за хемолитичната активност се извършват следните замествания: Cys428 → Gly, Cys428 → Ser, Trp433 → Phe, Glu434 → Asp и Trp435 → Phe, всеки от които редуцира хемолитичната активност съответно с 97%, 90%, 99%, 75% и 90%. Другите мутации в тази област /Cys428 → Ala, Glu434 → Gln и Trp436 → Phe/ не засягат хемолитичната активност. Мутацията на отделна област от токсина, считана за отговорна за свързването към клетъчните мембрани на клетката мишена, също засяга хемолитичната активност на протеина. Заместването на His367 → Arg напълно инхибира хемолитичната активност. Следователно, това е почти непредсказуем ефект, че заместването His367 → Arg показва по-силно инхибиране на тази способност, отколкото заместванията, извършени в 11-та аминокиселинна област, считани отговорни за хемолитичната активност.

Мутациите в CRP - подобните области се изследват за способност да активират комплемента. За Trp379 → Phe, Trp384 → Phe, Asp385 → Asn и Trp379 → Phe активирането на комплемента е редуцирано до 20%, 70%, 100% и 15% респективно. Другите мутации в CRP - подобните области, показани на фиг.4, не редуцират комплементната активация.

Особено важно е, че тези мутации, засягащи хемолитичната активност или активирането на комплемента, не увреждат имуногенността на

протеините в сравнение с нативния или див тип пнеумолизин.

Мутацията His367 → Arg е предпочитаната мутация за редуциране активността на хемолитичната активност, а комбинацията от две или повече мутации с въздействие за редуциране на хемолитичната активност също може да достигне много високо ниво на редукция на хемолитичната активност. Подобно мутацията Asp385-Asn е предпочитана за редуциране на комплемента, но може да бъде използвана също така и комбинация от две или повече мутации, редуциращи активността на комплемента.

Изобретението се отнася до метод за получаване на рекомбинантен клон, съдържащ репликон и ДНК последователност, кодираща изменения пнеумолизин, транскрипция и трансляция на този клониран материал, пречистване на получения пнеумолизин и конюгиране на така получения пнеумолизин с капсуларен полизахарид.

Капсуларният материал може да се получи от който и да е от серотиповете на *S.pneumoniae* 6 A, 6 B, 14, 18 C, 19 A, 19 F, 23 F, 1,2,3,4,5,7F,8,9N,9V,10A,11A,12F,15B,17F,20,22F и 33F.

В този случай серотиповете, които обикновено се асоциират с болестите по децата и към които децата имат слаб имуен отговор, могат да се локализируют специфично (серотипове Дания 6A,6B,14,18C,19A,19F и 23F). Могат да се използват и други широко известни серотипове като

1,2,3,4,5,7F,8,9N,9V,10A,11A,12F,15B,17F,20,22F и 33F или който и да е друг серотип. Конюгацията на който и да е от пнеумококовите полизахариди с протеинов носител осигурява добра Т-клетъчна зависимост на имунитета у децата, така че да се продуцира защитно ниво на анти-полизахаридните антители.

Комбинацията от променения пнеумолизин съвместно с капсуларния материал осигурява допълнителна степен на защита, по-специално срещу серотиповете от *S.pneumoniae*, чиито полизахариди не са включени в съществуващите форми на ваксини.

Препоръчително е въвеждането на ваксината да става подкожно, със или без подходящ адювант, като напр. колоиден алуминиев хидрооксид.

Изобретението се пояснява със следното примерно изпълнение.

Пример 1. При най-подходящото изпълнение производният пнеумолизин съдържа комбинация от някои от следващите мутации, така че протеинът да е неспособен да активира компонента като добавка към нулевата му хемолитична активност:

1. His367 → Arg + Asp385 → Asn
2. His367 → Arg + Asp385 → Asn + или Cys428 → Cys или Trp433 → Phe
3. Asp385 → Asn + Cys428 → Gly + Trp433 → Phe

Освен това промененият пнеумолизин може да включва която и да е от отделните мутации с достатъчно редуцирана активност.

Високо ниво на експресия за променения пнеумолизин от ДНК кодирането може да се достигне чрез използване на която и да е от конвенционалните техники, включително експресия в прокариотен гостоприемник с ДНК, клонирана по подходящ начин в който и да е от многото експресионни вектори, които са на разположение или клонирани по подходящ начин в хромозомата на гостоприемника, експресия в еукариотния гостоприемник с ДНК, клонирана по подходящ начин или в експресионния вектор или клониран в хромозомата на гостоприемника, или в *in vitro* експресионна система, която да включва пречистени компоненти, необходими за експресия на променения пнеумолизин.

За да се постигне високо ниво на експресия на мутантния пнеумолизин ген, последният е клониран във вектор на експресия рКК233-2 за експресия в *E. coli* или други подобни прокариоти. Този вектор включва гени за устойчивост към ампицилин и тетрациклин, *trc*-промотор /който може да бъде регулиран чрез IPTG/ изопропил-β-D-тиогалактопиранозид/ и *lac Z* сайт за свързване на рибозомата, съседен на АТГ инициращ кодон, включващ *NcoI* рестрикционен сайт. Веднага под инициращия кодон има рестрикционни сайтове от *PstI* и

Hind III, следвани от силни T₁T₂ транскрипционни терминатори. Преди инсерцията в рКК233-2, *NcoI* рестрикционният сайт е конструиран при 5'-края на пнеумолизин кодираща-

та секвенция (при инициращия кодон) чрез олигонуклеотид-насочена мутагенеза (фиг.2). Това дава възможност проксималният (близкият) край от променения пнеумолизин ген да бъде клониран в *NcoI* сайт от рКК233-2; *Hind III* сайт приблизително 80 бази надолу от пнеумолизин терминаторния кодон е използван да съедини дисталният (далечният) край на променения ген в съвместим сайт в рКК233-2. Мутантния пнеумолизин дериват може да бъде клониран в която и да е от многото високо експресионни системи (вектори).

Мутантния пнеумолизин се получава, като клетки на *E. coli* носители на рекомбинантния плазмид, описан по-горе, се култивират в 9 литра култура на Лурна Бертани (или която и да е подходяща среда), допълнена с подходящ антибиотик, при 37°C и при аерация. Когато културата достигне късната логаритмична фаза на растеж, се добавя IPTG до крайна концентрация от 20 мкМ (за индуциране на експресия на променен пнеумолизин ген) и инкубацията продължава още 2-3 ч.

След това клетките се събират чрез центрофугиране или ултрафилтрация и се лизират чрез въздействие с ЕДТА и лизозим, последвано от хомогенизиране с ултразвук или чрез разрушаване под налягане. Клетъчните остатъци се отстраняват чрез центрофугиране и екстрактът се диализира екстензивно срещу 10 mM натриев фосфат /рН 7,0/. Материалът след това се зарежда на колона с ДЕАЕ-целулоза и се елуира при линейен градиент от 10-250 mM натриев фосфат /рН 7,0/. Фракциите, съдържащи пиковите чива от пнеумолизините деривати, се събират, концентрират чрез ултрафилтрация и се нанасят на колона със Сефакрил-S-200. Колоната се промива с 50 mM натриев фосфат /рН 7,0/ и отново фракциите с високо ниво на пнеумолизини деривати се събират, концентрират се чрез ултрафилтрация и се запазват в 50%-глицерол при -15°C. Крайният продукт е с чистота, по-висока от 95%, след като се подложи на SDS-полиакриламид-гел електрофореза. Хидрофобната хроматография върху Фенил-Сефароза е алтернативно пречистване, което също може да се използва. Но това не е единственият метод за пречистване на рекомбинантния пнеумолизин и могат да се използват и други алтернативни методи (включително високо ефек-

тивна течна хроматография).

Така пречистеният рекомбинантен пнеумолизин може да се въведе като ваксина в подходящо количество самостоятелно или в комбинация с други антигени. В една от формите пнеумолизинът може да бъде конюгиран с полизахарид, получен по който и да вариант от щамовете *S.pneumoniae*, описани по-горе.

Мутантният пнеумолизин може да се конюгира с полизахариди от различни серотипове по различни методи. Първият включва получаване на активиран полизахарид чрез третиране на чистия полизахарид (достъпен на пазара) с бромциан и адипиндихидразид (ADH). След това ADH-полизахаридът се комбинира с мутантния пнеумолизин в присъствието на 1-етил-3-/3-диметиламинопропил/ карбодимид -HCl. Конюгираният материал след това се отделя от реагентите чрез хроматография върху Сефароза CL-4B.

Алтернативно мутантните полизахарид-пнеумолизинови конюгати могат да се получат, като се използват бифункционални реагенти, напр. N-сукцинимидил-6/4'-азидо-2'-нитрофениламино/хексаноат /SANPAH/. Чистият полизахарид, разтворен в солеви фосфатен буфер, реагира със SANPAH в присъствието на източник на силна бяла светлина. Нереагиралият SANPAH след това се отделя от активирания полизахарид чрез хроматография върху Сефадекс G-50. Активираният полизахарид конюгира с мутантния пнеумолизин в 0,2M боратен буфер /pH 8,5/. Всяка излишна реактивна група след това се блокира с лизин и полизахаридният протекнов конюгат се отделя от другите реагенти чрез хроматография върху Сефароза GL-4B. Конюгатите могат да бъдат получени също и чрез редуктивно аминиране с цианоборохидрат.

Друг един протектив, напр. инактивиран тета-

нусов токсин, може да бъде конюгиран с желатин полизахариди и промененият (рекомбинантният) пнеумолизин да се добави към ваксината в неконюгирана форма.

Този вариант дава най-добрия метод за изпълнение на изобретението без да се ограничава единствено до този метод.

Патентни претенции

1. Метод за получаване на рекомбинантен пнеумолизин, характеризиращ се с това, че генът на *Streptococcus pneumoniae*, кодиращ пнеумолизин, се подлага на олигонуклеотид-насочена мутагенеза и се експресира в прокариотен или еукариотен гостоприемник чрез клониране в подходящ експресионен вектор.

2. Метод за получаване на рекомбинантен пнеумолизин съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че олигонуклеотид-насочената мутагенеза се осъществява чрез едно или повече замествания на аминокиселини в рамките на нативния пнеумолизин.

3. Метод за получаване на рекомбинантен пнеумолизин съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че експресионният вектор включва устойчиви на ампицилин и тетрациклин гени, *trc* промотор и *lac* (рибозомно свързване) сайт, съседен на ATG инициращ кодон, включващ *NcoI* рестрикционен сайт.

4. Метод за получаване на рекомбинантен пнеумолизин съгласно претенции 1 и 3, характеризиращ се с това, че експресионният вектор е носител на ген за пнеумолизин, имащ следната аминокиселинна последователност:

	Met	Ala	Asn	Lys	Ala	Val	Asn	Asp	Phe	Ile	Leu	Ala	Met
	1										11		
	Asn	Tyr	Asp	Lys	Lys	Lys	Leu	Leu	Thr	His	Gln	Gly	Glu
							21						
5	Ser	Ile	Glu	Asn	Arg	Phe	Ile	Lys	Glu	Gly	Asn	Gln	Leu
				31									
	Pro	Asp	Glu	Phe	Val	Val	Ile	Glu	Arg	Lys	Lys	Arg	Ser
	41										51		
	Leu	Ser	Thr	Asn	Thr	Ser	Asp	Ile	Ser	Val	Thr	Ala	Thr
10									61				
	Asn	Asp	Ser	Arg	Leu	Tyr	Pro	Gly	Ala	Leu	Leu	Val	Val
						71							
	Asp	Glu	Thr	Leu	Leu	Glu	Asn	Asn	Pro	Thr	Leu	Leu	Ala
		81											91
15	Val	Asp	Arg	Ala	Pro	Met	Thr	Tyr	Ser	Ile	Asp	Leu	Pro
										101			
	Gly	Leu	Ala	Ser	Ser	Asp	Ser	Phe	Leu	Gln	Val	Glu	Asp
							111						
20	Pro	Ser	Asn	Ser	Ser	Val	Arg	Gly	Ala	Val	Asn	Asp	Leu
			121										
	Leu	Ala	Lys	Trp	His	Gln	Asp	Tyr	Gly	Gln	Val	Asn	Asn
	131										141		
	Val	Pro	Ala	Arg	Met	Gln	Tyr	Glu	Lys	Ile	Thr	Ala	His
								151					
25	Ser	Met	Glu	Gln	Leu	Lys	Val	Lys	Phe	Gly	Ser	Asp	Phe
					161								
	Glu	Lys	Thr	Gly	Asn	Ser	Leu	Asp	Ile	Asp	Phe	Asn	Ser
	171										181		
30	Val	His	Ser	Gly	Glu	Lys	Gln	Ile	Gln	Ile	Val	Asn	Phe
									191				
	Lys	Gln	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Val	Ser	Val	Asp	Ala	Val	Lys
						201							
	Asn	Pro	Gly	Asp	Val	Phe	Gln	Asp	Thr	Val	Thr	Val	Glu
		211											221
35	Asp	Leu	Lys	Gln	Arg	Gly	Ile	Ser	Ala	Glu	Arg	Pro	Leu
										231			
	Val	Tyr	Ile	Ser	Ser	Val	Ala	Tyr	Gly	Arg	Gln	Val	Tyr
							241						
40	Leu	Lys	Leu	Glu	Thr	Thr	Ser	Lys	Ser	Asp	Glu	Val	Glu
				251									
	Ala	Ala	Phe	Glu	Ala	Leu	Ile	Lys	Gly	Val	Lys	Val	Ala
	261										271		
45	Pro	Gln	Thr	Glu	Trp	Lys	Gln	Ile	Leu	Asp	Asn	Thr	Glu
								281					
	Val	Lys	Ala	Val	Ile	Leu	Gly	Gly	Asp	Pro	Ser	Ser	Gly
				291									
	Ala	Arg	Val	Val	Thr	Gly	Lys	Val	Asp	Met	Val	Glu	Asp
	301										311		
50	Leu	Ile	Gln	Glu	Gly	Ser	Arg	Phe	Thr	Ala	Asp	His	Pro
									321				

	Gly	Leu	Pro	Ile	Ser	Tyr 331	Thr	Thr	Ser	Phe	Leu	Arg	Asp
	Asn	Val	Val 341	Ala	Thr	Phe	Gln	Asn	Ser	Thr	Asp	Tyr	Val 351
5	Glu	Thr	Lys	Val	Thr	Ala	Tyr	Arg	Asn	Gly 361	Asp	Leu	Leu
	Leu	Asp	R ₁	Ser	Gly	Ala	Tyr 371	Val	Ala	Gln	Tyr	Tyr	Ile
10	Thr	R ₂	Asp	Glu 381	Leu	Ser	R ₃	R ₄	His	Gln	Gly	Lys	Glu
	Val 391	Leu	Thr	Pro	Lys	Ala	R ₅	Asp	Arg	Asn	Gly 401	Gln	Asp
	Leu	Thr	Ala	His	Phe	Thr	Thr	Ser 411	Ile	Pro	Leu	Lys	Gly
15	Asn	Val	Arg	Asn	Leu 421	Ser	Val	Lys	Ile	Arg	Glu	R ₆	Thr
	Gly 431	Leu	Ala	R ₇	R ₈	R ₉	Trp	Arg	Thr	Val	Tyr	Glu 441	Lys
	Thr	Asp	Leu	Pro	Leu	Val	Arg	Lys	Arg 451	Thr	Ile	Ser	Ile
20	Trp	Gly	Thr	Thr	Leu	Tyr 461	Pro	Gln	Val	Glu	Asp	Lys	Val
	Glu	Asn	Asp 471										

в която R₁ е His или Arg, R₂ - Trp или Phe, R₃ - Tyr или Phe, R₄ - Asp или Asn, R₅ е Trp или Phe, R₆ - Cys, Gly, или Ser, R₇ - Trp или Phe, R₈ е Glu или Asp, R₉ е Trp или Phe и в която най-малко един от остатъците R₁, R₆, R₇, R₈ или R₉

е различен от този на дивия тип.

5. Приложение на рекомбинантния пнеумолизин съгласно претенция 1-4 за получаване на ваксина срещу *Streptococcus pneumoniae*.

AGATGGCAAA TAAAGCAGTA AATGACTTTA TACTAGCTAT GAATTACGAT
 AAAAAGAAAC TCTTGACCCA TCAGGGAGAA AGTATTGAAA ATCGTTTCAT
 CAAAGAGGGT AATCAGCTAC CCGATGAGTT TGTTGTTATC GAAAGAAAGA
 AGCGGAGCTT GTCGACAAAT ACAAGTGATA TTTCTGTAAAC AGCTACCAAC
 GACAGTCGCC TCTATCCTGG AGCACTTCTC GTAGTGGATG AGACCTTGTT
 AGAGAATAAT CCCACTCTTC TTGCGGTTGA TCGTGCTCCG ATGACTTATA
 GTATTGATTT GCCTGGTTTG GCAAGTAGCG ATAGCTTTCT CCAAGTGGAA
 GACCCCAGCA ATTCAAGTGT TCGCGGAGCG GTAAACGATT TGTTGGCTAA
 GTGGCATCAA GATTATGGTC AGGTCAATAA TGTCCCAGCT AGAATGCAGT
 ATGAAAAAAT AACGGCTCAC AGCATGGAAC AACTCAAGGT CAAGTTTGGT
 TCTGACTTTG AAAAGACAGG GAATTCTCTT GATATTGATT TTA ACTCTGT
 CCATTCAGGT GAAAAGCAGA TTCAGATTGT TAATTTTAAG CAGATTTATT
 ATACAGTCAG CGTAGACGCT GTTAAAAATC CAGGAGATGT GTTCAAGAT
 ACTGTAACGG TAGAGGATTT AAAACAGAGA GGAATTTCTG CAGAGCGTCC
 TTTGGTCTAT ATTTGAGTG TTGCTTATGG GCGCCAAGTC TATCTCAAGT
 TGGAACCAC GAGTAAGAGT GATGAAGTAG AGGCTGCTTT TGAAGCTTTG
 ATAAAAGGAG TCAAGGTAGC TCCTCAGACA GAGTGGAAGC AGATTTTGGA
 CAATACAGAA GTGAAGGCGG TTATTTTAGG GGGCGACCCA AGTTCGGGTG
 CCCGAGTTGT AACAGGCAAG GTGGATATGG TAGAGGACTT GATTCAAGAA
 GGCAGTCGCT TTACAGCAGA TCATCCAGGC TTGCCGATTT CCTATACAAC
 TTCTTTTTTA CGTGACAATG TAGTTGCGAC CTTTCAAAC AGTACAGACT
 ATGTTGAGAC TAAGGTTACA GCTTACAGAA ACGGAGATTT ACTGCTGGAT
 CATAGTGGTG CCTATGTTGC CCAATATTAT ATTACTTGGG ATGAATTATC
 STATGATCAT CAAGGTAAGG AAGTCTTGAC TCCTAAGGCT TGGGACAGAA
 ATGGGCAGGA TTTGACGGCT CACTTTACCA CTAGTATTCC TTAAAAGGG
 AATGTTGTA ATCTCTCTGT CAAAATTAGA GAGTGTACCG GGCTTGCCTG
 GGAATGGTGG CGTACGGTTT ATGAAAAAAC CGATTTGCCA CTAGTGCCTA
 AGCGGACGAT TTCTATTTGG GGAACAACCTC TCTATCCTCA GGTAGAGGAT
 AAGGTAGAAA ATGAC

CCATGGCAAA TAAAGCAGTA AATGACTTTA TACTAGCTAT GAATTACGAT
 AAAAAGAAAC TCTTGACCCA TCAGGGAGAA AGTATTGAAA ATCGTTTCAT
 CAAAGAGGGT AATCAGCTAC CCGATGAGTT TGTGTTATC GAAAGAAAGA
 AGCGGAGCTT GTCGACAAAT ACAAGTGATA TTTCTGTAAC AGCTACCAAC
 GACAGTCGCC TCTATCCTGG AGCACTTCTC GTAGTGGATG AGACCTTGTT
 AGAGAATAAT CCCACTCTTC TTGCGGTTGA TCGTGCTCCG ATGACTTATA
 GTATTGATTT GCCTGGTTTG GCAAGTAGCG ATAGCTTTCT CCAAGTGGAA
 GACCCAGCA ATTCAAGTGT TCGCGGAGCG GTAAACGATT TGTGGCTAA
 GTGGCATCAA GATTATGGTC AGGTCAATAA TGTCCCAGCT AGAATGCAGT
 ATGAAAAAAT AACGGCTCAC AGCATGGAAC AACTCAAGGT CAAGTTTGGT
 TCTGACTTTG AAAAGACAGG GAATTCTCTT GATATTGATT TTAAGTCTGT
 CCATTCAGGT GAAAAGCAGA TTCAGATTGT TAATTTAAG CAGATTTATT
 ATACAGTCAG CGTAGACGCT GTTAAAAATC CAGGAGATGT GTTCAAGAT
 ACTGTAACGG TAGAGGATTT AAAACAGAGA GGAATTTCTG CAGAGCGTCC
 TTTGGTCTAT ATTTGAGTG TTGCTTATGG GCGCCAAGTC TATCTCAAGT
 TGGAAACCAC GAGTAAGAGT GATGAAGTAG AGGCTGCTTT TGAAGCTTTG
 ATAAAAGGAG TCAAGGTAGC TCCTCAGACA GAGTGGAAGC AGATTTTGGG
 CAATACAGAA GTGAAGGCGG TTATTTTAGG GGGCGACCCA AGTTCGGGTG
 CCCGAGTTGT AACAGGCAAG GTGGATATGG TAGAGGACTT GATTCAAGAA
 GGCAGTCGCT TTACAGCAGA TCATCCAGGC TTGCCGATTT CCTATACAAC
 TTCTTTTTTA CGTGACAATG TAGTTGCGAC CTTTCAAAC AGTACAGACT
 ATGTTGAGAC TAAGGTTACA GCTTACAGAA ACGGAGATTT ACTGCTGGAT
 CATAGTGGTG CCTATGTTGC CCAATATTAT ATTACTTGGG ATGAATTATC
 CTATGATCAT CAAGGTAAGG AAGTCTTGAC TCCTAAGGCT TGGGACAGAA
 ATGGGCAGGA TTGACGGCT CACTTTACCA CTAGTATTCC TTTAAAAGGG
 AATGTTGTA ATCTCTCTGT CAAAATTAGA GAGTGTACCG GGCTTGCCTG
 GGAATGGTGG CGTACGGTTT ATGAAAAAAC CGATTTGCCA CTAGTGCCTA
 AGCGGACGAT TTCTATTTGG GGAACAATC TCTATCCTCA GGTAGAGGAT
 AAGGTAGAAA ATGAC

ДНК секвенция на модифицирания пнеумоли-
зинов ген.

Вмъкнат е NcoI рестрикционен сайт (подчер-
тан) при стартовия кодон.

Met Ala Asn Lys Ala Val Asn Asp Phe Ile Leu Ala Met
 1 11
 Asn Tyr Asp Lys Lys Lys Leu Leu Thr His Gln Gly Glu
 21
 Ser Ile Glu Asn Arg Phe Ile Lys Glu Gly Asn Gln Leu
 31
 Pro Asp Glu Phe Val Val Ile Glu Arg Lys Lys Arg Ser
 41 51
 Leu Ser Thr Asn Thr Ser Asp Ile Ser Val Thr Ala Thr
 61
 Asn Asp Ser Arg Leu Tyr Pro Gly Ala Leu Leu Val Val
 71
 Asp Glu Thr Leu Leu Glu Asn Asn Pro Thr Leu Leu Ala
 81 91
 Val Asp Arg Ala Pro Met Thr Tyr Ser Ile Asp Leu Pro
 101
 Gly Leu Ala Ser Ser Asp Ser Phe Leu Gln Val Glu Asp
 111
 Pro Ser Asn Ser Ser Val Arg Gly Ala Val Asn Asp Leu
 121
 Leu Ala Lys Trp His Gln Asp Tyr Gly Gln Val Asn Asn
 131 141
 Val Pro Ala Arg Met Gln Tyr Glu Lys Ile Thr Ala His
 151
 Ser Met Glu Gln Leu Lys Val Lys Phe Gly Ser Asp Phe
 161
 Glu Lys Thr Gly Asn Ser Leu Asp Ile Asp Phe Asn Ser
 171 181
 Val His Ser Gly Glu Lys Gln Ile Gln Ile Val Asn Phe
 191
 Lys Gln Ile Tyr Tyr Thr Val Ser Val Asp Ala Val Lys
 201
 Asn Pro Gly Asp Val Phe Gln Asp Thr Val Thr Val Glu
 211 221

Asp Leu Lys Gln Arg Gly Ile Ser Ala Glu Arg Pro Leu
231

Val Tyr Ile Ser Ser Val Ala Tyr Gly Arg Gln Val Tyr
241

Leu Lys Leu Glu Thr Thr Ser Lys Ser Asp Glu Val Glu
251

Ala Ala Phe Glu Ala Leu Ile Lys Gly Val Lys Val Ala
261 271

Pro Gln Thr Glu Trp Lys Gln Ile Leu Asp Asn Thr Glu
281

Val Lys Ala Val Ile Leu Gly Gly Asp Pro Ser Ser Gly
291

Ala Arg Val Val Thr Gly Lys Val Asp Met Val Glu Asp
301 311

Leu Ile Gln Glu Gly Ser Arg Phe Thr Ala Asp His Pro
321

Gly Leu Pro Ile Ser Tyr Thr Thr Ser Phe Leu Arg Asp
331

Asn Val Val Ala Thr Phe Gln Asn Ser Thr Asp Tyr Val
341 351

Glu Thr Lys Val Thr Ala Tyr Arg Asn Gly Asp Leu Leu
361

Leu Asp His Ser Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Tyr Ile
371

Thr Trp Asp Glu Leu Ser Tyr Asp His Gln Gly Lys Glu
381

Val Leu Thr Pro Lys Ala Trp Asp Arg Asn Gly Gln Asp
391 401

Leu Thr Ala His Phe Thr Thr Ser Ile Pro Leu Lys Gly
411

Asn Val Arg Asn Leu Ser Val Lys Ile Arg Glu Cys Thr
421

Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Thr Val Tyr Glu Lys
431 441

Thr Asp Leu Pro Leu Val Arg Lys Arg Thr Ile Ser Ile
451

Trp Gly Thr Thr Leu Tyr Pro Gln Val Glu Asp Lys Val
461

Glu Asn Asp
471

Met Ala Asn Lys Ala Val Asn Asp Phe Ile Leu Ala Met
1 11

Asn Tyr Asp Lys Lys Lys Leu Leu Thr His Gln Gly Glu
21

Ser Ile Glu Asn Arg Phe Ile Lys Glu Gly Asn Gln Leu
31

Pro Asp Glu Phe Val Val Ile Glu Arg Lys Lys Arg Ser
41 51

Leu Ser Thr Asn Thr Ser Asp Ile Ser Val Thr Ala Thr
61

Asn Asp Ser Arg Leu Tyr Pro Gly Ala Leu Leu Val Val
71

Asp Glu Thr Leu Leu Glu Asn Asn Pro Thr Leu Leu Ala
81 91

Val Asp Arg Ala Pro Met Thr Tyr Ser Ile Asp Leu Pro
101

Gly Leu Ala Ser Ser Asp Ser Phe Leu Gln Val Glu Asp
111

Pro Ser Asn Ser Ser Val Arg Gly Ala Val Asn Asp Leu
121

Leu Ala Lys Trp His Gln Asp Tyr Gly Gln Val Asn Asn
131 141

Val Pro Ala Arg Met Gln Tyr Glu Lys Ile Thr Ala His
151

Ser Met Glu Gln Leu Lys Val Lys Phe Gly Ser Asp Phe
161

Glu Lys Thr Gly Asn Ser Leu Asp Ile Asp Phe Asn Ser
171 181

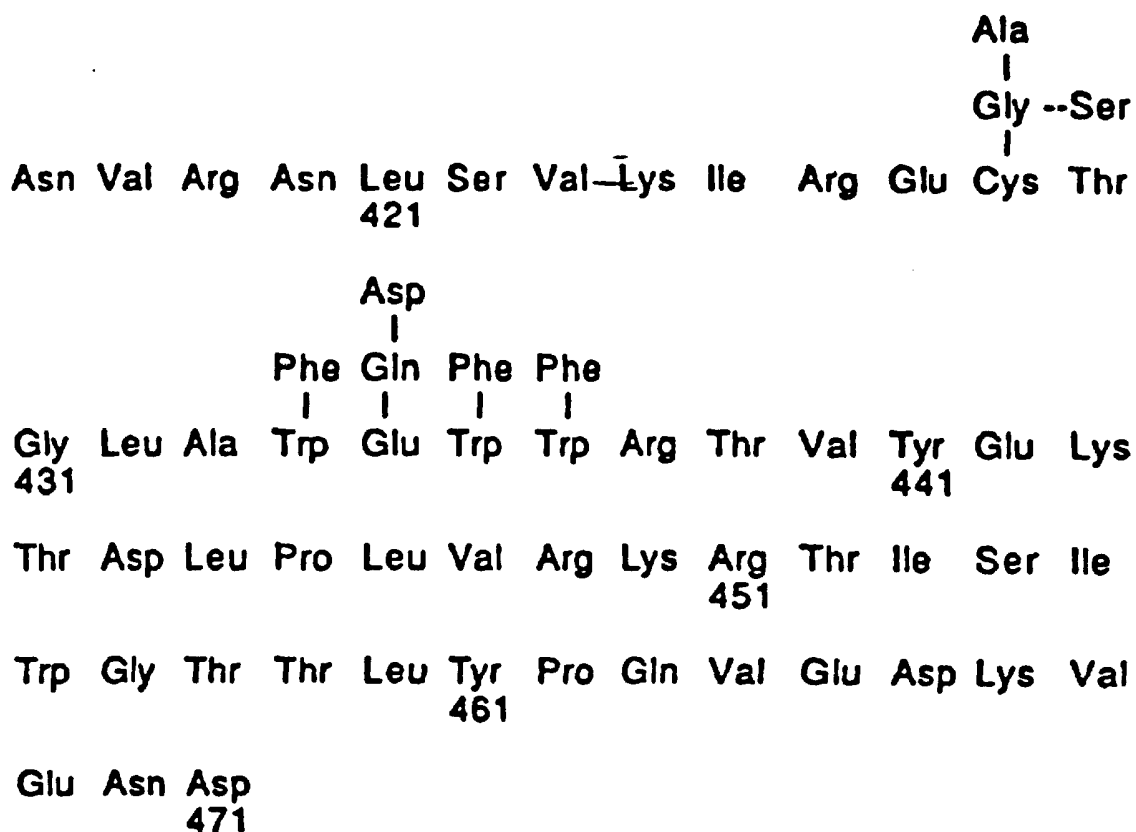
Val His Ser Gly Glu Lys Gln Ile Gln Ile Val Asn Phe
191

Lys Gln Ile Tyr Tyr Thr Val Ser Val Asp Ala Val Lys
201

Asn Pro Gly Asp Val Phe Gln Asp Thr Val Thr Val Glu
211 221

Asp Leu Lys Gln Arg Gly Ile Ser Ala Glu Arg Pro Leu
231

Val Tyr Ile Ser Ser Val Ala Tyr Gly Arg Gln Val Tyr
 241
 Leu Lys Leu Glu Thr Thr Ser Lys Ser Asp Glu Val Glu
 251
 Trp
 |
 Ala Ala Phe Glu Ala Leu Ile Lys Gly Val Lys Val Ala
 261 271
 Phe
 |
 Pro Gln Thr Glu Trp Lys Gln Ile Leu Asp Asn Thr Glu
 281
 Val Lys Ala Val Ile Leu Gly Gly Asp Pro Ser Ser Gly
 291
 Ala Arg Val Val Thr Gly Lys Val Asp Met Val Glu Asp
 301 311
 Leu Ile Gln Glu Gly Ser Arg Phe Thr Ala Asp His Pro
 321
 Gly Leu Pro Ile Ser Tyr Thr Thr Ser Phe Leu Arg Asp
 331
 Asn Val Val Ala Thr Phe Gln Asn Ser Thr Asp Tyr Val
 341 351
 Glu Thr Lys Val Thr Ala Tyr Arg Asn Gly Asp Leu Leu
 361
 Arg
 |
 Leu Asp His Ser Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Tyr Ile
 371
 Phe Phe Asn
 | |
 Thr Trp Asp Glu Leu Ser Tyr Asp His Gln Gly Lys Glu
 381
 Phe
 |
 Val Leu Thr Pro Lys Ala Trp Asp Arg Asn Gly Gln Asp
 391 401
 Leu Thr Ala His Phe Thr Thr Ser Ile Pro Leu Lys Gly
 411



Издание на Института за изобретения и рационализации
София - 1156, бул. "Г. М. Димитров" № 52-Б

Експерт: Д.Кацарова

Редактор: А.Семерджиева

Пор.№ 35629

Тираж:40 СР