

(19)



(10) **LT 4008 B**

(12)

## **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **4008**

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>: **C12N 9/20**  
**A01K 67/027**  
**C12N 15/00**

(21) Paraiškos numeris: **IP1886**

(22) Paraiškos padavimo data: **1994 02 28**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1994 09 25**

(45) Patent paskelbimo data: **1996 07 25**

(31, 32, 33) Prioritetas: **9300686, 1993 03 01, SE**  
**9300722, 1993 03 04, SE**

(72) Išradėjas:

**Lars Blaeckberg, SE**  
**Michael Edlund, SE**  
**Lennart Hansson, SE**  
**Olle Hernell, SE**  
**Lennart Lundberg, SE**  
**Mats Stroemqvist, SE**  
**Jan Toernell, SE**

(73) Patent savininkas:

**Astra AB, S-151 85 Soedertaelje, SE**

(74) Patentinis patikėtinis:

**Marius Jakulis-Jason, 3, A.A.A.Baltic Service Company,**  
**Rūdninkų g. 18/2-12, 2001 Vilnius, LT**

(83) Mikroorganizmo deponavimas:

**DSM 7101, DSM 7102, DSM 7103, DSM 7104, DSM 7495, DSM 7496, DSM**  
**7497, DSM 7501, DSM 7502, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen**  
**und Zellkulturen GmbH, DE**

(54) Pavadinimas:

**Nauji polipeptidai**

(57) Referatas:

Šis išradimas susijęs su naujais polipeptidais, kurie yra tulžies druska stimuliuojamos lipazės (BSSL; 3.1.1.1.). Jis taip pat susijęs su DNR molekulėmis, koduojančiomis minėtus polipeptidus, ir su subproduktais, turinčiais minėtas DNR molekules. Be to, šis išradimas yra apie minėtų BSSL variantų ir transgeninių žinduolių (ne žmonių), galinčių gaminti BSSL variantus, gavimo būdus.

## **LT 4008 B**

Toliau, išradimas susijęs su tokiais transgeniniais gyvūnais, o taipogi su mišiniu kūdikiui, kuriame esama tokių transgeninių gyvūnų pieno. Išradimas yra ir apie farmacines kompozicijas, kurių sudėtyje esama minėtų polipeptidų; bei apie minėtų polipeptidų ir DNR molekulių panaudojimą vaistų gamyboje.

Šis išradimas skirtas naujiems polipeptidams, kurie yra tulžies druskos stimuliuojamos lipazės (BSSL; EC 3.1.1.1) variantai. Jis taip pat susijęs su DNR molekulėmis, koduojančiomis minėtuosius polipeptidus, ir su subproduktais, turinčiais minėtąsias DNR molekules. Šis išradimas dar skirtas minėtųjų BSSL variantų ir transgeninių nežmogiškos kilmės žinduolių, galinčių ekspresuoti šiuos BSSL variantus, sukūrimo būdams. Be to, išradimas susijęs su tokiais transgeniniais gyvūnais, o taip pat su kūdikiams skirtais preparatais, turinčiais tokių transgeninių gyvūnų pieno. Šis išradimas taip pat susijęs su farmacinėmis kompozicijomis, turinčiomis minėtųjų polipeptidų, ir su šių polipeptidų ir DNR molekulių panaudojimu vaistų gamyboje.

Dietiniai lipidai tai svarbus energijos šaltinis. Daugiau kaip 95% šių lipidų sudaro turtingi energija triacilgliceroliai. Kai kurie iš lipidų, pvz., kai kurios riebiosios rūgštys ir riebaluose tirpstantys vitaminai, yra pagrindinės dietos sudedamosios dalys. Prieš triacilglicerolių ir mažesniąją dalį sudarančių komponentų, t.y. esterizuotų riebaluose tirpstančių vitaminų ir cholesterolio bei diacilfosfatidilglicerolių, įsiurbimą skrandyje ir žarnyne būtina hidrolizuoti esterinę ryšį, kad gautųsi mažiau hidrofobinis, absorbuojamas produktas. Šias reakcijas katalizuoja specifinė fermentų, vadinamų lipazėmis, grupė. Žmogaus atveju, manoma, kad pagrindinės lipazės yra skrandžio lipazė, kasos lipazė, priklausanti nuo kolipazės (tri- ir diacilglicerolių hidrolizė), kasos fosfolipazė A2 (diacilfosfatidilglicerolių hidrolizė) ir karboksilinių esterų hidrolazė (CEH) (cholesterolio ir riebaluose tirpstančių vitaminų esterų, bet taip pat tri-, di- ir monoacilglicerolių hidrolizė). Kai naujagimiai maitinami krūtimi, tulžies druskos stimuliuojamai lipazei (BSSL) tenka pagrindinis vaidmuo hidrolizuojant keletą iš aukščiau minėtų lipidų. Produktai, gauti lipidų virškinimo metu, kartu su tulžies druskomis sudaro miceles arba vienasluoksnes vezikules (Hernell, O., Staggers, J.E. and Carey, M.C. (1990): *Biochemistry* 29, 2041-2056), iš kurių vykdomas įsiurbimas.

Kai kurių rūšių, pvz., žmonių, gorilų, kačių ir šunų, pienas turi tulžies druskos stimuliuojamą lipazę (BSSL) (Hernell, O., Bläckberg, L., and Lindberg, T. in: *Textbook of gastroenterology and nutrition in infancy* (Lebenthal, E. ed) pp. 209-217 (Raven Press, New York 1989; Hamosh, M., Freed, L.M., York, C.M., Sturman, J.A., and Hamosh, P. (1986): *Fed. Proc.* 45, 1452). Kai BSSL plonosios žarnos viršutinėje dalyje sumaišoma su tulžimi, ji specifiskai aktyvuojama pirminėmis tulžies druskomis (Hernell, O. (1975): *Eur. J. Clin. Invest.* 5, 267-272). BSSL, sudaranti apie 1% visų pieno baltymų (Bläckberg, L. & Hernell, O. (1981): *Eur. J. Biochem* 116, 221-225), nedegraduoja keliaudama su pienu per skrandį ir dvylikapirštės žarnos turinyje tulžies druskos neleidžia ją inaktyvuoti kasos proteazėms, tokioms kaip tripsinas ir chimotripsinas.

Žmogaus pieno terminis apdorojimas (pasterizacija prie 62,5°C, 30 min), visiškai inaktyvuojantis BSSL (Björkstén, B., Burman, L.G., deChateau, P., Fredrikzon, B., Gothefors, L. & Hernell, O. (1980): *Br. Med. J.* 201, 276-272), sumažina neišnešiotų kūdikių riebalų įsiurbimo koeficientą apytiksliai 1/3 (Williamson, S., Finucane, E., Ellis, H.,

and Gamsu, H.R. (1978): Arch. Dis. Childhood 53, 555-563; Atkinson, S.A., Bryan, M.H., and Andersson, G.H. (1981): J. Pediatr. 99, 617-624). Taigi, dėl BSSL, geriau vartoti šviežio žmogaus pieno triacilglicerolį, negu kūdikiams skirtus mišinius, turinčius panašią riebalų sudėtį (Hernell, O. and Bläckberg, L. in: Encyclopedia of human biology (Dulbecco, R.ed.) Vol. 3, pp. 47-56 (Academic Press, San Diego 1991); Chappell, J.E., Clandinin, M.T., Kearney-Volpe, C., Reichman, B., and Swyer, P.W. (1986): J. Pediatr. 108, 439-447).

BSSL tai nespecifinė lipazė (EC 3.1.1.1), kadangi ji hidrolizuoja ne tik triacilglicerolį, bet ir monoacilglicerolį, cholesterolio esterius ir riebaluose tirpstančių vitaminų esterius (Bläckberg, L. and Hernell, O. (1983): FEBS Lett. 157, 337-341). Todėl aktyvuota BSSL potencialiai pati gali hidrolizuoti daugumą žmogaus pieno lipidų, nors veiksmingausiai žmogaus pieno triacilglicerolis panaudojamas sinergetiškai veikiant skrandžio lipazei (EC 3.1.1.3), nuo kolipazės priklausomai kasos lipazei (EC 3.1.1.3) ir BSSL (Bernbäck, S., Bläckberg, L., and Hernell, O. (1980): J. Clin. Invest. 85, 1221-1226).

Paskutiniai tyrimai padėjo suvokti, kad pieno fermentai ypatingai svarbūs naujagimiams panaudojant polinesočias riebiąsias rūgštis, turinčias ilgas grandines (Hernell ir kt., 1993). Šios riebiosios rūgštys yra reikšmingi eikosanoidų pirmtakai ir yra svarbios nervų sistemos vystymuisi. Naujagimiai, ypač neišnešioti, turi ribotas galimybes sintetinti šias riebiąsias rūgštis iš jų pirmtakų. Taigi jos yra itin svarbios tam tikru, dar tiksliai neapibrėžtu laikotarpiu po gimimo.

Neseniai kelių laboratorijų darbuose buvo apibūdintos tiek pieno lipazės tiek ir kasos karboksilinio esterio hidrolazės (CEH) (EC 3.1.1.1) cDNR struktūros (Baba, T., Downs, D., Jackson, K.W., Tang, J. and Wang, C.S. (1991): Biochemistry 30, 500-510; Hui, D. and Kissel, J.A. (1990): Febs Lett. 276, 131-134; Nilsson, J., Bläckberg, L., Carlsson, P., Enerbäck, S., Hernell, O. and Bjursell, G. (1990): Eur J. Biochem. 192, 543-550; Reue, K., Zambaux, J., Wong, H., Lee, G., Leete, T.H., Ronk, M., Shively, J.E., Sternby, B., Borgström, B., Ameis, D. and Schotz, M.C. (1991): J. Lipid. Res. 32, 267-276), bei padaryta išvada, jog šie pieno ir kasos fermentai yra to pačio geno produktai. cDNR seka ir išvesta BSSL/CEH geno aminorūgščių seka (SEQ ID NO: 1) taip pat pateiktos dokumentuose WO 91/15234 (Oklahomos medicininio tyrimų fondas) ir WO 91/18923 (Aktiebolaget Astra).

BSSL tai viengrandinis glikoproteinas. Išvestas baltymas susideda (SEQ ID NO:3) iš 722 aminorūgščių liekanų ir yra gausiai glikozilintas (Abouakil, N., Rogalska, E., and Lombardo, D. (1989): Biochim. Biophys. Acta 1002, 225-230). Baltymo N-galo dalis yra itin homologiška acetilcholinesterazei ir kai kurioms kitoms esterazėms (Nilsson ir kt., 1990).

Bandomoji aktyviojo centro serino liekana sutampa su serinu-194; seka aplink šį seriną atitinka serino hidrolazių suderinamąją aktyviojo centro seką. Vienintelė bandomoji N-glikozilinimo vieta yra už septynių liekanų į N-galo pusę nuo aktyviojo centro serino (Nilsson ir kt., 1990). BSSL sekos C-galo dalyje 16 kartų pasikartoja 11-os aminorūgščių

liekanų ilgio fragmentai, turintys daug prolino. Pasikartojimų skaičiaus kitimas, atrodo, gali didžiąja dalimi paaiškinti molekulių dydžio ir aminorūgščių sudėties skirtumus tarp fermentų, išskirtų iš skirtingų rūšių (Han, J.H., Stratowa, C., and Rutter, W.J. (1987): *Biochemistry* 26, 1617-1625; Fontaine, R., Carter, C., and Hui, D. (1991): *Biochemistry* 30, 7008-1014; Kyger, E.M., Wiegand, R.C., and Lange, L.G. (1989): *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 1302-1309). Šie pasikartojimai neša didžiąją dalį iš 15-20% baltymo angliavandenių (Baba ir kt., 1991, Abouakil ir kt., 1989).

Vienintelis struktūrinis skirtumas tarp BSSL ir tipiškos esterazės slypi polipeptido C-galo dalyje, t.y. šešiolikoje pasikartojančių sekų, turinčių po 11-a aminorūgščių liekanų ir daug prolino. Atitinkamas kasos fermentas iš karvės ir žiurkės turi tik 3 ir 4 pasikartojimus, atitinkamai (Han ir kt., 1987; Kyger ir kt., 1989). Tai greičiausiai patvirtina hipotezę, kad C-galo dalis ar bent jos dalis nedaro įtakos lipazės veiklumui, t.y. jos poveikiui į ilgos grandinės triacilglicerolį, esantį emulsinėje būsenoje.

Paprastai lipidų įsiurbimo ir drauge mitybos sutrikimus sukelia kasos nuo kolipazės priklausomos lipazės ir/arba tulžies druskų kiekio sumažėjimas virškinimo trakte. Tipiškais tokio lipazės nepakankamumo pavyzdžiais yra ligoniai, sergantys pūslės fibroze, įprastiniu genetiniu sutrikimu, sukeliančiu nepakankamumą visam gyvenimui 80% pacientų, ir lėtinis pankreatitas, dažnai sukeliamas lėtinio alkoholizmo.

Šiuo metu gydant ligonius, sergančius kasos lipazės nepakankamumu, skiriamos vartoti orališkai labai didelės dozės neapdoroto kiaulės kasos fermentų preparato. Tačiau nuo kolipazės priklausanti kasos lipazė inaktyvuojasi dėl vyraujančio skrandyje žemo pH. Šio reiškinio negalima pilnai pašalinti naudojant didžiules fermentų dozes. Todėl skiriamos labai didelės dozės netinka daugumai ligonių, ir, be to, preparatai yra negryni ir nemalonaus skonio. Buvo paruoštos tam tikros tabletės, praeinančios skrandžio rūgštinės sritis ir išskiriančios fermentą tik santykinai šarminėje plonosios žarnos aplinkoje. Tačiau daugelio ligonių, turinčių kasos sutrikimų, plonosios žarnos nenormaliai rūgštinės, ir tokiais atvejais tabletės gali neišleisti fermento.

Be to, kadangi šiuo metu rinkoje parduodami preparatai gauti ne iš žmogaus, kyla tam tikras pavojus sukelti imunines reakcijas, iššaukiančias ligoniams žalingas pasekmes arba sumažinančias gydymo veiksmingumą. Kitas šiuo metu esančių preparatų trūkumas yra tai, kad nepranešama ar jie turi kitą lipolitinį aktyvumą, nesusijusį su nuo kolipazės priklausančia lipaze. Iš tikrųjų daugumas jų pasižymi labai žemo lygio BSSL/CEH aktyvumu. Tai gali būti viena iš priežasčių, dėl kurių daugumas ligonių, sergančių pūslės fibroze, nepaisant papildomo gydymo kenčia riebaluose tirpstančių vitaminų ir svarbių riebiųjų rūgščių nepakankamumą.

Todėl labai svarbu gauti produktus, pasižyminčius žmogaus lipazės savybėmis ir struktūra, bei plačiu substratinų specifiškumu, kuriuos galima būtų skirti orališkai vartoti ligoniams, sergantiems vienos ar kelių kasos lipolitinų fermentų trūkumu. Produktai, kuriuos galima gauti panaudojant šį išradimą, patenkina šį poreikį patys arba drauge su preparatais, turinčiais kitas lipazes.

Rekombinantiniai BSSL variantai, pagal išradimą, išlaiko katalitinį aktyvumą, bet turi mažiau glikozilinimo vietų negu pilno ilgio BSSL, ir todėl pagaminami su potencialiai mažesniu angliavandenių nevienalytiškumu. Šis sudėtingumo sumažinimas palengvina rekombinantinių baltymų išgryninimą ir apibūdinimą, todėl turėtų sumažėti polipeptidų, turinčių BSSL aktyvumą, gamybos kaina.

Kita vertus, dėl sumažinto glikozilinimo lygio keliama mažesni reikalavimai recipientui ir, panaudojant kelias ląsteles-šeimininkes, gaunama didesnė išeiga. Be to, sumažintas glikozilinimo vietų skaičius leidžia BSSL variantų gamybą panaudojant žemesnius eukariotus ir apriboja galimą nenormalaus glikozilinimo, galinčio sukelti imuninę reakciją, riziką. Sumažinto lygio ir paprastesnis glikozilinimas taip pat reiškia, kad šiuo atveju recipientų ratas yra platesnis negu baltymų, turinčių labai sudėtingas ir sunkias angliavandenių dalis, atveju.

Akivaizdu, kad panaudojant mažesnio dydžio, bet vienodo aktyvumo BSSL variantus terapiniams tikslams, sumažėja priedų medžiagos kiekis. Kitas galimas BSSL varianto, neturinčio daugumos ar visų O-glikozilintų pasikartojimų, pranašumas susijęs su šeimininkų imuninio atsako rizikos sumažėjimu. Tai įvyksta dėl to, kad O-prijungtieji cukrūs gali būti labai nevienalyčiai priklausomai nuo ląstelės, kurioje jie gaminami.

Mokslinėje literatūroje yra pranešimų, jog natyvią BSSL suriša ir įsiurbia žarnyno gleivinė. Atrinkti BSSL variantai su mažesniu įsiurbimu ilgiau bus veiklus dietinių lipidų atžvilgiu, tuo pagerindami virškinimą žarnyne. Molekulės su sumažintu glikozilinimo lygiu yra vienas iš tokių variantų pavyzdžių.

Kaip paminėta aukščiau, buvo iškelta prielaida, kad BSSL ypač svarbus įsisavinant ilgų grandinių polinesočias riebiąsias rūgštis (Hernell, O., Bläckberg, L., Chen, Q., Sternby, B. and Nilson, Å. (1993): J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. (in press), kurios labai svarbios naujagimių nervų sistemos vystymuisi ir vitaminui A. Gautasis pagal šį išradimą BSSL variantas, kuris yra labiau efektyvus šiais požiūriais, gali būti pasirinktas žinomais metodais. Nutrauktas ar sutrumpintas fermentas tur būt skirsis konformacijos požiūriu, dėl to gali pasikeisti jo specifiškumas skirtingiems lipidiniams substratams.

Išradimas iš vienos pusės susijęs su nukleino rūgšties molekule, koduojančia polipeptidą, kuris yra BSSL variantas, trumpesnis negu 722 aminorūgštys, ir minėtasis BSSL variantas turi aminorūgščių sekos dalį, parodytą sekoje SEQ ID NO: 3 kaip liekanos 536-722.

Čia vartojamas terminas „aminorūgščių sekos dalis“ reiškia vieną atskirą aminorūgštį, o taip pat seką iš kelių aminorūgščių ar derinį iš kelių tokių sekų.

Terminas „BSSL variantas“, reiškia polipeptidą, pasižymintį BSSL aktyvumu ir turintį žmogaus BSSL aminorūgščių sekos, pažymėtos Sekų Apraše kaip seka SEQ ID NO: 3, dalį.

Terminas „polipeptidas, pasižymintis BSSL aktyvumu“, reiškia polipeptidą, turintį bent dalį šių savybių:

- (a) tinkamas oraliniui vartojimui;
- (b) aktyvuojamas specifinėmis tulžies druskomis;
- (c) plonųjų žarnų turinyje veikiantis kaip nespecifinė lipazė, t.y. galintis hidrolizuoti lipidus santykinai nepriklausomai nuo jų cheminės sandaros ir fizinės būklės (emulsinės, dalelių pavidalo, ištirpusios);

ir nebūtinai turintis vieną ar daugiau iš šių savybių:

- (d) galintis hidrolizuoti triacilglicerolius, turinčius įvairaus grandinių ilgio ir skirtingo nesotumo laipsnio riebiąsias rūgštis;
- (e) galintis taip pat hidrolizuoti diacilglicerolį, monoacilglicerolį, cholesterolio esterius, lizofosfatidilacilglicerolį ir retinilą bei kitus riebaluose tirpstančių vitaminų esterius;
- (f) galintis hidrolizuoti triacilgliceroliuose ne tik sn-1(3) esterinius ryšius, bet ir sn-2 esterinį ryšį;
- (g) galintis sąveikauti ne tik su pirminėmis, bet ir su antrinėmis tulžies druskomis;
- (h) optimalus aktyvumas priklauso nuo tulžies druskų;
- (i) stabilus ta prasme, kad skrandžio turinys nepaveiks jo katalitinio aktyvumo kokiu nors žymiu laipsniu;
- (j) atsparus kasos proteazėms, pvz., tripsinui, jei yra tulžies druskų;
- (k) galintis surišti hepariną ir heparino darinius, pvz., heparino sulfatą;
- (l) galintis prisirišti prie lipidų ir vandens fazių skiriamosios ribos;
- (m) pakankamai stabilus, kad būtų galima liofilizuoti;
- (n) stabilus, kai sumaišomas su maisto sudedamosiomis dalimis, tokiomis kaip žmogaus pienas arba pieno mišiniai.

Kitais požiūriais išradimas susijęs su nukleino rūgšties molekule, atitinkančia aukščiau pateiktą aprašymą, kai minėtasis BSSL variantas turi fenilalanino liekaną C-galo pozicijoje arba turi savo C-galo dalyje seką Gln-Met-Pro, arba savo C-galo dalyje turi aminorūgščių seką, parodytą sekoje SEQ ID NO: 3 kaip 712-722 liekanos.

Šiame kontekste, terminas „C-galo pozicija“ pažymi paskutinės C-galo liekanos poziciją, o terminas „C-galo dalis“ pažymi apytiksliai 50 aminorūgščių liekanų, sudarančių BSSL varianto C-galo pabaigą.

Toliau išradimas susijęs su nukleino rūgšties molekule, atitinkančia aukščiau pateiktą aprašymą, kai minėtasis BSSL variantas turi mažiau nei 16 pasikartojimo vienetų. Šiame kontekste terminas „pasikartojimo vienetas“ pažymi vieną iš 33 nukleotidų ilgio pasikartojimo vienetų, pateiktų Sekų Apraše esančioje sekoje SEQ ID NO: 1.

Kitais požiūriais išradimas susijęs su nukleino rūgšties molekule, atitinkančia aukščiau pateiktą aprašymą, koduojančia polipeptidą, kurio aminorūgščių seka turi bent 90% homologiją su aminorūgščių seka, parodyta Sekų Apraše kaip sekos SEQ ID NO: 5, 6 arba 9, o taip pat su nukleino rūgšties molekule, koduojančia polipeptidą, kurio aminorūgščių seka turi bent 90% homologiją su aminorūgščių seka, parodyta Sekų Apraše kaip seka SEQ ID NO: 7, išskyrus tas nukleino rūgščių molekules, kurios koduoja polipeptidus, turinčius asparagino liekaną 187 pozicijoje.

Išradimas taip pat skirtas polipeptidams, parodytiems Sekų Apraše kaip sekos SEQ ID NO: 5, 6, 7 arba 9, o taip pat polipeptidams, kuriuos koduoja nukleino rūgšties seka, atitinkanti aukščiau pateiktą aprašymą.

Be to, išradimas yra apie hibridinį geną, turintį nukleino rūgšties molekulę, atitinkančią aukščiau pateiktą aprašymą, apie galintį replikuotis ekspresijos vektorių, turintį tokį hibridinį geną, ir ląstelę, priimančią tokį hibridinį geną. Tokia ląstelė gali būti prokariotinė ląstelė, vienaląstis eukariotinis organizmas arba ląstelė, kilusi iš daugialąsčio organizmo, pvz., žinduolio.

Šiame kontekste terminas „hibridinis genas“ reiškia nukleino rūgšties seką, turinčią iš vienos pusės nukleino rūgšties seką, koduojančią BSSL variantą, kaip apibrėžta aukščiau, ir iš kitos pusės geno, sąlygojančio hibridinio geno produkto ekspresiją, nukleino rūgšties seką. Terminas „genas“ reiškia visą geną, o taip pat jo sekos dalį, sąlygojančią ir nukreipiančią hibridinio geno ekspresiją norimame audinyje. Paprastai minėta sekos dalis apima bent jau vieną ar kelias promotorines sritis, transkripcijos startinį saitą, 3' ir 5' nekoduojančias sritis ir struktūrines sekas.

Geriau kai hibridinis genas konstruojamas in vitro įterpiant BSSL variantą koduojančią nukleino rūgšties seką į geną, galintį sąlygoti ekspresiją, panaudojant žinomas šios srities metodikas. Iš kitos pusės BSSL variantą koduojanti nukleino rūgšties seka gali būti įterpiama in vitro pasinaudojant homologine rekombinacija.

Šiame kontekste terminas „galintis replikuotis“ reiškia, kad vektorius gali replikuotis duotojo tipo ląstelėje-šeimininkėje, į kurią jis buvo įvestas. Tiesiogiai prieš nukleino rūgšties seką, koduojančią BSSL variantą, galima įstatyti seką, koduojančią signalinį peptidą, kurio buvimas užtikrina BSSL varianto, ekspresuoto ląstelėje-šeimininkėje, priėmusioje vektorių, sekreciją. Signalinė seka gali būti natūraliai susieta su nukleino rūgšties seka arba gali būti kitos kilmės.

Kaip vektorių galima panaudoti bet kurį nešiklį, su kuriuo patogų atlikti DNR rekombinacijos procedūras, ir jo pasirinkimą dažnai nulemia ląstelė-šeimininkė, į kurią vektorius turi būti įvedamas. Todėl vektorius gali būti autonomiškai besireplikuojantis, t.y. galintis egzistuoti kaip nechromosominis objektas, kurio replikacija nepriklauso nuo chromosomos replikacijos; tokių vektorių pavyzdžiais gali būti plazmidė, fagas, kosmidė, mini-chromosoma arba virusai. Iš kitos pusės gali būti vektorius, kuris, po to kai įvedamas į ląstelę-šeimininkę, integruojasi į ląstelės-šeimininkės genomą ir replikuoja kartu su

chromosoma (chromosomomis), į kurią jis buvo integruotas. Tinkamų vektorių pavyzdžiais gali būti bakterijų ekspresijos vektorius ir mielių ekspresijos vektorius. Šio išradimo vektorius gali pernešti bet kurias iš aukščiau apibrėžtų išradimo nukleino rūgščių sekų.

Iš kitos pusės išradimas susijęs su rekombinantinių polipeptidų gamybos procesu, kuris susideda iš: (i) nukleino rūgšties molekulės, atitinkančios aukščiau pateiktą aprašymą, įterpimo į hibridinį geną, galintį replikuotis tam tikrose recipientinėse ląstelėse ar organizmuose; (ii) gauto rekombinantinio hibridinio geno įvedimo į recipientinę ląstelę ar organizmą; (iii) gautos ląstelės auginimo kultivavimo terpėje ar ant jos arba organizmo, kuriame ekspresuojamas polipeptidas, identifikavimo ir padauginimo ir (iv) polipeptido išgavimo.

Ląstelių auginimui galima panaudoti bet kurią įprastą terpę, tinkančią šiam reikalui. Tinkamu vektoriumi gali būti bet kuris iš aukščiau aprašytų vektorių, o atitinkama ląstelė-šeimininke gali būti bet kuri ląstelė iš aukščiau aprašytų tipų. Konstruojant vektorius ir efektyviai jį įvedant į ląstelę-šeimininkę galima panaudoti bet kurį žinomą DNR rekombinacijos srityje šioms tikslams skirtą būdą. Priklausomai nuo ląstelės tipo ir vektoriaus sudėties, ekspresuotas ląstelėje rekombinantinis žmogaus BSSL variantas gali būti sekretuojamas, t.y. pernešamas pro ląstelės membraną.

Jei BSSL variantas lieka rekombinantinių recipientinių ląstelių viduje, tai yra ląstelė jo nesekretuoja, tai jis gali būti išgaunamas standartinėmis procedūromis, tame tarpe ląstelė gali būti suardoma mechaniškai, pvz., ultragarsu ar homogenizatoriuje, arba fermentais ar chemikalais, po to gryninama.

Kad būtų sekretuojama, prieš DNR seką, koduojančią BSSL variantą, reikia įstatyti seką, koduojančią signalinį peptidą, kuris užtikrina BSSL varianto išskyrimą iš ląstelės taip, kad bent jau didžioji pagaminto BSSL varianto dalis yra išskiriama į auginimo terpę ir išgaunama.

Išradimas taip pat yra apie ekspresijos sistemą, turinčią hibridinį geną, kuris gali ekspresuotis ląstelėje- ar organizme-šeimininke, priimančiame minėtąjį hibridinį geną, todėl rekombinantinis polipeptidas gaminamas, kai ekspresuojasi hibridinis genas, kuris sukonstruotas įterpiant nukleino rūgšties seką, atitinkančią aukščiau pateiktą aprašymą, į geną, sugebantį tarpininkauti ekspresuojant minėtąjį hibridinį geną.

Vienas iš galimų šio išradimo rekombinantinio BSSL varianto gamybos būdų tai panaudojimas transgeninių nežmogiškos kilmės žinduolių, galinčių išskirti BSSL variantą į savo pieną. Transgeninių nežmogiškos kilmės žinduolių panaudojimas pranašus tuo, kad didelis rekombinantinio BSSL varianto kiekis gaunamas už priimtina kainą ir tuo, kad, ypač kai nežmogiškos kilmės žinduoliu yra karvė, rekombinantinis BSSL variantas gaunamas piene, kuris yra normali sudedamoji dalis, pvz., kūdikių mitybos mišinių, todėl nereikia ekstensyvaus gryninimo, kai rekombinantinis BSSL variantas yra naudojamas kaip maistingas priedas produktuose, pagamintuose pieno pagrindu.

Be to, kai gaminama aukštesniuose organizmuose, tokiuose kaip nežmogiškos kilmės žinduoliai, tai atliekamas taisyklingas žinduolių baltymo molekulės apdorojimas, pvz., procesingas po transliacijos ir teisingas suklostymas. Taip pat galima gauti didelius kiekius beveik gryno BSSL varianto.

Tuo būdu ekspresijos sistema, besiremianti aukščiau pateiktu aprašymu, gali būti žinduolių ekspresijos sistema, turinti DNR seką, kuri koduoja BSSL variantą, įterptą į geną, koduojantį nežmogiškos kilmės žinduolio pieno baltymą, tam, kad būtų suformuotas hibridinis genas, kuris gali ekspresuotis priėmusios minėtąją hibridinį geną žinduolių suaugusios patelės pieno liaukoje.

Manoma, kad pieno liauka, kaip ekspresijos audinys, ir genai, koduojantys pieno baltymus, ypač tinkami gaminti heterologiniams baltymams transgeniniuose nežmogiškos kilmės žinduoliuose, kadangi pieno baltymai žinduolių pieno liaukose natūraliai gaminami padidintais kiekiais. Taip pat pieną lengva surinkti ir galima gauti didelius jo kiekius. Ryšium su tuo, pieno baltymų genų panaudojimas rekombinantinio BSSL varianto gamyboje pranašus dar tuo, kad pastarasis gaminamas sąlygose, artimose natūralioms gamybos sąlygoms, ekspresijos reguliavimo ir gamybos vietos (pieno liaukose) požiūriu.

Naudojant transgeninius žinduolius, geriau kai aukščiau minėtas hibridinis genas turi seką, koduojančią signalinį peptidą, tam, kad hibridinio geno produktas būtų teisingai išskiriamas per pieno liauką. Paprastai signaliniu peptidu galėtų būti aptariamo pieno baltymo geno signalinis peptidą arba signalinis peptidas susijęs su DNR seka, koduojančia BSSL variantą. Tačiau ir kitos signalinės sekos, sąlygojančios hibridinio geno produkto sekreciją per pieno liauką, taip pat tinka. Žinoma, atskiri hibridinio geno elementai turi būti taip sujungti, kad įvyktų teisinga geno produkto ekspresija ir procesingas. Todėl normaliai DNR seka, koduojanti pasirinktą signalinį peptidą, turi būti tiksliai prijungta prie DNR sekos, koduojančios BSSL variantą, N-galo dalies. DNR seka, koduojanti BSSL variantą, paprastai turi savąjį terminacijos kodoną, bet ne savo pranešimo nutraukimą ir poliadenilavimo saitą. Po DNR sekos, koduojančios BSSL variantą, paprastai paliekamos iRNR procesingo sekos, priklausančios pieno baltymo genui.

Nustatyta, kad už tam tikro hibridinio geno tikrąją ekspresijos lygį atsako keletas faktorių. Labai svarbūs ekspresijos lygiui gali būti promotoriaus bei kitų reguliuojančių sekų ypatumai, kaip minėta aukščiau, žinduolio genomo vieta, į kurią integruojama ekspresijos sistema, pieno baltymą koduojančio geno vieta, į kurią įstatoma DNR seka, koduojanti BSSL variantą, elementai, sąlygojantys post-transkripcinę reguliaciją, ir kiti panašūs faktoriai. Pasiremdamas žiniomis apie įvairių faktorių įtaką hibridinio geno ekspresijos lygiui, žmogus, patyręs šioje srityje, turėtų žinoti kaip sukonstruoti ekspresijos sistemą, naudingą iškeltam tikslui.

Vartoti skirtas pieno baltymo genas gali būti išgautas iš tos pačios rūšies, į kurią bus įterpta ekspresijos sistema, arba jis gali būti kilęs iš kitos rūšies. Ryšium su paskutiniu atveju, buvo parodyta, kad valdymo elementai, nukreipiantys geno ekspresiją į pieno liauką, neturi rūšinių apribojimų, kas gali būti įmanoma dėl bendrų protėvių

(Hennighausen, L., Riuz, L. & Wall, R. (1990): Current Opinion in Biotechnology 1, 74-78).

Tarp paprastai įvairių žinduolių pieno išrūgose randamų baltymų yra tokių, kurie pateikia pavyzdžius tinkamų genų, koduojančių pieno baltymą ar jo veikliąją subseką ir kuriuos galima panaudoti konstruojant ekspresijos sistemą, pagal išradimą, pvz., išrūgų rūgščiojo baltymo (WAP) genas, geriau kai jis išgautas iš pelių, ir  $\beta$ -laktoglobulino genas, geriau kai jis išgautas iš avies. Kazeino genai, gauti iš įvairių šaltinių, taip pat gali būti panaudoti gaminant BSSL variantus transgeniniu būdu, pvz., avies  $\alpha$ S1-kazeinas ir triušio  $\beta$ -kazeinas. Šiuo metu tinkamiausias yra pelių WAP genas, kadangi nustatyta, kad jis įvairių transgeninių gyvūnų piene gali suteikti aukštą ekspresijos lygį keletui svetimų žmogaus baltymų (Hennighausen ir kt., 1990).

Kita seka, susieta su išradimo ekspresijos sistema, yra taip vadinama ekspresiją stabilizuojanti seka, kurios pagalba gaunamas aukštas ekspresijos lygis. Yra rimtų nuorodų, kad tokia stabilizuojanti seka yra netoli pieno baltymo genų pradžios.

Į išradimą taip pat įtrauktas nežmogiškos kilmės transgeninių žinduolių, galinčių ekspresuoti BSSL variantą, gavimo būdas, susidedantis iš (a) aukščiau aprašytos ekspresijos sistemos įterpimo į nežmogiškos kilmės žinduolio apvaisintą kiaušinėlį ar embriono ląstelę ir (b) gauto apvaisinto kiaušinėlio ar embriono, introdukuoto į suaugusią nežmogiškos kilmės žinduolio patelę, išauginimo.

Ekspresijos sistemą galima įterpti į žinduolių gemalinę liniją panaudojant bet kurią tinkančią metodiką, pvz., kaip aprašyta „Manipulating the Mouse Embryo“ (Manipuliavimas su pelės embrionu); Laboratorinis vadovas, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986. Pavyzdžiui, keletą šimtų ekspresijos sistemos molekulių galima tiesiogiai įšvirkšti į apvaisintą kiaušinėlį, pvz., į apvaisintą vienos ląstelės kiaušinėlį arba jo pro-branduolį, arba pasirinkto žinduolio gemalą ir vėliau po mikroįšvirkštimo kiaušinėliai perkeliama į pseudopastojusių įmočių kiaušintakius bei leidžiama jiems vystytis.

Nežmogiškos kilmės transgeninių žinduolių, galinčių ekspresuoti BSSL variantą, gavimo būdas gali taip pat pasinaudoti atveju, kuomet minėtasis žinduolis iš esmės nesugeba ekspresuoti savo paties BSSL. Toks būdas susideda iš (a) žinduolio sugebėjimų ekspresuoti BSSL panaikinimo taip, kad žinduolio BSSL iš esmės neekspresuojama, ir aukščiau minėtos ekspresijos sistemos įstatymo į žinduolio gemalinę liniją taip, kad BSSL variantas yra ekspresuojamas tame žinduolyje; ir/arba (b) žinduolio BSSL geno ar jo dalies pakeitimo aukščiau aprašytąją ekspresijos sistema.

Žinduolio BSSL ekspresijos sugebėjimus patogų panaikinti sukeliant mutacijas DNR sekoje, atsakingoje už BSSL ekspresiją. Tai gali būti mutacijos, paslenkančios DNR sekos nuskaitymo rėmelį, terminacijos kodono įvedimas arba vieno ar daugiau nukleotidų išmetimas iš DNR sekos.

Žinduolių BSSL genas ar jo dalis gali būti pakeista aukščiau apibrėžta ekspresijos sistema arba DNR seka, koduojančia BSSL variantą, panaudojant gerai žinomus homologinės rekombinacijos principus.

Kitas svarbus aspektas, susijęs su išradimu, tai aukščiau aprašytos DNR sekos įterpimas į transgeninių nežmogiškos kilmės žinduolių genomą. Geriau kai minėtoji DNR seka jau yra žinduolio gemalinėje linijoje ir žinduolio pieno baltymo gene. Geriau, kai nežmogiškos kilmės transgeninį žinduolį galima išrinkti iš grupės, kurią sudaro pelės, žiurkės, triušiai, avys, kiaulės ir raguočiai.

Į išradimą taip pat įtraukti aukščiau apibrėžtų transgeninių nežmogiškos kilmės žinduolių palikuonys bei pienas, gautas iš tokių transgeninių nežmogiškos kilmės žinduolių.

Toliau išradimas susijęs su mišiniais kūdikių mitybai, turinčiais aukščiau apibrėžto pieno, ir kūdikių mitybos mišiniais, turinčiais aukščiau apibrėžtą BSSL variantą. Kūdikių mišiniai gali būti ruošiami panaudojant tradicinius būdus ir turėti bet kokius būtinus priedus, tokius kaip mineralus, vitaminus ir kt.

Kitu aspektu išradimas susijęs su vaistinėmis sudėtimis, turinčiomis aukščiau apibrėžtą BSSL variantą, bei su tokio BSSL varianto panaudojimu gydymui.

Dar kitu aspektu išradimas susijęs su aukščiau apibrėžtu BSSL variantu, kai jis panaudojamas gaminti vaistus, skirtus gydyti patologines būsenas susijusias su egzokrininiu kasos nepakankamumu; pūslės fibrozė; lėtiniu pankreatitu; riebalų įsiurbimo sutrikimais; riebaluose tirpstančių vitaminų įsiurbimo sutrikimais; riebalų įsiurbimo sutrikimais dėl fiziologinių priežasčių. Išradimas taip pat siejasi su BSSL varianto panaudojimu gaminti vaistus, pagerinančius dietinių riebalų įsisavinimą, ypač neišnešiotiems kūdikiams.

## PAVYZDŽIAI

### 1. REKOMBINANTINIO BSSL EKSPRESIJA EUKARIOTU IR PROKARIOTU LASTELĖSE

#### 1.1. EKSPERIMENTINĖ DALIS

##### 1.1.1. Rekombinantinės plazmidės

pS146 plazmidė, turinti 2,3 kb žmogaus BSSL cDNR (Nilsson ir kt., 1990), kuri buvo klonuota su pUC19, skaidoma Hind III ir Sal I. BSSL cDNR įterpta į jaučio papildomos viruso (BPV) ekspresijos vektorių pS147 (Fig. 1). Šis vektorius turi žmogaus BSSL cDNR, kurią kontroliuoja pelių metalotioneino 1 (mMT-1) enhanceris ir promotoriaus elementas (Pavlakis, G.N., and Haemer, D.H. (1983): Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 397-401). iRNR procesingo signalai paimti iš triušio  $\beta$ -globino geno fragmento, apimančio dalį egzono II, introną II, egzoną III ir toliau einančius elementus. Šis transkripcinis vienetas klonuotas su vektoriumi, turinčiu visą BPV genomą. BPV ir BSSL transkripcinis vienetas transkribuojami ta pačia kryptimi. Kad vektorius galėtų daugintis *E. coli* viduje, jis taip pat

turi pML2d, pBR322 darinį (Sarver, N., Byrne, J.C., and Howell, P.M. (1982): Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7147-7151).

Ekspresijos vektorius pS147 transfekuotas kartu su vektoriumi, koduojančiu atsparumo neomicinui geną, kurį reguliuoja Harvey sarkomos viruso 5'-galo ilgojo pasikartojimo ir beždžionių viruso su 40 poliadenilinimo singalai (Lusky, M., and Botchan, M.R. (1984): Cell 36, 391-401).

Tam, kad *E. coli* ekspresuotų BSSL, BSSL cDNR subklonuotas kaip NdeI-BamHI fragmentas iš pT7-7 plazmidės (Ausubel, F.M., Brent R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (eds) in: Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, New York; edition of 1992) į pGEMEX-1 plazmidę (promega, Madison, WI, JAV) (Studier, F.W. and Moffat, B.A.(1986): J.Mol. Biol. 189, 113-130). Šioje klonavimo procedūroje T7 geno 10 koduojanti seka pakeičiama BSSL genu, koduojančiu subrendusį baltymą, ir startiniu kodonu. Galutinis ekspresijos vektorius, pGEMEX/BSSL, patikrintas nustatant DNR seką, panaudojant specifinius BSSL vidinius pradmenis.

### **1.1.2. Mutagenezė**

Numeris 1 suteiktas nukleotidui A iš iniciacijos kodono ATG. Numeruojant aminorūgštis, pirmajam signalinio peptido metioninui suteiktas -23 numeris, o pirmajai subrendusio baltymo aminorūgšties liekanai, alaninui, suteiktas numeris 1.

Kuriant variantą A su delecija (SEQ ID NO: 4), susintezuoti du PCR pradmenys, PCR-1 ir PCR-2 (1 lentelė). *HindIII*, *Sall* ir *BamHI* saitai sukurti tam, kad būtų galima klonuoti su skirtingomis plazmidėmis. *BclI* saitas BSSL sekoje sukurtas be aminorūgščių pakeitimų. Tai buvo padaryta tam, kad palengvėtų sintezuotų DNR prijungimas, norint gauti kitus variantus. Pradmuo PCR-2 turi du sintetinius terminacijos kodonus. Gauti PCR fragmentai buvo suskaidyti *BamHI* ir *HindIII* bei klonuoti pUC18, kad būtų galima nustatyti seką. Ši plazmidė pažymėta pS157. Tikslus PCR fragmentas įterptas į BPV ekspresijos vektorių, prijungiant prie BSSL sekos vieninteliame Asp700 saite (1405 vieta BSSL cDNR) ir *Sall* saite prieš  $\beta$ -globino geno fragmentą, taip gaunant pS257.

B varianto (SEQ ID NO: 5) konstravimas atliktas panaudojant oligonukleotidus, pažymėtus numeriais 3, 4, 7 ir 8 (1 lentelė). Renatūruoti oligonukleotidai koduoja kraštinę C-galo aminorūgščių seką, atitinkančią fragmentą nuo lizino 712 iki fenilalanino 722 pilno ilgio baltyme. Šis fragmentas prijungtas prie gliutamino 535. Transliacijos terminacijos seka įterpta po paskutinio fenilalanino. Šis fragmentas turi *BclI* saitą 5'-gale ir *Sall* saitą 3'-gale, todėl jį galima įterpti į pS157. Gautoji plazmidė suskaldyta Asp700 ir *Sall* ir gauta 313 bp fragmentas įterptas į ekspresijos vektorių, kaip aprašyta aukščiau. Gauta plazmidė buvo pažymėta pS258.

## 1 LENTELĖ.

Sintetiniai oligonukleotidai, panaudoti konstruojant BSSL variantus. Restrikcijos saitų nukleotidai pabraukti. Transliacijos terminacijos signalai pažymėti storesniu šriftu. Varianto N pakeistas kodonas pažymėtas PCR-3 storesniu šriftu ir žvaigždute.

| Oligonukleotidas | Seka (5' - 3')                                                                                 |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PCR-1            | CGGGATCCGAAGCCCTTCGCCACCCCCACG                                                                 |
| PCR-2            | CGAAGCTTGTCGACTTACTACTGATCAGTCACTGTGGGCAGCGC<br>CAG                                            |
| PCR-3            | GGGAATTCTGGCCATTGCTTGGGTGAAGAGGAATATCGCGGCC<br>TTCGGGGGGGACCCCAACCAGATCACGCTCTTCGGGGAGTCT<br>* |
| PCR-4            | CGGGATCCCACATAGTGCAGCATGGGGTACTCCAGGCC                                                         |
| 1                | GATCAGGGGGGCCCCCCCCGTGCCGCCACGGGTGACTCCGGG                                                     |
| 2                | CCCCCCCCCGTGCCGCCACGGGTGACTCCAAGGAAGCTCAGA                                                     |
| 3                | TGCCTGCAGTCATTAGGTTTTAGTAAGTCGACA                                                              |
| 4                | AGCTTGTCGACTTACTAAAACCTAATGACTG                                                                |
| 5                | CAGGCATCTGAGCTTCCTTGGAGTCACCCGTGGGCGGCACGGG<br>GGGGGCCCCGGA                                    |
| 6                | GTCACCCGTGGGCGGCACGGGGGGGGCCCCCT                                                               |
| 7                | GATCAGAAGGAAGCTCAGA                                                                            |
| 8                | CAGGCATCTGAGCTTCCTTCT                                                                          |

Konstruojant geną, koduojantį C variantą (SEQ ID NO: 6), panaudoti oligonukleotidai, pažymėti numeriu nuo 1 iki 6 (1 lentelė). Renatūruotas DNR fragmentas turi du pasikartojimus, koduojančius vienuolika aminorūgščių, sutampančius su derintoju (Nilsson ir kt., 1990), įterptu tarp gliutamino 535 ir lizino 712 iki fenilalanino 722 sekos. Šis fragmentas taip pat turi *BclI* saitą 5'-gale ir *SalI* saitą 3'-gale, todėl galima laikytis tos pačios klonavimo strategijos.

Konstruojant variantą N (variantą be N-glikozilinio, SEQ ID NO: 7), sintezuoti du PCR pradmenys (PCR-3 ir PCR-4 1 lentelėje). Kad būtų galima nustatyti seką, sukurti *EcoRI* ir *BamHI* saitai klonuojant 360 bp PCR produktą su pUC19. Potencialus N-pririštasis glikozilinio situs, asparaginas 187 pakeistas gliutaminu. Modifikuota seka atskirta kaip *BalI*-*HindIII* fragmentas ir klonuota su *SacI* ir *HindIII* pagalba suskaidyta pUC19 kartu su *SacI* ir *BalI* fragmentu, turinčiu mMT-1 promotorių ir BSSL cDNR 5'-galą. Apie 1,2 kb ilgio *SacI*-*DraIII* fragmentas išskirtas iš šios plazmidės ir įterptas į

ekspresijos vektoriaus mMT-1 elementą bei BSSL cDNR seką atitinkamai. Gauta plazmidė pažymėta pS299.

#### **1.1.3. Žinduolių ląstelių kultūra ir transfekcijos**

Vektoriai buvo drauge transfekuoti į pelių ląstelių liniją C127 (ATCC CRL 1616), pagal kalcio fosfato precipitacijos būdą (Graham, F.L. and Van der Eb, A.J. (1973): Virology 52, 456-467).

C127 ląstelės augintos Ham'o F12-Dulbecco modifikuotoje Eagle'o terpėje (DMEM), (1:1) papildytoje 10% embrioninio veršiuko serumu. Neomicinui atsparių ląstelių klonai atrinkti panaudojant  $1,5 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$  G418 ir po 10-15 dienų išaugę atsparių ląstelių klonai išskirti iš pagrindinių lėkštelių ir padauginti tyrimams.

#### **1.1.4. Bakterijų kamienai ir auginimo salygos**

Atliekant ekspresijos bandymus, vektorius pGEMEX/BSSL transformacijos būdu perneštas į *E. coli* JM109(DE3) ir BL21(DE3)pLysS kamienus. Ekspresijos bandymai atlikti pagal Studier ir kt. (1986) aprašymą. Surinkus bakterijų derlių, ląstelės nusodintos centrifūguojant ( $5000 \times g$ , 10 min prie  $4^{\circ}\text{C}$ ). Ruošiant periplazmos ir citoplazmos frakcijas, centrifūgavimo nuosėdos pakartotinai suspenduotos panaudojant 4 ml 20 mM Tris-Cl/20% sacharozės, pH 8,0, 200  $\mu\text{l}$  0,1 M EDTA ir 40  $\mu\text{l}$  lizocimo (15 mg/ml vandenyje) kiekvienam centrifūgavimo nuosėdų gramui. Suspensija laikyta 40 minučių ant ledo. Pridėta po 160  $\mu\text{l}$  0,5 M  $\text{MgCl}_2$  kiekvienam centrifūgavimo nuosėdų gramui, po to suspensija centrifūguota 20 minučių prie  $12000 \times g$ . Gautas supernatante buvo periplazmos proteinai, o centrifūgavimo nuosėdose - citoplazmos frakcija. Ruošiant tirpiuosius baltymus, ląstelės suspenduotos 40 mM Tris-Cl, 0,1 mM EDTA, 0,5 mM fenilmetilsulfonilfluoride, pH 8,2, ir lizuojant keletą kartų šaldomos ir atšildomos bei paveikiamos ultragarsu. Ląstelių lizatas centrifūguotas ( $30000 \times g$ , 30 min prie  $25^{\circ}\text{C}$ ).

#### **1.1.5. Nukleino rūgšties analizė**

RNR ir DNR išskiriamos iš žinduolių ląstelių atskirtų linijų arba *E.coli* ląstelių (Ausubel ir kt., 1992). RNR ir DNR frakcionuojamos agarozės gelyje ir atliekamas blotingas su GeneScreen Plus (New England Nuclear) bei hibridinama pagal tiekėjo instrukcijas.

#### **1.1.6. Natyvių fermentų paruošimas**

Tulžies druskos stimuliuojama lipazė išskirta iš moters pieno, kaip aprašyta anksčiau (Bläckberg & Hernell, 1981). Kaip parodė SDS-PAGE analizė, išvalytas preparatas buvo homogeninis ir pasižymėjo  $100 \mu\text{mol}$  riebiųjų rūgščių išskyrimo  $\times \text{min}^{-1}$  ir  $\text{mg}^{-1}$  lyginamuoju aktyvumu, tiriant su ilgų grandinių triacilglicerolio substratu.

#### **1.1.7. Fermentų bandinys**

Fermentų bandinys atliktas pagal aprašymą (Bläckberg & Hernell, 1981), naudojant kaip substratą trioleiną emulsijoje su gumiarabiku. Inkubuota su 10 mM natrio cholatu kaip aktyvuojančia tulžies druska. Tiriant priklausomybę nuo tulžies druskų (natrio cholato

ir natrio dezoksicholato, Sigma Chem. Co.), pridedamų druskų koncentracijos atitiko nurodytas Fig 3.

#### **1.1.8. Vestern blotingas**

Blotingo bandymuose norint sustiprinti reakciją, kondicionuota terpė koncentruota chromatografiškai ant mėlynosios sefarozės (Pharmacia LKB Biotechnology). Atitinkama terpė sumaišyta su mėlynąja sefaroze (Apie 10 ml terpės kiekvienam gelio ml). Gelis perplautas (10 ml kiekvienam gelio ml) su 0,5 M Tris-Cl buferiu, turinčiu 0,1 M KCl, pH 7,4. Fermentų aktyvumas išplautas 1,5 M KCl tame pačiame buferyje. Naudojant šį būdą gautos 25-30 kartų didesnės koncentracijos, o taip pat 3-5 kartus didesnis grynumas. SDS-PAGE atlikta 10% poliakrilamido gelyje, iš esmės pagal Laemmli (U.K. (1970): Nature (London) 227, 680-685). Po perkėlimo ant nitroceliuliozės membranų ir inkubacijos su polikloniniu triušių BSSL- antiserumu, panaudotas ožkos anti-triušinis IgG, konjuguotas su šarmine fosfataze, ir kiti reagentai iš Bio-Rad.

#### **1.1.9. Poveikis N-glikozidaze F**

Prie 10  $\mu$ l varianto B, turinčio 2,5  $\mu$ mol riebiųjų rūgščių išskyrimo  $\times \text{min}^{-1}$  BSSL aktyvumą, pridėta 1  $\mu$ l 1M  $\beta$ -merkaptioetanolio ir 0,5  $\mu$ l 10% (svoris/tūris) SDS. Pavirinus 5 minutes, pridėta 10  $\mu$ l 0,1 M natrio fosfato buferio, pH 8,0, 6  $\mu$ l 0,1 M EDTA, 4  $\mu$ l 7,5% (svoris/tūris) Nonidet P40 ir 5  $\mu$ l (1U) N-glikozidazės F (Boehringer Mannheim). Kontrolei, tas pats varianto B kiekis paveiktas tuo pačiu būdu tik be glikozidazės. Po inkubacijos per naktį prie 37 °C, atlikta pavyzdžių SDS-PAGE analizė ir blotingas, panaudojant polikloninį triušio BSSL- antiserumą.

### **1.2. REZULTATAI**

#### **1.2.1. BSSL variantų konstravimas (kūrimas)**

BSSL variantų modifikacijos palyginti su pilno ilgio BSSL susumuotos 2 lentelėje ir Fig 1. Būdai, panaudoti kuriant šiuos variantus, aprašyti 1.1. skyriuje. Variante A (SEQ ID NO: 4) terminacijos kodonas įvestas po gliutamino, esančio 535 pozicijoje, tuo būdu iš pilno ilgio baltymo pašalintos paskutinės 187 aminorūgštys. Variante B (SEQ ID NO: 5) dalis, koduojanti 11 paskutiniųjų C-galo aminorūgščių, ir originali transliacijos pabaiga prijungti prie gliutamino 535. Taigi šis variantas neturi visų pasikartojimų. Variante C (SEQ ID NO: 6) fragmentas, kuriame yra du pasikartojimai, turintys seką, sutampančią su derintoju (Nilsson ir kt., 1990), įterptas tarp gliutamino 535 ir sekos nuo lizino 712 iki fenilalanino 722.

Norint nustatyti bandomosios N-prijungtosios angliavandeninės struktūros, esančios arti aktyviojo centro serino 194, svarbą, sukonstruotas kitas variantas. Variantas N (SEQ ID NO: 7) gautas pakeičiant potencialų N-glikozilinio saitą, asparaginą 187, gliutaminu.

## 2 LENTELE

BSSL variantų aminorūgščių sekos palyginti su žmogaus BSSL.

| Variantai        | Pašalintos liekanos | Pakeistos liekanos |
|------------------|---------------------|--------------------|
| A (SEQ ID NO: 4) | 536-722             |                    |
| B (SEQ ID NO: 5) | 536-711             |                    |
| C (SEQ ID NO: 6) | 536-568, 591-711    |                    |
| N (SEQ ID NO: 7) |                     | Asn 187 → Gln      |

**1.2.2. Rekombinantinės DNR apibūdinimas žinduolių ląstelių linijose**

DNR pavyzdžiai paruošti iš ląstelių linijų, transfekuotų ekspresijos vektoriais, koduojančiais skirtingus BSSL variantus. Paruošta DNR skaidyta *Bam*HI, frakcionuota agarozės geliuose ir perkelta ant membranų hibridizacijai. Kaip zondas naudota <sup>32</sup>P-žymėta BSSL cDNR. Hibridizacijos rezultatai patvirtino, kad rekombinantiniai genai egzistuoja ir taip pat, kad vektoriaus kopijų skaičius buvo apytiksliai lygus skirtingose ląstelių linijose (Fig. 2). Hibridizuotų fragmentų išsidėstymas atspindėjo skirtingus įvairių BSSL sekų ilgius ir sutapo su lauktais ilgiais. Išsidėstymas, kuris taip pat buvo panašus į DNR, išskirtos iš naudotų transekcijos bandymų bakterijų, rodė kad ląstelių linijose neįvyko didelių vektoriaus DNR persitvarkymų (Fig. 2). Viršutiniai hibridizacijos signalai DNR pavyzdyje, atstovaujančiame variantą A, geičiausiai gauti dėl dalinio suskaidymo.

**1.2.3. Pilno ilgio ir mutantinio BSSL iRNR ekspresija žinduolių ląstelėse**

Rekombinantinių BSSL genų ekspresijos tyrimui RNR išskirta iš atskirų ląstelių linijų. Northern blotingo eksperimentai ir hibridizacija su <sup>32</sup>P-žymėtąja BSSL cDNR parodė, kad rekombinantinė iRNR aptinkama visose ląstelių linijose, priėmusiose BSSL vektorius (Fig. 3). Kontroliniuose pavyzdžiuose, paimtuose iš ląstelių linijų, turinčių tą patį vektorius, bet be BSSL cDNR, hibridizacija nebuvo aptikta (Fig. 3).

Skirtingi hibridizuotų iRNR ilgiai derinosi su cDNR modifikacijomis. Skirtingų pavyzdžių rekombinantinių BSSL iRNR variantų kiekių lygiai buvo praktiškai tie patys, išskyrus variantą A (Fig. 3). Priežastis, dėl kurios varianto A iRNR blogiau kaupiama, nežinoma, bet tai buvo aptikta dvejose ląstelių linijų populiacijose, o taip pat išskirtuose klonuose. Hibridizacija su pelių β-aktino zonu patvirtino, kad skirtinguose pavyzdžiuose buvo vienodas RNR kiekis (Fig. 3, apatinė panelė).

**1.2.4. Pilno ilgio BSSL ir BSSL variantų produkavimas žinduolių ląstelėse**

Surinkta terpė iš C127-ląstelių, transfekuotų pilno ilgio BSSL ir įvairiomis mutantinėmis formomis, atskirų klonų ir tirtas BSSL aktyvumas (Fig. 4). Klonuose su didžiausia ekspresija pilno ilgio molekulės ir variantų N, B ir C aktyvumai svyravo nuo 0,7 iki 2,3 μmol riebiųjų rūgščių išlaisvinimo x min<sup>-1</sup> x terpės ml<sup>-1</sup>. Tai atitiko 7-23 μg x terpės ml<sup>-1</sup> ekspresijos lygiams ir buvo artimas natyvaus pieno BSSL lyginamajam aktyvumui. Visi analizuoti klonai su variantu A pasižymėjo aktyvumu mažesniu už 0,05 μmol riebiųjų

rūgščių išlaisvinimo  $\times \text{min}^{-1} \times \text{terpės ml}^{-1}$ . Koncentravimas su mėlynąja sefaroze ir liofilizacija parodė, kad klonuose, pasižyminčiuose didžiausiu aktyvumu, aktyvus fermentas iš tikrųjų buvo ekspresuotas, nors labai žemu lygiu. Negalima atmesti galimybės, kad varianto A žemas aktyvumas iš dalies gali būti paaiškintas žymiai mažesniu specifiniu aktyvumu.

Klonų iš įvairių transfekcijos eksperimentų Western blotingo tyrimo duomenys parodyti . Fig. 5A. BSSL variantų  $M_r$  gauti kaip tikėtasi. Tačiau reikėtų pažymėti, kad pilno ilgio BSSL variantai, bei variantai B ir C davė dvigubas juostas. Kadangi visi trys turėjo intaktinį vienintelį N-glikozilinimo saitą tuo tarpu, kai variantas N, neparodęs dvigubos juostos, neturėjo šio saito, tai galimas paaiškinimas, jog tos dvigubos juostos kilusios dėl N-glikozilinimo skirtumų. Todėl variantas B buvo paveiktas N-glikozidaze F. Kaip parodyta Fig. 5B, iš viršutinės juostos liko tik pėdsakai, tuo tarpu apatinė juosta sustiprėjo, rodydama, kad tik dalis ekspresuoto varianto buvo N-glikozilinta.

Vienas būdingų BSSL bruožų yra specifinis aktyvavimasis esant pirminėms tulžies druskoms, pvz., chولاتui (Hernell, 1975). Aktyvuojant chولاتu, visos skirtingos rekombinantinės formos pasižymėjo ta pačia priklausomybe nuo koncentracijos (Fig. 6). Didžiausias aktyvumas naudotoje bandymų sistemoje buvo gautas prie apytiksliai 10 mM. Kai chولاتas buvo pakeistas dezoksichولاتu (antrine tulžies druska) stimuliacija nebuvo stebėta. Taigi pilno ilgio rekombinantas bei skirtingi variantai parodė tą patį specifiškumą aktyvavimo tulžies druskomis atžvilgiu.

#### **1.2.5. Pilno ilgio BSSL ekspresija ir biocheminis apibūdinimas *E.coli* ląstelėse**

Du *E.coli* kamienai, JM109(DE3) ir BL21(DE3)pLysS (Studier ir kt., 1986), transformuoti ekspresijos vektoriumi pGEMEX/BSSL, turinčiu žmogaus BSSL cDNR, kontroliuojamą T7 promotoriaus. Transformantai iš abiejų kamienų identifikuoti, auginti ir indukuoti paveikus IPTG apie 90 min (Studier ir kt., 1986). Visos iRNR Northern blotingo analizė, naudojant BSSL cDNR kaip 32P-žymėtąjį zondą, parodė, kad ekspresija buvo produktyviai indukuota abiejuose kamienuose ir kad transkripcija buvo griežtai valdoma (Fig. 7A). Matomas rekombinantinės BSSL dydis, apytiksliai 2,4 kb, derinasi su lauktu ilgiu. Baltymo pavyzdžių atskyrimas su SDS-PAGE ir imunodetekcija su anti-BSSL antikūnais parodė, kad *E.coli* efektyviai gamina pilno ilgio BSSL (Fig. 7B). BL21(DE3)pLysS kamienas išskyrė į periplazmą daugiau proteino negu JM109(DE3) (Fig. 7B).

Indukuotos su IPTG *E.coli* kultūros turėjo aktyvią tirpią BSSL, atitinkančią 0,5 - 4  $\mu\text{g}$  BSSL proteino/kultūros ml. Western blotingas parodė, kad 20-60% reaguojančios medžiagos buvo netirpiose centrifūgavimo nuosėdose. Neindukuotos bakterijos nerodė jokio žymaus BSSL aktyvumo.

Lipazės aktyvumas iš išaugintų bakterijų turėjo tą pačią priklausomybę nuo tulžies druskų kaip ir natyvi pieno BSSL.

## **2. REKOMBINANTINĖS PILNO ILGIO IR JOS MUTANTINIŲ FORMŲ TULŽIES DRUSKOS STIMULIUOJAMOS LIPAZĖS GRYNINIMAS IR APIBŪDINIMAS**

### **2.1 EKSPERIMENTINĖ DALIS**

#### **2.1.1. Fermentai ir fermentų variantai**

Rekombinantinė pilno ilgio BSSL ir BSSL variantai B, C ir N sukonstruoti ir ekspresuoti kaip aprašyta anksčiau. Lyginant su natyviu fermentu variantas B (SEQ ID NO: 5) neturėjo visų 16 unikalių, O-glikozilintų, turtingų prolinu C-galo pasikartojimų (536-711 aminorūgštys), o kraštinis C-galo fragmentas (712-722 aminorūgštys) buvo prijungtas prie gliutamino 535. Variantas C (SEQ ID NO: 6) turėjo tą patį C-galo fragmentą ir du pasikartojimus, 11 liekanų ilgio, tarp gliutamino 535 ir lizino 712. Variante N (variantas be N-glikozilinimo, SEQ ID NO: 7) asparaginas 187, atsakingas už vienintelį N-prijungtąjį cukrų, buvo pakeistas gliutamino liekana.

Natyvi BSSL išskirta iš moters pieno, kaip aprašyta (Bläckberg & Hernell, 1981).

#### **2.1.2. Fermentų išbandymas**

Lipazės aktyvumas išbandytas, kaip aprašyta (Bläckberg & Hernell, 1981), panaudojant kaip substratą trioleiną emulsijoje su gumiarabiku. Aktyvuojančia tulžies druska panaudotas natrio cholatas (10 mM). Skirtingos bandymų modifikacijos pateiktos brėžinių aprašymuose.

#### **2.1.3. Imunosorbento paruošimas**

Išgryninta pieno BSSL (3 mg) sujungta su sefaroze, panaudojant CNBr pagal gamintojų aprašą. 40 ml polikloninio antiserumo, gauto triušiuose prieš išgrynintą pieno BSSL, praleista pro kolonėlę. Specifiniai antikūnai išplauti 0,1 M glicinu-HCl, pH 2,5. pH privesta apytiksliai iki 8 naudojant kietą Tris. Po druskų pašalinimo ir liofilizacijos 6 mg afiniškai išvalytų antikūnų sujungta su sefaroze, kaip aprašyta aukščiau.

#### **2.1.4. Gryninimo būdas**

Kondicionuota auginimo terpė, turinti 5-25 µg rekombinantinės ekspresuotos BSSL ar BSSL varianto, sumaišyta su mėlynąja sefaroze (Pharmacia, Švedija), 10 ml terpės vienam gelio ml. Maišant 30 min gelis perplautas 0,05 M Tris-Cl, pH 7,0, 0,05 M KCl ir lipazės aktyvumas išplautas 0,05 M Tris-Cl, pH 7,0, 1,5 M KCl. Surinktas aktyvumo pikas ir dializuotas 5 mM natrio veronaliu, pH 7,4, 0,05 M NaCl. Dializatas praleistas pro heparino-Sefarozės kolonėlę. Kolonėlė išplauta NaCl gradientu nuo 0,05 iki 1,0 M, 5 mM natrio veronalio buferyje, pH 7,4. Frakcijos, pasižyminčios lipazės aktyvumu, surinktos ir panaudotos imunosorbentinėje kolonėlėje. Po plovimo su 0,05 M Tris-Cl, pH 7,0, 0,15 M NaCl lipazė išplauta 0,1 M glicino-HCl, pH 2,5. Frakcijų pH tuoj pat privestas apytiksliai iki 8 su kietu Tris.

### **2.1.5. Elektroforezė**

Natrio dodecilsulfato poliakrilamido gelio elektroforezė (SDS-PAGE) atlikta pagal Laemmli (1970). Baltymai dažyti Commassie Brilliant Blue.

### **2.1.6. N-galo sekos analizė**

Aminorūgščių sekos nustatymas atliktas panaudojant Applied Biosystems Inc. 477A impulsinį skystos fazės sekvenserių ir on-line feniltiohidantoino analizatorių 120A su reguliarių ciklų programomis bei reagentais, gautais iš gamintojų. Pradinis ir pakartotinis apskaičiavimai pagal žinomos sekos standartinį baltymą ( $\beta$ -lactoglobuliną), buvo 47% ir 97%, atitinkamai.

## **2.2. REZULTATAI**

### **2.2.1. Rekombinantinių BSSL ir BSSL variantų gryninimas**

Kondicionuotos terpės chromatografija ant mėlynosios sefarozės pirmiausia panaudota koncentravimui. Tolesnės chromatografijos ant heparino-sefarozės pagalba pradinis gryninimas pasiektas pašalinus daugumą albuminų, esančių auginimo terpėje. Tai parodė, kad rekombinantinės BSSL molekulės visos išlaiko susirišimą su heparinu. Po apdorojimo imunosorbentu, kaip parodė SDS-PAGE (Fig. 8), visi BSSL variantai pasižymėjo grynumu didesniu už 90%. Pilno ilgio fermentas bei variantai B ir C migravo kaip dupletai. Skirtingų variantų  $M_r$  parodyti 3 lentelėje. N-galo sekos nustatymas išaiškino vienintelę seką visiems variantams iš 8 ciklų: Ala-Lys-Leu-Gly-Ala-Val-Tyr-Thr-.

### **2.2.2. Lipazės aktyvumas**

Skirtingų preparatų molekulinė masė pateikta 3 lentelėje. Preparatų specifinis aktyvumas svyravo nuo 75 iki 120  $\mu\text{mol}$  laisvų riebiųjų rūgščių atskėlimo per vieną minutę vienam mg baltymo. Taigi neaptikta žymaus skirtumo tarp pilno ilgio BSSL ir BSSL variantų aktyvumo.

Kad preparatai veiktų ilgų grandinių triacilglicerolius emulsinėje būsenoje, visiems jiems būtina reikėjo pirminės tulžies druskos (natrio cholato) (Fig. 9A). Natrio dezoksicholatas nestimuliavo nei vieno varianto (duomenys neparodyti). Tačiau kartu su kitomis tulžies druskomis dezoksicholatas parodė du efektus (Fig. 9B ir C). Pirma, jis sumažindavo cholato koncentraciją, kurios reikėjo stimuliacijai, ir, antra, jis slopindavo fermento aktyvumą esant didesnėms tulžies druskos koncentracijoms.

## 3 LENTELĖ

Rekombinantinių pilno ilgio BSSL ir BSSL variantų  $M_r$

| Fermentas   | $M_r$ (kDa)<br>nustatytas pagal SDS-PAGE |
|-------------|------------------------------------------|
| Pilno ilgio | 105,107                                  |
| Variantas B | 63,65                                    |
| Variantas C | 60,62                                    |
| Variantas N | 95                                       |

### **2.2.3. Rekombinantinių BSSL ir BSSL variantų stabilumas**

Rekombinantinės BSSL bei BSSL variantai pasižymėjo tuo pačiu pH stabilumu kaip ir natyvus pieno BSSL (Fig. 10). Visais atvejais inaktyvacija pasiekta prie pH apie 2,5-3. Virš pH 3 visi variantai buvo stabilūs jei baltymo koncentracijos buvo pakankamai aukštos. Tai padaryta pridėjus jaučio serumo albumino arba ovalbumino (duomenys neparodyti). Atskiesti pavyzdžiai buvo mažiau stabilūs prie visų išbandytų pH, bet slenkstis išliko tas pats (duomenys neparodyti). Pav. 11 parodytas rekombinantinio fermento termostabilumas, palyginus su natyviu pieno fermentu. Prie 37-40°C temperatūros aktyvumas pradeda mažėti. Variantai (B, C, N) buvo mažiau stabilūs, negu pilno ilgio rekombinantinis fermentas ir pieno fermentas. Tačiau, jei baltymo koncentracija padidinama pridėdant jaučio serumo albumino, tai visi variantai būna atsparūs prie 40°C (Fig. 11).

Natyvi pieno BSSL ir visi rekombinantiniai variantai jautrūs tripsinui. Rasta inaktyvacijos priklausomybė nuo laiko (Fig. 12). Tačiau, jei į buferį pridėdama tulžies druskos, t.y. cholato, lipazės variantai apsaugomi ir aktyvumas išlaikomas (Fig. 12).

Taigi, daugelio in vitro požymių, t.y. tulžies druskų stimuliacijos, heparino surišimo, pH ir temperatūrinio stabilumo bei tulžies druskų apsaugos nuo proteazinės inaktyvacijos, atžvilgiu nebuvo aptikta žymių skirtumų tarp įvairių BSSL variantų ir natyvios pieno BSSL.

## **3. EKSPRESIJA TRANSGENINIUISE GYVŪNUOSE**

### **3.1. EKSPRESIJOS VEKTORIŲ KONSTRAVIMAS**

Konstruojant ekspresijos vektorius, skirtą produkuoti rekombinantinį žmogaus BSSL variantą transgeninių žinduolių piene, buvo laikomasi šios strategijos (Fig. 13).

Trys plazmidės, turinčios skirtingas žmogaus BSSL geno dalis (pS309, pS310 ir pS311) buvo gautos pagal Lidberg, U., Nilsson, J., Strömberg, K., Stenman, G., Sahlin, P., Enerbäck, S.G. and Bjursell, G. (1992: Genomics 13, 630-640) aprašytą būdą. Plazmidė pS309 turi SphI fragmentą, apimantį BSSL geną nuo 5' netranskribuojamos srities iki ketvirtojo introno dalies. Plazmidė pS310 turi SacI fragmentą, apimantį BSSL varianto geną nuo dalies pirmojo introno iki šeštojo introno dalies. Galiausiai, plazmidė pS311 turi

BamHI fragmentą, apimantį BSSL geną nuo didžiosios dalies penktojo introno ir visą likusią intronų/egzonų struktūrą su delecijomis egzone 11. Pašalintos sekos yra 231 bp, todėl gaunama seka, koduojanti BSSL variantą, kuris turi tiksliai 77 aminorūgštis arba septyniomis mažiau už pilno ilgio BSSL. Gauta BSSL varianto („variantas T“) nukleotidų seka pateikta Sekų Apraše kaip SEQ ID NO: 8. Varianto T aminorūgščių seka pateikta Sekų Apraše kaip SEQ ID NO: 9.

Dėl labai didelio pasikartojamumo žmogaus BSSL geno egzono 11 sekoje, reiktų tikėtis santykinai didelio persitvarkymų dažnio, kai ši seka klonuojama plazmidėje ir dauginama bakterijoje. Remiantis šiomis prielaidomis vienas norimas BSSL variantas, turintis sutrumpintą egzoną 11, buvo identifikuotas, išskirtas ir nustatyta jo seka.

Kita plazmidė, pS283, turinti dalį žmogaus BSSL cDNR, klonuotos plazmidėje pUC19 prie HindIII ir SacI saitų, panaudota apjungti genomines sekas. Plazmidė pS283 taip pat panaudota gauti tinkamą restrikcijos fermentų saitą, KpnI, esantį BSSL 5' netransliuojamoje lyderinėje sekoje.

Plazmidė pS283 suskaidyta NcoI ir SacI ir elektroforetiškai išskirtas apie 2,7 kb ilgio fragmentas. Plazmidė pS309 suskaidyta NcoI ir BspEI ir išskirtas apie 2,3 kb ilgio fragmentas, turintis BSSL geno 5' dalį. Plazmidė pS310 suskaidyta su BspEI ir SacI ir išskirtas apie 2,7 kb ilgio fragmentas, turintis BSSL geno vidurinę dalį. Šie trys fragmentai sujungti ir transformuoti į kompetentinį *E.coli* kamieną TG2, o transformantai išskirti atrenkant ampicilinu.

Plazmidės paruoštos iš kelių transformantų ir viena plazmidė, pavadinta pS312 (Fig. 14), turinti norimą konstrukciją, panaudota tolimesniuose eksperimentuose.

Norint gauti modifikuotą pS311, kurioje BamHI saitas, esantis už terminacijos kodono, pakeistas SalI saitu tolimesnio klonavimo palengvinimui, panaudotas toks būdas. Plazmidė pS311 linearizuota dalinai suskaidant BamHI. Linearizuotas fragmentas atskirtas ir įterptas sintetinis DNR linkeris, pakeičiantis BamHI į SalI saitą (5'-GATCGTCGAC-3'), tuo būdu suardant BamHI saitą. Kadangi buvo dvi potencialios vietos integruotis sintetiniams linkeriams, gautos plazmidės išanalizuotos skaidant restrikciniais fermentais. Plazmidė, su įterptu linkeriu norimoje vietoje už egzono 11, buvo išskirta ir pažymėta pS313.

Gaunant galutinę ekspresijos vektoriaus konstrukciją, turinčią žmogaus BSSL variantų sekas, panaudotas egzistuojantis ekspresijos vektorius, pS314, sukonstruotas taip, kad sąlygotų specifinę stadijų ir audiniui ekspresiją pieno liaukos ląstelėse laktacijos metu. Plazmidė pS314 turi genominių fragmentą iš pelių išrūgų rūgštinio baltymo (WAP) geno (Campbell, S.M., Rosen, J.M., Hennighausen, L.G., Strech-Jurk, U. and Sippel, A.E. (1984): Nucleic Acid Res. 12, 8685-8697), klonuotą kaip NotI fragmentas. Genominis fragmentas turi apie 4,5 kb priekyje esančių valdymo sekų (URS), visus keturis pelių WAP egzonus ir visas intronų sekas bei apie 3 kb seką, esančią po paskutinio egzono. Vienintelis

KpnI saitas yra pirmame egzone 24 kb ankščiau už natūralų WAP transliacijos iniciacijos kodoną. Kitas vienintelis restrikcinio fermento saitas yra SalI saitas, esantis egzone 3.

Žmogaus BSSL varianto genomine seka įstatyta tarp KpnI ir SalI saitų, naudojant šią strategiją. Pirmą, pS314 suskaidyta panaudojant KpnI ir SalI ir fragmentas, turintis perskeltą plazmidę, išskirtas elektroforetiškai. Antra, pS312 suskaidyta panaudojant KpnI ir BamHI, ir išskirtas apie 4,7 kb fragmentas, turintis žmogaus BSSL geno 5' dalį. Trečia, pS313 suskaidyta panaudojant BamHI ir SalI, ir išskirta žmogaus BSSL geno 3' dalis. Gauti trys fragmentai sujungti, transformuoti į kompetentines *E. coli* bakterijas ir transformantai išskirti po selekcijos ampicilinu.

Plazmidės paruoštos iš kelių transformantų ir atliktas restrikcinis kartografavimas bei sekos analizė. Viena plazmidė, turinti norimą ekspresijos vektorių, identifikuota ir pažymėta kaip pS317 (Fig. 15).

Šalinant prokariotinės plazmidės sekas, pS317 suskaidyta NotI. Po to rekombinantinio vektoriaus elementas, sudarytas iš pelių WAP sekos, esantis šalia žmogaus BSSL varianto genomino fragmento, atskirtas naudojant elektroforezę agarzei. Prieš įvedant į pelės embrioną atskirtas fragmentas išgrynintas naudojant elektroliuciją.

Rekombinantinis genas, skirtas žmogaus BSSL varianto ekspresijai transgeninių pelių piene pavaizduotas Fig. 16.

### **3.2. Transgeninių gyvūnų sukūrimas**

NotI fragmentas išskirtas iš plazmidės pS317 pagal būdą, aprašytą 3.1. skyriuje. Šis DNR fragmentas, turi pelių WAP promotorių, prijungtą prie genomines sekos, koduojančios žmogaus BSSL variantą. Išskirtas fragmentas, 3 ng/μl koncentracijoje, įšvirkštas į 350 C57B1/6JxCBA/2J-f<sub>2</sub> embrionų pronukleusus, gautus iš pelių donorų, kurioms sukelta superovuliacija įvedant 5 IU nėščios kumelės serumo gonadotropino. C57B1/6JxCBA/2J-f<sub>1</sub> gyvūnai gauti iš Bomholtgård Veisimo ir tyrimų centro LTD, Ry, Danija. Surinkus embrionus iš kiaušintakių, jie atskirti nuo iškylos (*cumulus oophorus*) ląstelių paveikiant hialuronidaze terpėje M2 (Hogan, B., Constantini, F. and Lacy, E. (1986): *Manipulating the mouse embryo. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press). Perplauti embrionai perkelti į terpę M16 (Hogan ir kt., 1986) ir laikyti inkubatoriuje su 5% CO<sub>2</sub> atmosfera. Įšvirkščijama buvo M2 terpės mikroląseliuose, su lengvo parafino aliejumi, naudojant Narishigi hidraulinius mikromanipulius ir Nikon inversinę mikroskopą su Nomarski optika. Įšvirkštus 267 sveikai atrodantys embrionai implantuoti į 12 pseudonėščių C57B1/6JxCBA/2J-f<sub>1</sub> recipientų, kurioms į pilvo ertmę įvesta 0,35 ml 2,5% avertino. Atliekant PCR analizę su DNR, gauta iš uodegos biopsijos pavyzdžių, paimtų iš gyvūnų praėjus trimis savaitėms po gimimo, nustatytos, pelės, kurios integravo transgeną. Teigiami rezultatai patvirtinti Southern blotingo analize.

Surenkant pieną patelėms, esančioms laktacijos periode, leista į pilvo ertmę po 2 IU oksitocino, ir po 10 minučių anestezuota suleidžiant į pilvo ertmę 0,40 ml 2,5% avertino. Pieno surinkimo įrenginys prijungtas prie spenelių silikonizuotais vamzdeliais ir pienas

rinktas į 1,5 ml Eppendorfo mėgintuvėlius švelniai masažuojant pieno liaukas. Pieno kiekis svyravo priklausomai nuo laktacijos dienos nuo 0,1 iki 0,5 ml vienai pelei per melžimą.

### **3.3. BSSL VARIANTU EKSPRESIJA TRANSGENINĖSE PELĖSE**

Transgeninės pelės identifikuotos analizuojant DNR, gautą iš uodegos biopsijos pavyzdžių. Šie audinio pavyzdžiai inkubuoti su proteinaze K ir ekstrahuoti fenolu/chloroformu. Išskirta DNR naudota polimerazės grandininėse reakcijose su pradmenimis, kurie amplifikuoja specifinius fragmentus, jei yra heterologinė įterpta DNR, turinti ekspresijos vektoriaus fragmentą. Gyvūnai taip pat buvo tirti DNR hibridizacijos būdu tam, kad pasitvirtintų PCR duomenys ir sužinota informacija apie integruotų vektoriaus elementų kopijų skaičių.

Vienoje bandymų grupėje dviem būdais ištirta 31 pelė ir rezultatai parodė, kad 1 pelė turi heterologinį DNR vektoriaus elementą, gautą iš pS317. PCR analizės ir hibridizacijos bandymų rezultatai sutapo (Fig. 17). 10 iš 65 tirtų gyvūnų buvo transgeniniai pS317 atžvilgiu.

Pelės, identifikuotos kaip vektoriaus DNR elemento nešėjos (gyvūnai-įkūrėjai), po to suporuotos ir tais pačiais būdais identifikuoti F1, palikuonys turintys transgeną.

RNR, išskirta iš pS317 transgeninių patelių įvairių audinių per laktacijos periodą, išskirta panaudojant agarozės formaldehido gelio elektroforezę, atliktas jos blotingas prie membranų ir hibridizuota su <sup>32</sup>P-žymėtąja BSSL cDNR, naudojama kaip zondas. Gauti rezultatai parodė, jog ekspresija buvo tik pieno liaukose laktacijos periodu (Fig. 18).

Pieno pavyzdžiai surinkti iš anestezuotų gyvūnų-įkūrėjų, paveiktų oksitocinu, laktacijos indukcijai, ir tirti ar yra rekombinantinis žmogaus BSSL variantas. Tirta SDS-PAGE būdu, po to perkeliama ant nitroceliuliozės membranų ir inkubuojant su polikloniniais antikūnais, pagamintais prieš natyvią žmogaus BSSL. Gauti rezultatai parodė rekombinantinio žmogaus BSSL varianto ekspresiją transgeninių pelių piene. Fig. 19 rodo rekombinantinio žmogaus BSSL varianto buvimą transgeninių pelių piene. Pieno pavyzdžių, gautų iš įvairių pS317 transgeninių pelių, išskyrimas SDS-PAGE būdu ir imunoblotingas parodė, kad rekombinantinis BSSL variantas, turintis mažesnę molekulinę masę, gaminamas efektyviau palyginus su pilno ilgio rekombinantiniu BSSL variantu, gautu iš pS314 transgeninių pelių pieno. Plazmidė pS314 panaši į pS317, bet turi pilno ilgio žmogaus BSSL cDNR, vietoj genomio varianto. Dviguba juosta, matoma visuose pelių pieno pavyzdžiuose, yra pelių BSSL, ir tuo rodo serumo kryžminį reaktyvumą. Ši išvada patvirtinta aptikus, kad ši dviguba juosta matoma 9 takelyje Fig. 19, kuriame yra išgrynintą pelių BSSL.

Sukurtos stabilios transgeninių gyvūnų linijos.

Panašiai gali būti sukurti kiti transgeniniai gyvūnai, tokie kaip triušiai, karvės ar avys, galintys ekspresuoti žmogaus BSSL variantą.

## DEPOZITAI

Šios plazmidės buvo deponuotos pagal Budapešto sutartį muziejuje DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen):

| Plazmidė | Depozito No. | Deponavimo data  |
|----------|--------------|------------------|
| pS309    | DSM 7101     | 1992 birželio 12 |
| pS310    | DSM 7102     |                  |
| pS311    | DSM 7103     |                  |
| pS317    | DSM 7104     |                  |
| pS147    | DSM 7495     | 1993 vasario 26  |
| pS257    | DSM 7496     |                  |
| pS299    | DSM 7497     |                  |
| pS258    | DSM 7501     | 1993 kovo 3      |
| pS259    | DSM 7502     |                  |

**TRUMPAS ILIUSTRACIJŲ APRAŠYMAS****Figūra 1**

A. BPV pagrindu sukurto vektoriaus, naudoto įvairių BSSL variantų, ekspresijai planas.

B. Ištirtų įvairių BSSL variantų schema. FL žymi pilno ilgio BSSL. Aktyvusis centras pažymėtas rutuliuku, saitas potencialiam N-prijungtam angliavandeniui pažymėtas trikampiui. Sritis, turinti pasikartojimus, išskirta užbrūkšniuota zona, o konservatyvus C-galas pažymėtas ištisai užpildyta zona.

**Figūra 2**

DNR, išskirtos iš ląstelių linijų, ekspresuojančių BSSL variantus, Southern blotingo analizė. Tirta DNR, išskirta iš ląstelių linijų, ekspresuojančių pilno ilgio BSSL (FL), variantą A (A), variantą B (B), variantą C (C), variantą N (N). 5 µg atitinkamai paruoštos DNR, išskirtos iš ląstelės (kairėje), ir 1 ng išgrynintos vektoriaus DNR, išskirtos iš bakterijų (dešinėje) suskaidytos BamHI. DNR pavyzdžiai išskirti agarozės gelyje, perkelti ant GeneScreen Plus membranos ir hibridizuoti su <sup>32</sup>P-žymėtąja žmogaus BSSL cDNR.

**Figūra 3**

RNR, išskirtos iš ląstelių linijų, ekspresuojančių rekombinantinius BSSL variantus, Northern blotingo analizė. Tirta 10 µg RNR, išskirtos iš ląstelių linijų, gaminančių pilno ilgio BSSL (FL), variantą A (A), variantą B (B), variantą C (C), variantą N (N). RNR iš C127 ląstelių linijos, turinčios BPV vektorių, identišką vektoriui iš Pav. 1, išskyrus tai, kad jis koduoja baltymą negiminingą BSSL, naudotas kaip neigiama kontrolė (-) (viršutinė

dalis). Filtrai hibridizuoti su  $^{32}\text{P}$ -žymėtąja BSSL cDNR. Po to filtrai pakartotinai hibridizuoti su pelių  $\beta$ -aktino cDNR zondų.  $\beta$ -aktino iRNR signalai (apatinė dalis) naudoti kaip vidinė kontrolė RNR kiekiui, užneštam į kiekvieną takelį.

#### **Figūra 4**

BSSL aktyvumo ekspresija C127 ląstelėse, transfekuotose pilno ilgio ir mutantinėmis žmogaus BSSL formomis. C127 ląstelės buvo transfekuotos skirtingomis BSSL konstrukcijomis: pilno ilgio BSSL (FL), variantu N (N), variantu C (C), variantu B (B), variantu A (A). Po pradinio auginimo periodo, atrinkti atskiri klonai ir leista jiems augti iki susilieimo. Atrinktų klonų skaičius (n) pažymėtas paveikslėlyje. Lipazės aktyvumas nustatytas kondicionuotoje terpėje. Reikšmės išreikštos išskirtų laisvų riebiųjų rūgščių  $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{kondicionuotos terpės ml}^{-1}$ .

#### **Figūra 5**

A. Pilno ilgio ir mutantinės rekombinantinės BSSL Western blotingas. Lipazės aktyvumas, išreikštas išskirtų riebiųjų rūgščių  $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$ , gelyje užnešta: pilno ilgio 0,2 (1 takelis), variantas N 0,16 (2 takelis), variantas C 0,6 (3 takelis), variantas B 0,8 (4 takelis), natyvus BSSL 0,1 (5 takelis). Naudotas antiserumas buvo gautas triušiuose prieš BSSL, išskirtą iš moters pieno. Molekulinės masės markerių (iš anksto padažytas SDS-PAGE standartas, Low Range, BioRad) padėtys parodytos kairėje.

B. Varianto B, paveikto N-glikozidaze, Western blotingas. Variantas B suskaidytas N-glikozidaze F, kaip aprašyta eksperimentinėje dalyje. 1 takelyje nepaveiktas, o 2 takelyje paveiktas variantas B.

#### **Figūra 6**

Pilno ilgio ir mutantinio BSSL priklausomybė nuo tulžies druskų. Nustatytas lipazės aktyvumas keičiant natrio cholato (ištininė linija) arba natrio dezoksicholato (punktyrinė linija) koncentracijas kondicionuotoje terpėje, naudojant pilno ilgio rekombinantinį BSSL (\*), variantą A ( $\square$ ), variantą B ( $\Delta$ ), variantą C ( $\blacksquare$ ), variantą N ( $\bullet$ ) ir išgrynintą žmogaus pieno BSSL ( $\circ$ ). Varianto A atveju kondicionuota terpė sukoncentruota ant mėlynosios sefarozės, kaip aprašyta eksperimentinėje dalyje. Atitinkamo fermento kiekis parinktas toks, kad gautųsi tas pats didžiausio aktyvumo lygis, išskyrus variantą A, kurio didžiausias aktyvumas sudarė tik vieną dešimtąją kitų. Kontroliniai bandymai parodė, kad auginimo terpė neturi įtakos aktyvumo lygiui arba natyvios BSSL priklausomybei nuo tulžies druskų (duomenys neparodyti).

#### **Figūra 7**

A. Įvairių *E.coli* kamienų, pagamintų BSSL, Northern blotingas. Bakterijos indukuotos IPTG, kaip aprašyta eksperimentinėje dalyje. Bandymo sąlygos buvo tokios pat, kaip Pav. 2 apraše. 1 takelis, neindukuotas BL21(DE3)pLysS kamienas; 2 takelis, indukuotas BL21(DE3)pLysS kamienas; 3 takelis, neindukuotas JM109(DE3) kamienas; 4 takelis, indukuotas JM109(DE3) kamienas;

B. 8-18% SDS-PAGE Western blotingas, naudojant antikūnus prieš išgrynintą pieno BSSL, rodantis rekombinantinės BSSL ekspresiją skirtinguose *E.coli* kamienuose, naudojant pGEMEX. Bakterijos indukuotos IPTG ir citoplazminiai bei periplazminiai baltymai išskirti iš lizatų, kaip aprašyta eksperimentinėje dalyje. Bakterinių baltymų kiekiai, užnešti į 2-5 takelius (periplazminiai preparatai) ir į 7-10 takelius (citoplazminiai preparatai), atitinka tą patį kultūros tūrį, todėl dažų dėmės proporcingos produkcijos lygiui. 1 takelis, Pharmacia molekulinės masės markeris; 2 ir 8 takeliai, indukuotas JM109(DE3) kamienas; 3 ir 7 takeliai, neindukuotas JM109(DE3) kamienas; 4 ir 10 takeliai, indukuotas BL21(DE3)pLysS kamienas; 5 ir 9 takeliai, neindukuotas BL21(DE3)pLysS kamienas; 6 takelis, 25 ng išgryninto natyvaus pieno BSSL.

### **Figūra 8**

Išgrynintos rekombinantinės BSSL ir BSSL variantų SDS-PAGE. Pilno ilgio BSSL (FL) ir BSSL variantai N, B ir C išgryninti kaip aprašyta. Kiekvieno panaudota 3 µg, išskyrus variantą B, kurio buvo panaudoti 1,5 µg. Išgrynintos natyvios pieno BSSL (NAT) panaudota 5 µg. Molekulinės masės markerių pozicijos pažymėtos kairėje.

### **Figūra 9**

Natrio dezoksicholato įtaka rekombinantinės BSSL ir BSSL variantų aktyvacijai natrio cholatu. Ištirtas lipazinis aktyvumas rekombinantinės pilno ilgio BSSL (●), rekombinantinių BSSL variantų B (○), C (■) ir N (Δ) išgrynintų preparatų ir išgrynintos natyvios pieno BSSL (□) prie skirtingų natrio cholato koncentracijų, be (kairioji panelė) ir su 5 mM (centrinė panelė) arba 10 mM (dešinioji panelė) dezoksicholato.

### **Figūra 10**

Rekombinantinės BSSL ir BSSL variantų stabilumas prie skirtingų pH. Natyvi BSSL, rekombinantinė pilno ilgio BSSL ir BSSL variantai inkubuoti prie 37 °C skirtinguose buferiuose su pH 2-8. Visi buferiai turėjo 1 mg/ml jaučio serumo albumino. Po 30 min paimti vienodo dydžio mėginiai ir tirtas jų lipazinis aktyvumas. Simbolių paaiškinimo žiūrėk Fig 9 apraše.

### **Figūra 11**

Rekombinantinės BSSL ir BSSL variantų atsparumas kaitinimui. Išgryninta rekombinantinė pilno ilgio BSSL, BSSL variantai ir natyvi pieno BSSL inkubuoti prie nurodytų temperatūrų 50 mM Tris-Cl buferyje, pH 7,5. Viena pavyzdžių grupė turėjo 1 mg/ml jaučio serumo albumino. Po 30 min paimti mėginiai ir tirtas jų lipazinis aktyvumas. Aktyvumai išreikšti kaip procentai nuo kiekvieno pavyzdžio aktyvumo prie 0 min. Simbolių paaiškinimo žiūrėk Fig 9 apraše.

### **Figūra 12**

Tulžies druskų įtaka rekombinantinės BSSL ir BSSL variantų inaktyvavimui tripsinu. Išgryninta rekombinantinė pilno ilgio BSSL, BSSL variantai ir natyvi pieno BSSL (15 µl, turintys 1-4 µg) pridėti į 60 µl 1,0 M Tris-Cl, pH 7,4, su 10 µg tripsino (TPCK-tripsin, Boehringer-Mannheim) prie 25 °C, be (punktyrinė linija) ir su (ištinė linija) 10 mM natrio cholatu. Po nurodyto laiko buvo paimti vienodo dydžio mėginiai ir ištirtas jų

lipazinis aktyvumas. Reikšmės išreikštos kaip procentai nuo reikšmių, gautų kontrolinėse inkubacijose be tripsino. Simbolių paaiškinimo žiūrėk Fig 9 apraše.

#### **Figūra 13**

Plazmidės pS317 gamybos būdas. Smulkiau žiūrėk 3.1 skyriuje.

#### **Figūra 14**

Plazmidės pS312 sandaros schema.

#### **Figūra 15**

Plazmidės pS317 sandaros schema.

#### **Figūra 16**

Schema, vaizduojanti žmogaus BSSL varianto genomines sandaros fizinę padėtį WAP geno pirmajame egzone, kaip aprašyta 3.1 skyriuje.

#### **Figūra 17**

A. PCR pradmenų, vartotų identifikuojant transgeninius gyvūnus, išsidėtymo schema. 5'-pradmuo išsidėsto prie WAP sekos, pradedant nuo 148 bp pozicijos prieš WAP ir BSSL varianto sujungimo tašką. 3'-pradmuo išsidėsto prie pirmo BSSL varianto introno, kuris baigiasi 400 bp žemiau sujungimo taško.

B. Vartotų PCR pradmenų sekos.

C. Potencialių gyvūnų-įkūrėjų tipiška PCR analizė agarozės gelyje. M: molekulinės masės markeriai. 1 takelis: kontrolinis PCR produktas, gautas iš plazmidės pS317. 2-13 takelis: PCR reakcijos, atliktos su DNR preparatais iš potencialių gyvūnų-įkūrėjų.

#### **Figūra 18**

RNR, išskirtos iš pS317 transgeninės pelės patelės įvairių audinių, Northern blotingas. Audiniai išskirti ketvirtą laktacijos dieną. 10 µg visos RNR iš kiekvieno audinio tirta išskyrus agaru-formaldehidu ir perkėlus ant membranų bei hibridinant su <sup>32</sup>P-žymėtąja žmogaus BSSL cDNR. Takeliuose yra Mg: pieno liaukos; Li: kepenų; Ki: inkstų; Sp: blužnies; He: širdies; Lu: plaučių; Sg: seilių liaukos; Br: smegenų. RNR dydis, išreikštas nukleotidais, pažymėtas kairėje.

#### **Figūra 19**

Pieno, gauto iš pS317 transgeninių pelių, ir pilno ilgio cDNR vektoriaus pS314 transgeninių pelių bei kontrolinių gyvūnų, Western blotingas. Bandiniai išskirti SDS-PAGE būdu ir perkelti į Immobilon filtrus bei atliktas imuninis blotingas, naudojant atiserumą, gautą prieš natyvią žmogaus BSSL. 1 takelis: molekulinės masės markeriai; 2,3 ir 4 takeliai: 2 µl pieno iš pS317 įkūrėjo #91 trijų F1 dukterų (F1 30, 31, ir 33); 5 takelis: 2 µl pieno iš pS314 įkūrėjo #90; 6,7 ir 8 takeliai: 2 µl pieno iš trijų neturinčių BSSL transgeninių gyvūnų; 9 takelis: išgryninta pelių BSSL; 10 takelis: išgryninta žmogaus natyvi BSSL.

SEKU APRAŠAS

- (1) BENDRA INFORMACIJA
  - (i) PAREIŠKĖJAI:
    - (A) VARDAS: AB ASTRA
    - (B) GATVĖ: Kvarnbergagatan 16
    - (C) MIESTAS: Sodertalje
    - (E) ŠALIS: Švedija
    - (F) PAŠTO KODAS (ZIP): S-151 85
    - (G) TELEFONAS: +46-8-55 32 60 00
    - (H) TELEFAKSAS: +46-8-55 32 88 20
    - (I) TELEKSAS: 19237 astra s
  - (ii) IŠRADIMO PAVADINIMAS: Nauji polipeptidai
  - (iii) SEKŲ SKAIČIUS: 9
  - (iv) KOMPIUTERIU NUSKAITOMA FORMA:
    - (A) NEŠIKLIO TIPAS: Minkštasis diskas
    - (B) KOMPIUTERIS: Suderinamas su IBM PC
    - (C) OPERACINĖ SISTEMA: PC-DOS/MS-DOS
    - (D) PROGRAMA: PatentIn Release #1.0, Versija #1.25 (EPO)
- (2) SEQ ID no: 1 inforMACIJA:
  - (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
    - (A) ILGIS: 2428 bazių poros
    - (B) TIPAS: nukleino rūgštis
    - (C) SUSIVIJIMAS: dvigubas
    - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
  - (ii) MOLEKULĖS TIPAS: cDNR, gauta iš iRNR
  - (iii) HIPOTETINĖ: ne
  - (iii) ANTIPRASMINĖ: ne
  - (vi) ORIGINALO ŠALTINIS:
    - (A) ORGANIZMAS: Homo sapiens
    - (F) AUDINIO TIPAS: pieno liauka
  - (ix) YPATYBĖ:
    - (A) VARDAS/RAKTAS: CDS
    - (B) PADĖTIS: 82 .. 2319
    - (D) KITA INFORMACIJA: /produktas= „tulžies druskomis stimuliuojama lipazė“
  - (ix) YPATYBĖ:
    - (A) VARDAS/RAKTAS: egzonas
    - (B) PADĖTIS: 985 .. 1173
  - (ix) YPATYBĖ:
    - (A) VARDAS/RAKTAS: egzonas
    - (B) PADĖTIS: 1174 .. 1377
  - (ix) YPATYBĖ:
    - (A) VARDAS/RAKTAS: egzonas
    - (B) PADĖTIS: 1378 .. 1575
  - (ix) YPATYBĖ:
    - (A) VARDAS/RAKTAS: egzonas
    - (B) PADĖTIS: 1576 .. 2415
  - (ix) YPATYBĖ:
    - (A) VARDAS/RAKTAS: subrendęs peptidas

- (B) PADĖTIS: 151 . . 2316
- (ix) YPATYBĖ:
- (A) VARDAS/RAKTAS: polyA signalas
- (B) PADĖTIS: 2397 . . 2402
- (ix) YPATYBĖ:
- (A) VARDAS/RAKTAS: pasikartojimų sritis
- (B) PADĖTIS: 1756 . . 2283
- (ix) YPATYBĖ:
- (A) VARDAS/RAKTAS: 5'UTR
- (B) PADĖTIS: 1 . . 81
- (ix) YPATYBĖ:
- (A) VARDAS/RAKTAS: pasikartojimo vienetą
- (B) PADĖTIS: 1756 . . 1788
- (ix) YPATYBĖ:
- (A) VARDAS/RAKTAS: pasikartojimo vienetą
- (B) PADĖTIS: 1789 . . 1821
- (ix) YPATYBĖ:
- (A) VARDAS/RAKTAS: pasikartojimo vienetą
- (B) PADĖTIS: 1822 . . 1854
- (ix) YPATYBĖ:
- (A) VARDAS/RAKTAS: pasikartojimo vienetą
- (B) PADĖTIS: 1855 . . 1887
- (ix) YPATYBĖ:
- (A) VARDAS/RAKTAS: pasikartojimo vienetą
- (B) PADĖTIS: 1888 . . 1920
- (ix) YPATYBĖ:
- (A) VARDAS/RAKTAS: pasikartojimo vienetą
- (B) PADĖTIS: 1921 . . 1953
- (ix) YPATYBĖ:
- (A) VARDAS/RAKTAS: pasikartojimo vienetą
- (B) PADĖTIS: 1954 . . 1986
- (ix) YPATYBĖ:
- (A524) VARDAS/RAKTAS: pasikartojimo vienetą
- (B) PADĖTIS: 1987 . . 2019
- (ix) YPATYBĖ:
- (A) VARDAS/RAKTAS: pasikartojimo vienetą
- (B) PADĖTIS: 2020 . . 2052
- (ix) YPATYBĖ:
- (A) VARDAS/RAKTAS: pasikartojimo vienetą
- (B) PADĖTIS: 2053 . . 2085
- (ix) YPATYBĖ:
- (A) VARDAS/RAKTAS: pasikartojimo vienetą
- (B) PADĖTIS: 2086 . . 2118
- (ix) YPATYBĖ:
- (A) VARDAS/RAKTAS: pasikartojimo vienetą
- (B) PADĖTIS: 2119 . . 2151
- (ix) YPATYBĖ:
- (A) VARDAS/RAKTAS: pasikartojimo vienetą
- (B) PADĖTIS: 2152 . . 2184

- (ix) YPATYBĖ:  
 (A) VARDAS/RAKTAS: pasikartojimo vienetas  
 (B) PADĖTIS: 2185 .. 2217
- (ix) YPATYBĖ:  
 (A) VARDAS/RAKTAS: pasikartojimo vienetas  
 (B) PADĖTIS: 2218 .. 2250
- (ix) YPATYBĖ:  
 (A) VARDAS/RAKTAS: pasikartojimo vienetas  
 (B) PADĖTIS: 2251 .. 2283
- (xi) SEKOS ATVAIZDAVIMAS: SEQ ID NO: 1:

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| ACCTTCTGTA TCAGTTAAGT GTCAAGATGG AAGGAACAGC AGTCTCAAGA TAATGCAAAG | 60  |
| AGTTTATTCA TCCAGAGGCT G ATG CTC ACC ATG GGG CGC CTG CAA CTG GTT   | 111 |
| Met Leu Thr Met Gly Arg Leu Gln Leu Val                           |     |
| -23 -20 -15                                                       |     |
| GTG TTG GGC CTC ACC TGC TGC TGG GCA GTG GCG AGT GCC GCG AAG CTG   | 159 |
| Val Leu Gly Leu Thr Cys Cys Trp Ala Val Ala Ser Ala Ala Lys Leu   |     |
| -10 -5 1                                                          |     |
| GGC GCC GTG TAC ACA GAA GGT GGG TTC GTG GAA GGC GTC AAT AAG AAG   | 207 |
| Gly Ala Val Tyr Thr Glu Gly Phe Val Glu Gly Val Asn Lys Lys       |     |
| 5 10 15                                                           |     |
| CTC GGC CTC CTG GGT GAC TCT GTG GAC ATC TTC AAG GGC ATC CCC TTC   | 255 |
| Leu Gly Leu Leu Gly Asp Ser Val Asp Ile Phe Lys Gly Ile Pro Phe   |     |
| 20 25 30 35                                                       |     |
| GCA GCT CCC ACC AAG GCC CTG GAA AAT CCT CAG CCA CAT CCT GGC TGG   | 303 |
| Ala Ala Pro Thr Lys Ala Leu Glu Asn Pro Gln Pro His Pro Gly Trp   |     |
| 40 45 50                                                          |     |
| CAA GGG ACC CTG AAG GCC AAG AAC TTC AAG AAG AGA TGC CTG CAG GCC   | 351 |
| Gln Gly Thr Leu Lys Ala Lys Asn Phe Lys Lys Arg Cys Leu Gln Ala   |     |
| 55 60 65                                                          |     |
| ACC ATC ACC CAG GAC AGC ACC TAC GGG GAT GAA GAC TGC CTG TAC CTC   | 399 |
| Thr Ile Thr Gln Asp Ser Thr Tyr Gly Asp Glu Asp Cys Leu Tyr Leu   |     |
| 70 75 80                                                          |     |
| AAC ATT TGG GTG CCC CAG GGC AGG AAG CAA GTC TCC CGG GAC CTG CCC   | 447 |
| Asn Ile Trp Val Pro Gln Gly Arg Lys Gln Val Ser Arg Asp Leu Pro   |     |
| 85 90 95                                                          |     |
| GTT ATG ATC TGG ATC TAT GGA GGC GCC TTC CTC ATG GGG TCC GGC CAT   | 495 |
| Val Met Ile Trp Ile Tyr Gly Gly Ala Phe Leu Met Gly Ser Gly His   |     |
| 100 105 110 115                                                   |     |
| GGG GCC AAC TTC CTC AAC AAC TAC CTG TAT GAC GGC GAG GAG ATC GCC   | 543 |
| Gly Ala Asn Phe Leu Asn Asn Tyr Leu Tyr Asp Gly Glu Glu Ile Ala   |     |
| 120 125 130                                                       |     |
| ACA CGC GGA AAC GTC ATC GTG GTC ACC TTC AAC TAC CGT GTC GGC CCC   | 591 |
| Thr Arg Gly Asn Val Ile Val Val Thr Phe Asn Tyr Arg Val Gly Pro   |     |
| 135 140 145                                                       |     |
| CTT GGG TTC CTC AGC ACT GGG GAC GCC AAT CTG CCA GGT AAC TAT GGC   | 639 |
| Leu Gly Phe Leu Ser Thr Gly Asp Ala Asn Leu Pro Gly Asn Tyr Gly   |     |
| 150 155 160                                                       |     |
| CTT CGG GAT CAG CAC ATG GCC ATT GCT TGG GTG AAG AGG AAT ATC GCG   | 687 |
| Leu Arg Asp Gln His Met Ala Ile Ala Trp Val Lys Arg Asn Ile Ala   |     |
| 165 170 175                                                       |     |

|                                                                                                                                                       |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| GCC TTC GGG GGG GAC CCC AAC AAC ATC ACG CTC TTC GGG GAG TCT GCT<br>Ala Phe Gly Gly Asp Pro Asn Asn Ile Thr Leu Phe Gly Glu Ser Ala<br>180 185 190 195 | 735  |
| GGA GGT GCC AGC GTC TCT CTG CAG ACC CTC TCC CCC TAC AAC AAG GGC<br>Gly Gly Ala Ser Val Ser Leu Gln Thr Leu Ser Pro Tyr Asn Lys Gly<br>200 205 210     | 783  |
| CTC ATC CGG CGA GCC ATC AGC CAG AGC GGC GTG GCC CTG AGT CCC TGG<br>Leu Ile Arg Arg Ala Ile Ser Gln Ser Gly Val Ala Leu Ser Pro Trp<br>215 220 225     | 831  |
| GTC ATC CAG AAA AAC CCA CTC TTC TGG GCC AAA AAG GTG GCT GAG AAG<br>Val Ile Gln Lys Asn Pro Leu Phe Trp Ala Lys Lys Val Ala Glu Lys<br>230 235 240     | 879  |
| GTG GGT TGC CCT GTG GGT GAT GCC GCC AGG ATG GCC CAG TGT CTG AAG<br>Val Gly Cys Pro Val Gly Asp Ala Ala Arg Met Ala Gln Cys Leu Lys<br>245 250 255     | 927  |
| GTT ACT GAT CCC CGA GCC CTG ACG CTG GCC TAT AAG GTG CCG CTG GCA<br>Val Thr Asp Pro Arg Ala Leu Thr Leu Ala Tyr Lys Val Pro Leu Ala<br>260 265 270 275 | 975  |
| GGC CTG GAG TAC CCC ATG CTG CAC TAT GTG GGC TTC GTC CCT GTC ATT<br>Gly Leu Glu Tyr Pro Met Leu His Tyr Val Gly Phe Val Pro Val Ile<br>280 285 290     | 1023 |
| GAT GGA GAC TTC ATC CCC GCT GAC CCG ATC AAC CTG TAC GCC AAC GCC<br>Asp Gly Asp Phe Ile Pro Ala Asp Pro Ile Asn Leu Tyr Ala Asn Ala<br>295 300 305     | 1071 |
| GCC GAC ATC GAC TAT ATA GCA GGC ACC AAC AAC ATG GAC GGC CAC ATC<br>Ala Asp Ile Asp Tyr Ile Ala Gly Thr Asn Asn Met Asp Gly His Ile<br>310 315 320     | 1119 |
| TTC GCC AGC ATC GAC ATG CCT GCC ATC AAC AAG GGC AAC AAG AAA GTC<br>Phe Ala Ser Ile Asp Met Pro Ala Ile Asn Lys Gly Asn Lys Lys Val<br>325 330 335     | 1167 |
| ACG GAG GAG GAC TTC TAC AAG CTG GTC AGT GAG TTC ACA ATC ACC AAG<br>Thr Glu Glu Asp Phe Tyr Lys Leu Val Ser Glu Phe Thr Ile Thr Lys<br>340 345 350 355 | 1215 |
| GGG CTC AGA GGC GCC AAG ACG ACC TTT GAT GTC TAC ACC GAG TCC TGG<br>Gly Leu Arg Gly Ala Lys Thr Thr Phe Asp Val Tyr Thr Glu Ser Trp<br>360 365 370     | 1263 |
| GCC CAG GAC CCA TCC CAG GAG AAT AAG AAG AAG ACT GTG GTG GAC TTT<br>Ala Gln Asp Pro Ser Gln Glu Asn Lys Lys Lys Thr Val Val Asp Phe<br>375 380 385     | 1311 |
| GAG ACC GAT GTC CTC TTC CTG GTG CCC ACC GAG ATT GCC CTA GCC CAG<br>Glu Thr Asp Val Leu Phe Leu Val Pro Thr Glu Ile Ala Leu Ala Gln<br>390 395 400     | 1359 |
| CAC AGA GCC AAT GCC AAG AGT GCC AAG ACC TAC GCC TAC CTG TTT TCC<br>His Arg Ala Asn Ala Lys Ser Ala Lys Thr Tyr Ala Tyr Leu Phe Ser<br>405 410 415     | 1407 |
| CAT CCC TCT CGG ATG CCC GTC TAC CCC AAA TGG GTG GGG GCC GAC CAT<br>His Pro Ser Arg Met Pro Val Tyr Pro Lys Trp Val Gly Ala Asp His<br>420 425 430 435 | 1455 |
| GCA GAT GAC ATT CAG TAC GTT TTC GGG AAG CCC TTC GCC ACC CCC ACG<br>Ala Asp Asp Ile Gln Tyr Val Phe Gly Lys Pro Phe Ala Thr Pro Thr<br>440 445 450     | 1503 |

|      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |            |      |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------|------|
| GGC  | TAC | CGG | CCC | CAA | GAC | AGG | ACA | GTC | TCT | AAG | GCC | ATG | ATC | GCC | TAC        | 1551 |
| Gly  | Tyr | Arg | Pro | Gln | Asp | Arg | Thr | Val | Ser | Lys | Ala | Met | Ile | Ala | Tyr        |      |
|      |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     | 465 |     |            |      |
| TGG  | ACC | AAC | TTT | GCC | AAA | ACA | GGG | GAC | CCC | AAC | ATG | GGC | GAC | TCG | GCT        | 1599 |
| Trp  | Thr | Asn | Phe | Ala | Lys | Thr | Gly | Asp | Pro | Asn | Met | Gly | Asp | Ser | Ala        |      |
|      |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |     |     |            |      |
| GTG  | CCC | ACA | CAC | TGG | GAA | CCC | TAC | ACT | ACG | GAA | AAC | AGC | GGC | TAC | CTG        | 1647 |
| Val  | Pro | Thr | His | Trp | Glu | Pro | Tyr | Thr | Thr | Glu | Asn | Ser | Gly | Tyr | Leu        |      |
|      | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |     |     |            |      |
| GAG  | ATC | ACC | AAG | AAG | ATG | GGC | AGC | AGC | TCC | ATG | AAG | CGG | AGC | CTG | AGA        | 1695 |
| Glu  | Ile | Thr | Lys | Lys | Met | Gly | Ser | Ser | Ser | Met | Lys | Arg | Ser | Leu | Arg        |      |
| 500  |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |     |     | 515        |      |
| ACC  | AAC | TTC | CTG | CGC | TAC | TGG | ACC | CTC | ACC | TAT | CTG | GCG | CTG | CCC | ACA        | 1743 |
| Thr  | Asn | Phe | Leu | Arg | Tyr | Trp | Thr | Leu | Thr | Tyr | Leu | Ala | Leu | Pro | Thr        |      |
|      |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |     | 530 |            |      |
| GTG  | ACC | GAC | CAG | GAG | GCC | ACC | CCT | GTG | CCC | CCC | ACA | GGG | GAC | TCC | GAG        | 1791 |
| Val  | Thr | Asp | Gln | Glu | Ala | Thr | Pro | Val | Pro | Pro | Thr | Gly | Asp | Ser | Glu        |      |
|      |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     | 545 |     |            |      |
| GCC  | ACT | CCC | GTG | CCC | CCC | ACG | GGT | GAC | TCC | GAG | ACC | GCC | CCC | GTG | CCG        | 1839 |
| Ala  | Thr | Pro | Val | Pro | Pro | Thr | Gly | Asp | Ser | Glu | Thr | Ala | Pro | Val | Pro        |      |
|      |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |     |     |            |      |
| CCC  | ACG | GGT | GAC | TCC | GGG | GCC | CCC | CCC | GTG | CCG | CCC | ACG | GGT | GAC | TCC        | 1887 |
| Pro  | Thr | Gly | Asp | Ser | Gly | Ala | Pro | Pro | Val | Pro | Pro | Thr | Gly | Asp | Ser        |      |
|      | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |     |     |            |      |
| GGG  | GCC | CCC | CCC | GTG | CCG | CCC | ACG | GGT | GAC | TCC | GGG | GCC | CCC | CCC | GTG        | 1935 |
| Gly  | Ala | Pro | Pro | Val | Pro | Pro | Thr | Gly | Asp | Ser | Gly | Ala | Pro | Pro | Val        |      |
| 580  |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |     |     | 595        |      |
| CCG  | CCC | ACG | GGT | GAC | TCC | GGG | GCC | CCC | CCC | GTG | CCG | CCC | ACG | GGT | GAC        | 1983 |
| Pro  | Pro | Thr | Gly | Asp | Ser | Gly | Ala | Pro | Pro | Val | Pro | Pro | Thr | Gly | Asp        |      |
|      |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |     | 610 |            |      |
| TCC  | GGG | GCC | CCC | CCC | GTG | CCG | CCC | ACG | GGT | GAC | TCC | GGG | GCC | CCC | CCC        | 2031 |
| Ser  | Gly | Ala | Pro | Pro | Val | Pro | Pro | Thr | Gly | Asp | Ser | Gly | Ala | Pro | Pro        |      |
|      |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     | 625 |     |            |      |
| GTG  | CCG | CCC | ACG | GGT | GAC | TCC | GGC | GCC | CCC | CCC | GTG | CCG | CCC | ACG | GGT        | 2079 |
| Val  | Pro | Pro | Thr | Gly | Asp | Ser | Gly | Ala | Pro | Pro | Val | Pro | Pro | Thr | Gly        |      |
|      |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |     |     |            |      |
| GAC  | GCC | GGG | CCC | CCC | CCC | GTG | CCG | CCC | ACG | GGT | GAC | TCC | GGC | GCC | CCC        | 2127 |
| Asp  | Ala | Gly | Pro | Pro | Pro | Val | Pro | Pro | Thr | Gly | Asp | Ser | Gly | Ala | Pro        |      |
|      | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |     |     |            |      |
| CCC  | GTG | CCG | CCC | ACG | GGT | GAC | TCC | GGG | GCC | CCC | CCC | GTG | ACC | CCC | ACG        | 2175 |
| Pro  | Val | Pro | Pro | Thr | Gly | Asp | Ser | Gly | Ala | Pro | Pro | Val | Thr | Pro | Thr        |      |
| 660  |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |     |     | 675        |      |
| GGT  | GAC | TCC | GAG | ACC | GCC | CCC | GTG | CCG | CCC | ACG | GGT | GAC | TCC | GGG | GCC        | 2223 |
| Gly  | Asp | Ser | Glu | Thr | Ala | Pro | Val | Pro | Pro | Thr | Gly | Asp | Ser | Gly | Ala        |      |
|      |     |     |     | 680 |     |     |     | 685 |     |     |     |     |     | 690 |            |      |
| CCC  | CCT | GTG | CCC | CCC | ACG | GGT | GAC | TCT | GAG | GCT | GCC | CCT | GTG | CCC | CCC        | 2271 |
| Pro  | Pro | Val | Pro | Pro | Thr | Gly | Asp | Ser | Glu | Ala | Ala | Pro | Val | Pro | Pro        |      |
|      |     |     | 695 |     |     |     |     | 700 |     |     |     |     | 705 |     |            |      |
| ACA  | GAT | GAC | TCC | AAG | GAA | GCT | CAG | ATG | CCT | GCA | GTC | ATT | AGG | TTT | TAGCGTCCCA |      |
| 2326 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |            |      |
| Thr  | Asp | Asp | Ser | Lys | Glu | Ala | Gln | Met | Pro | Ala | Val | Ile | Arg | Phe |            |      |
|      |     | 710 |     |     |     |     | 715 |     |     |     |     |     | 720 |     |            |      |

TGAGCCTTGG TATCAAGAGG CCACAAGAGT GGGACCCCAG GGGCTCCCCT CCCATCTTGA 2386  
 GCTCTTCCTG AATAAAGCCT CATACCCCTA AAAAAAAAAA AA 2428

(2) SWQ ID NO: 2 INFORMACIJA:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 745 aminorūgštys

(B) TIPAS: aminorūgštis

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: baltymas

(xi) SEKOS ATVAIZDAVIMAS: SEQ ID NO: 2:

Met Leu Thr Met Gly Arg Leu Gln Leu Val Val Leu Gly Leu Thr Cys  
 -23 -20 -15 -10  
 Cys Trp Ala Val Ala Ser Ala Ala Lys Leu Gly Ala Val Tyr Thr Glu  
 -5 1 5  
 Gly Gly Phe Val Glu Gly Val Asn Lys Lys Leu Gly Leu Leu Gly Asp  
 10 15 20 25  
 Ser Val Asp Ile Phe Lys Gly Ile Pro Phe Ala Ala Pro Thr Lys Ala  
 30 35 40  
 Leu Glu Asn Pro Gln Pro His Pro Gly Trp Gln Gly Thr Leu Lys Ala  
 45 50 55  
 Lys Asn Phe Lys Lys Arg Cys Leu Gln Ala Thr Ile Thr Gln Asp Ser  
 60 65 70  
 Thr Tyr Gly Asp Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Trp Val Pro Gln  
 75 80 85  
 Gly Arg Lys Gln Val Ser Arg Asp Leu Pro Val Met Ile Trp Ile Tyr  
 90 95 100 105  
 Gly Gly Ala Phe Leu Met Gly Ser Gly His Gly Ala Asn Phe Leu Asn  
 110 115 120  
 Asn Tyr Leu Tyr Asp Gly Glu Glu Ile Ala Thr Arg Gly Asn Val Ile  
 125 130 135  
 Val Val Thr Phe Asn Tyr Arg Val Gly Pro Leu Gly Phe Leu Ser Thr  
 140 145 150  
 Gly Asp Ala Asn Leu Pro Gly Asn Tyr Gly Leu Arg Asp Gln His Met  
 155 160 165  
 Ala Ile Ala Trp Val Lys Arg Asn Ile Ala Ala Phe Gly Gly Asp Pro  
 170 175 180 185  
 Asn Asn Ile Thr Leu Phe Gly Glu Ser Ala Gly Gly Ala Ser Val Ser  
 190 195 200  
 Leu Gln Thr Leu Ser Pro Tyr Asn Lys Gly Leu Ile Arg Arg Ala Ile  
 205 210 215  
 Ser Gln Ser Gly Val Ala Leu Ser Pro Trp Val Ile Gln Lys Asn Pro  
 220 225 230  
 Leu Phe Trp Ala Lys Lys Val Ala Glu Lys Val Gly Cys Pro Val Gly  
 235 240 245  
 32  
 Asp Ala Ala Arg Met Ala Gln Cys Leu Lys Val Thr Asp Pro Arg Ala

250                      255                      260                      265  
 Leu Thr Leu Ala Tyr Lys Val Pro Leu Ala Gly Leu Glu Tyr Pro Met  
                                  270                      275                      280  
 Leu His Tyr Val Gly Phe Val Pro Val Ile Asp Gly Asp Phe Ile Pro  
                                  285                      290                      295  
 Ala Asp Pro Ile Asn Leu Tyr Ala Asn Ala Ala Asp Ile Asp Tyr Ile  
                                  300                      305                      310  
 Ala Gly Thr Asn Asn Met Asp Gly His Ile Phe Ala Ser Ile Asp Met  
                                  315                      320                      325  
 Pro Ala Ile Asn Lys Gly Asn Lys Lys Val Thr Glu Glu Asp Phe Tyr  
                                  330                      335                      340                      345  
 Lys Leu Val Ser Glu Phe Thr Ile Thr Lys Gly Leu Arg Gly Ala Lys  
                                  350                      355                      360  
 Thr Thr Phe Asp Val Tyr Thr Glu Ser Trp Ala Gln Asp Pro Ser Gln  
                                  365                      370                      375  
 Glu Asn Lys Lys Lys Thr Val Val Asp Phe Glu Thr Asp Val Leu Phe  
                                  380                      385                      390  
 Leu Val Pro Thr Glu Ile Ala Leu Ala Gln His Arg Ala Asn Ala Lys  
                                  395                      400                      405  
 Ser Ala Lys Thr Tyr Ala Tyr Leu Phe Ser His Pro Ser Arg Met Pro  
                                  410                      415                      420                      425  
 Val Tyr Pro Lys Trp Val Gly Ala Asp His Ala Asp Asp Ile Gln Tyr  
                                  430                      435                      440  
 Val Phe Gly Lys Pro Phe Ala Thr Pro Thr Gly Tyr Arg Pro Gln Asp  
                                  445                      450                      455  
 Arg Thr Val Ser Lys Ala Met Ile Ala Tyr Trp Thr Asn Phe Ala Lys  
                                  460                      465                      470  
 Thr Gly Asp Pro Asn Met Gly Asp Ser Ala Val Pro Thr His Trp Glu  
                                  475                      480                      485  
 Pro Tyr Thr Thr Glu Asn Ser Gly Tyr Leu Glu Ile Thr Lys Lys Met  
                                  490                      495                      500                      505  
 Gly Ser Ser Ser Met Lys Arg Ser Leu Arg Thr Asn Phe Leu Arg Tyr  
                                  510                      515                      520  
 Trp Thr Leu Thr Tyr Leu Ala Leu Pro Thr Val Thr Asp Gln Glu Ala  
                                  525                      530                      535  
 Thr Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Glu Ala Thr Pro Val Pro Pro  
                                  540                      545                      550  
 Thr Gly Asp Ser Glu Thr Ala Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly  
                                  555                      560                      565  
 Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro  
                                  570                      575                      580                      585  
 Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser  
                                  590                      595                      600  
 Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val  
                                  605                      610                      33                      615

Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp  
 620 625 630  
 Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ala Gly Pro Pro Pro  
 635 640 645  
 Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly  
 650 655 660 665  
 Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Thr Pro Thr Gly Asp Ser Glu Thr Ala  
 670 675 680  
 Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr  
 685 690 695  
 Gly Asp Ser Glu Ala Ala Pro Val Pro Pro Thr Asp Asp Ser Lys Glu  
 700 705 710  
 Ala Gln Met Pro Ala Val Ile Arg Phe  
 715 720

## (2) SEQ ID NO: 3 INFORMACIJA:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
  - (A) ILGIS: 722 aminorūgštys
  - (B) TIPAS: aminorūgštis
  - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: baltymas
- (iii) HIPOTETINĖ: ne
- (vi) ORIGINALO ŠALTINIS:
  - (A) ORGANIZMAS: Homo sapiens
  - (F) AUDINIO TIPAS: pieno liauka
- (xi) SEKOS ATVAIZDAVIMAS: SEQ ID NO: 3:

Ala Lys Leu Gly Ala Val Tyr Thr Glu Gly Gly Phe Val Glu Gly Val  
 1 5 10 15  
 Asn Lys Lys Leu Gly Leu Leu Gly Asp Ser Val Asp Ile Phe Lys Gly  
 20 25 30  
 Ile Pro Phe Ala Ala Pro Thr Lys Ala Leu Glu Asn Pro Gln Pro His  
 35 40 45  
 Pro Gly Trp Gln Gly Thr Leu Lys Ala Lys Asn Phe Lys Lys Arg Cys  
 50 55 60  
 Leu Gln Ala Thr Ile Thr Gln Asp Ser Thr Tyr Gly Asp Glu Asp Cys  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Asn Ile Trp Val Pro Gln Gly Arg Lys Gln Val Ser Arg  
 85 90 95  
 Asp Leu Pro Val Met Ile Trp Ile Tyr Gly Gly Ala Phe Leu Met Gly  
 100 105 110  
 Ser Gly His Gly Ala Asn Phe Leu Asn Asn Tyr Leu Tyr Asp Gly Glu  
 115 120 125  
 Glu Ile Ala Thr Arg Gly Asn Val Ile Val Val Thr Phe Asn Tyr Arg  
 130 135 140

Val Gly Pro Leu Gly Phe Leu Ser Thr Gly Asp Ala Asn Leu Pro Gly  
 145 150 155 160  
 Asn Tyr Gly Leu Arg Asp Gln His Met Ala Ile Ala Trp Val Lys Arg  
 165 170 175  
 Asn Ile Ala Ala Phe Gly Gly Asp Pro Asn Asn Ile Thr Leu Phe Gly  
 180 185 190  
 Glu Ser Ala Gly Gly Ala Ser Val Ser Leu Gln Thr Leu Ser Pro Tyr  
 195 200 205  
 Asn Lys Gly Leu Ile Arg Arg Ala Ile Ser Gln Ser Gly Val Ala Leu  
 210 215 220  
 Ser Pro Trp Val Ile Gln Lys Asn Pro Leu Phe Trp Ala Lys Lys Val  
 225 230 235 240  
 Ala Glu Lys Val Gly Cys Pro Val Gly Asp Ala Ala Arg Met Ala Gln  
 245 250 255  
 Cys Leu Lys Val Thr Asp Pro Arg Ala Leu Thr Leu Ala Tyr Lys Val  
 260 265 270  
 Pro Leu Ala Gly Leu Glu Tyr Pro Met Leu His Tyr Val Gly Phe Val  
 275 280 285  
 Pro Val Ile Asp Gly Asp Phe Ile Pro Ala Asp Pro Ile Asn Leu Tyr  
 290 295 300  
 Ala Asn Ala Ala Asp Ile Asp Tyr Ile Ala Gly Thr Asn Asn Met Asp  
 305 310 315 320  
 Gly His Ile Phe Ala Ser Ile Asp Met Pro Ala Ile Asn Lys Gly Asn  
 325 330 335  
 Lys Lys Val Thr Glu Glu Asp Phe Tyr Lys Leu Val Ser Glu Phe Thr  
 340 345 350  
 Ile Thr Lys Gly Leu Arg Gly Ala Lys Thr Thr Phe Asp Val Tyr Thr  
 355 360 365  
 Glu Ser Trp Ala Gln Asp Pro Ser Gln Glu Asn Lys Lys Lys Thr Val  
 370 375 380  
 Val Asp Phe Glu Thr Asp Val Leu Phe Leu Val Pro Thr Glu Ile Ala  
 385 390 395 400  
 Leu Ala Gln His Arg Ala Asn Ala Lys Ser Ala Lys Thr Tyr Ala Tyr  
 405 410 415  
 Leu Phe Ser His Pro Ser Arg Met Pro Val Tyr Pro Lys Trp Val Gly  
 420 425 430  
 Ala Asp His Ala Asp Asp Ile Gln Tyr Val Phe Gly Lys Pro Phe Ala  
 435 440 445  
 Thr Pro Thr Gly Tyr Arg Pro Gln Asp Arg Thr Val Ser Lys Ala Met  
 450 455 460  
 Ile Ala Tyr Trp Thr Asn Phe Ala Lys Thr Gly Asp Pro Asn Met Gly  
 465 470 475 480  
 Asp Ser Ala Val Pro Thr His Trp Glu Pro Tyr Thr Thr Glu Asn Ser  
 485 490 495  
 Gly Tyr Leu Glu Ile Thr Lys Lys Met<sup>25</sup> Gly Ser Ser Ser Met Lys Arg  
 500 505 510

Ser Leu Arg Thr Asn Phe Leu Arg Tyr Trp Thr Leu Thr Tyr Leu Ala  
 515 520 525  
 Leu Pro Thr Val Thr Asp Gln Glu Ala Thr Pro Val Pro Pro Thr Gly  
 530 535 540  
 Asp Ser Glu Ala Thr Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Glu Thr Ala  
 545 550 555 560  
 Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr  
 565 570 575  
 Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala  
 580 585 590  
 Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro  
 595 600 605  
 Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly  
 610 615 620  
 Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro  
 625 630 635 640  
 Pro Thr Gly Asp Ala Gly Pro Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser  
 645 650 655  
 Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val  
 660 665 670  
 Thr Pro Thr Gly Asp Ser Glu Thr Ala Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp  
 675 680 685  
 Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Glu Ala Ala Pro  
 690 695 700  
 Val Pro Pro Thr Asp Asp Ser Lys Glu Ala Gln Met Pro Ala Val Ile  
 705 710 715 720  
 Arg Phe

## (2) SEQ ID NO: 4 INFORMACIJA:

## (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 535 aminorūgštys

(B) TIPAS: aminorūgštis

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

## (ii) MOLEKULĖS TIPAS: baltymas

(iii) HIPOTETINĖ: ne

## (vi) ORIGINALO ŠALTINIS:

(A) ORGANIZMAS: Homo sapiens

(F) AUDINIO TIPAS: pieno liauka

## (ix) YPATYBĖ:

(A) VARDAS/RAKTAS: Peptidas

(B) PADĖTIS: 1..535

(D) KITA INFORMACIJA: / žymė= Variantas\_A

## (xi) SEKOS ATVAIZDAVIMAS: SEQ ID NO: 4:

Ala Lys Leu Gly Ala Val Tyr Thr Glu Gly Gly Phe Val Glu Gly Val  
 1 5 36 10 15

Asn Lys Lys Leu Gly Leu Leu Gly Asp Ser Val Asp Ile Phe Lys Gly  
                   20                  25                  30  
 Ile Pro Phe Ala Ala Pro Thr Lys Ala Leu Glu Asn Pro Gln Pro His  
                   35                  40                  45  
 Pro Gly Trp Gln Gly Thr Leu Lys Ala Lys Asn Phe Lys Lys Arg Cys  
           50                  55                  60  
 Leu Gln Ala Thr Ile Thr Gln Asp Ser Thr Tyr Gly Asp Glu Asp Cys  
   65                  70                  75                  80  
 Leu Tyr Leu Asn Ile Trp Val Pro Gln Gly Arg Lys Gln Val Ser Arg  
                   85                  90                  95  
 Asp Leu Pro Val Met Ile Trp Ile Tyr Gly Gly Ala Phe Leu Met Gly  
                  100                 105                 110  
 Ser Gly His Gly Ala Asn Phe Leu Asn Asn Tyr Leu Tyr Asp Gly Glu  
           115                 120                 125  
 Glu Ile Ala Thr Arg Gly Asn Val Ile Val Val Thr Phe Asn Tyr Arg  
   130                 135                 140  
 Val Gly Pro Leu Gly Phe Leu Ser Thr Gly Asp Ala Asn Leu Pro Gly  
  145                 150                 155                 160  
 Asn Tyr Gly Leu Arg Asp Gln His Met Ala Ile Ala Trp Val Lys Arg  
                  165                 170                 175  
 Asn Ile Ala Ala Phe Gly Gly Asp Pro Asn Asn Ile Thr Leu Phe Gly  
                  180                 185                 190  
 Glu Ser Ala Gly Gly Ala Ser Val Ser Leu Gln Thr Leu Ser Pro Tyr  
           195                 200                 205  
 Asn Lys Gly Leu Ile Arg Arg Ala Ile Ser Gln Ser Gly Val Ala Leu  
   210                 215                 220  
 Ser Pro Trp Val Ile Gln Lys Asn Pro Leu Phe Trp Ala Lys Lys Val  
  225                 230                 235                 240  
 Ala Glu Lys Val Gly Cys Pro Val Gly Asp Ala Ala Arg Met Ala Gln  
                  245                 250                 255  
 Cys Leu Lys Val Thr Asp Pro Arg Ala Leu Thr Leu Ala Tyr Lys Val  
           260                 265                 270  
 Pro Leu Ala Gly Leu Glu Tyr Pro Met Leu His Tyr Val Gly Phe Val  
           275                 280                 285  
 Pro Val Ile Asp Gly Asp Phe Ile Pro Ala Asp Pro Ile Asn Leu Tyr  
   290                 295                 300  
 Ala Asn Ala Ala Asp Ile Asp Tyr Ile Ala Gly Thr Asn Asn Met Asp  
  305                 310                 315                 320  
 Gly His Ile Phe Ala Ser Ile Asp Met Pro Ala Ile Asn Lys Gly Asn  
                  325                 330                 335  
 Lys Lys Val Thr Glu Glu Asp Phe Tyr Lys Leu Val Ser Glu Phe Thr  
           340                 345                 350  
 Ile Thr Lys Gly Leu Arg Gly Ala Lys Thr Thr Phe Asp Val Tyr Thr  
           355                 360                 365  
 Glu Ser Trp Ala Gln Asp Pro Ser Gln Glu Asn Lys Lys Lys Thr Val  
   370                 375                 380

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

## (2) SEQ ID NO: 5 INFORMACIJA:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
  - (A) ILGIS: 546 aminorūgštys
  - (B) TIPAS: aminorūgštis
  - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: baltymas
- (iii) HIPOTETINĖ: ne
- (vi) ORIGINALO ŠALTINIS:
  - (A) ORGANIZMAS: Homo sapiens
  - (F) AUDINIO TIPAS: Pieno liauka
- (ix) YPATYBĖ:
  - (A) VARDAS/RAKTAS: Peptidas
  - (B) PADĖTIS: 1..546
  - (D) KITA INFORMACIJA: / žymė= Variantas\_B
- (xi) SEKOS ATVAIZDAVIMAS: SEQ ID NO: 5

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

Leu Tyr Leu Asn Ile Trp Val Pro Gln Gly Arg Lys Gln Val Ser Arg  
 85 90 95  
 Asp Leu Pro Val Met Ile Trp Ile Tyr Gly Gly Ala Phe Leu Met Gly  
 100 105 110  
 Ser Gly His Gly Ala Asn Phe Leu Asn Asn Tyr Leu Tyr Asp Gly Glu  
 115 120 125  
 Glu Ile Ala Thr Arg Gly Asn Val Ile Val Val Thr Phe Asn Tyr Arg  
 130 135 140  
 Val Gly Pro Leu Gly Phe Leu Ser Thr Gly Asp Ala Asn Leu Pro Gly  
 145 150 155 160  
 Asn Tyr Gly Leu Arg Asp Gln His Met Ala Ile Ala Trp Val Lys Arg  
 165 170 175  
 Asn Ile Ala Ala Phe Gly Gly Asp Pro Asn Asn Ile Thr Leu Phe Gly  
 180 185 190  
 Glu Ser Ala Gly Gly Ala Ser Val Ser Leu Gln Thr Leu Ser Pro Tyr  
 195 200 205  
 Asn Lys Gly Leu Ile Arg Arg Ala Ile Ser Gln Ser Gly Val Ala Leu  
 210 215 220  
 Ser Pro Trp Val Ile Gln Lys Asn Pro Leu Phe Trp Ala Lys Lys Val  
 225 230 235 240  
 Ala Glu Lys Val Gly Cys Pro Val Gly Asp Ala Ala Arg Met Ala Gln  
 245 250 255  
 Cys Leu Lys Val Thr Asp Pro Arg Ala Leu Thr Leu Ala Tyr Lys Val  
 260 265 270  
 Pro Leu Ala Gly Leu Glu Tyr Pro Met Leu His Tyr Val Gly Phe Val  
 275 280 285  
 Pro Val Ile Asp Gly Asp Phe Ile Pro Ala Asp Pro Ile Asn Leu Tyr  
 290 295 300  
 Ala Asn Ala Ala Asp Ile Asp Tyr Ile Ala Gly Thr Asn Asn Met Asp  
 305 310 315 320  
 Gly His Ile Phe Ala Ser Ile Asp Met Pro Ala Ile Asn Lys Gly Asn  
 325 330 335  
 Lys Lys Val Thr Glu Glu Asp Phe Tyr Lys Leu Val Ser Glu Phe Thr  
 340 345 350  
 Ile Thr Lys Gly Leu Arg Gly Ala Lys Thr Thr Phe Asp Val Tyr Thr  
 355 360 365  
 Glu Ser Trp Ala Gln Asp Pro Ser Gln Glu Asn Lys Lys Lys Thr Val  
 370 375 380  
 Val Asp Phe Glu Thr Asp Val Leu Phe Leu Val Pro Thr Glu Ile Ala  
 385 390 395 400  
 Leu Ala Gln His Arg Ala Asn Ala Lys Ser Ala Lys Thr Tyr Ala Tyr  
 405 410 415  
 Leu Phe Ser His Pro Ser Arg Met Pro Val Tyr Pro Lys Trp Val Gly  
 420 425 430  
 Ala Asp His Ala Asp Asp Ile Gln Tyr Val Phe Gly Lys Pro Phe Ala  
 435 440 445

Thr Pro Thr Gly Tyr Arg Pro Gln Asp Arg Thr Val Ser Lys Ala Met  
 450 455 460  
 Ile Ala Tyr Trp Thr Asn Phe Ala Lys Thr Gly Asp Pro Asn Met Gly  
 465 470 475 480  
 Asp Ser Ala Val Pro Thr His Trp Glu Pro Tyr Thr Thr Glu Asn Ser  
 485 490 495  
 Gly Tyr Leu Glu Ile Thr Lys Lys Met Gly Ser Ser Ser Met Lys Arg  
 500 505 510  
 Ser Leu Arg Thr Asn Phe Leu Arg Tyr Trp Thr Leu Thr Tyr Leu Ala  
 515 520 525  
 Leu Pro Thr Val Thr Asp Gln Lys Glu Ala Gln Met Pro Ala Val Ile  
 530 535 540  
 Arg Phe  
 545

## (2) SEQ ID NO: 6 INFORMACIJA:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
  - (A) ILGIS: 568 aminorūgštys
  - (B) TIPAS: aminorūgštis
  - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: baltymas
- (iii) HIPOTETINĖ: ne
- (vi) ORIGINALO ŠALTINIS:
  - (A) ORGANIZMAS: Homo sapiens
  - (F) AUDINIO TIPAS: Pieno liauka
- (ix) YPATYBĖ:
  - (A) VARDAS/RAKTAS: Peptidas
  - (B) PADĖTIS: 1..568
  - (D) KITA INFORMACIJA: /žymė= Variantas\_C
- (xi) SEKOS ATVAIZDAVIMAS: SEQ ID NO: 6

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

Glu Ile Ala Thr Arg Gly Asn Val Ile Val Val Thr Phe Asn Tyr Arg  
 130 135 140  
 Val Gly Pro Leu Gly Phe Leu Ser Thr Gly Asp Ala Asn Leu Pro Gly  
 145 150 155 160  
 Asn Tyr Gly Leu Arg Asp Gln His Met Ala Ile Ala Trp Val Lys Arg  
 165 170 175  
 Asn Ile Ala Ala Phe Gly Gly Asp Pro Asn Asn Ile Thr Leu Phe Gly  
 180 185 190  
 Glu Ser Ala Gly Gly Ala Ser Val Ser Leu Gln Thr Leu Ser Pro Tyr  
 195 200 205  
 Asn Lys Gly Leu Ile Arg Arg Ala Ile Ser Gln Ser Gly Val Ala Leu  
 210 215 220  
 Ser Pro Trp Val Ile Gln Lys Asn Pro Leu Phe Trp Ala Lys Lys Val  
 225 230 235 240  
 Ala Glu Lys Val Gly Cys Pro Val Gly Asp Ala Ala Arg Met Ala Gln  
 245 250 255  
 Cys Leu Lys Val Thr Asp Pro Arg Ala Leu Thr Leu Ala Tyr Lys Val  
 260 265 270  
 Pro Leu Ala Gly Leu Glu Tyr Pro Met Leu His Tyr Val Gly Phe Val  
 275 280 285  
 Pro Val Ile Asp Gly Asp Phe Ile Pro Ala Asp Pro Ile Asn Leu Tyr  
 290 295 300  
 Ala Asn Ala Ala Asp Ile Asp Tyr Ile Ala Gly Thr Asn Asn Met Asp  
 305 310 315 320  
 Gly His Ile Phe Ala Ser Ile Asp Met Pro Ala Ile Asn Lys Gly Asn  
 325 330 335  
 Lys Lys Val Thr Glu Glu Asp Phe Tyr Lys Leu Val Ser Glu Phe Thr  
 340 345 350  
 Ile Thr Lys Gly Leu Arg Gly Ala Lys Thr Thr Phe Asp Val Tyr Thr  
 355 360 365  
 Glu Ser Trp Ala Gln Asp Pro Ser Gln Glu Asn Lys Lys Lys Thr Val  
 370 375 380  
 Val Asp Phe Glu Thr Asp Val Leu Phe Leu Val Pro Thr Glu Ile Ala  
 385 390 395 400  
 Leu Ala Gln His Arg Ala Asn Ala Lys Ser Ala Lys Thr Tyr Ala Tyr  
 405 410 415  
 Leu Phe Ser His Pro Ser Arg Met Pro Val Tyr Pro Lys Trp Val Gly  
 420 425 430  
 Ala Asp His Ala Asp Asp Ile Gln Tyr Val Phe Gly Lys Pro Phe Ala  
 435 440 445  
 Thr Pro Thr Gly Tyr Arg Pro Gln Asp Arg Thr Val Ser Lys Ala Met  
 450 455 460  
 Ile Ala Tyr Trp Thr Asn Phe Ala Lys Thr Gly Asp Pro Asn Met Gly  
 465 470 475 480  
 Asp Ser Ala Val Pro Thr His Trp Glu Pro Tyr Thr Thr Glu Asn Ser  
 485 490 495

(2) SEQ ID NO: 7 INFORMACIJA:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
  - (A) ILGIS: 722 aminorūgštys
  - (B) TIPAS: aminorūgštis
  - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: baltymas
- (iii) HIPOTETINĖ: ne
- (vi) ORIGINALO ŠALTINIS:
  - (A) ORGANIZMAS: Homo sapiens
  - (F) AUDINIO TIPAS: Pieno liauka
- (ix) YPATYBĖ:
  - (A) VARDAS/RAKTAS: Peptidas
  - (B) PADĖTIS: 1 . . 722
  - (D) KITA INFORMACIJA: / žymė= Variantas\_N
- (xi) SEKOS ATVAIZDAVIMAS: SEQ ID NO: 7

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Lys | Leu | Gly | Ala | Val | Tyr | Thr | Glu | Gly | Gly | Phe | Val | Glu | Gly | Val |
| 1   |     |     | 5   |     |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Asn | Lys | Lys | Leu | Gly | Leu | Leu | Gly | Asp | Ser | Val | Asp | Ile | Phe | Lys | Gly |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Ile | Pro | Phe | Ala | Ala | Pro | Thr | Lys | Ala | Leu | Glu | Asn | Pro | Gln | Pro | His |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Pro | Gly | Trp | Gln | Gly | Thr | Leu | Lys | Ala | Lys | Asn | Phe | Lys | Lys | Arg | Cys |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Leu | Gln | Ala | Thr | Ile | Thr | Gln | Asp | Ser | Thr | Tyr | Gly | Asp | Glu | Asp | Cys |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Leu | Tyr | Leu | Asn | Ile | Trp | Val | Pro | Gln | Gly | Arg | Lys | Gln | Val | Ser | Arg |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Asp | Leu | Pro | Val | Met | Ile | Trp | Ile | Tyr | Gly | Gly | Ala | Phe | Leu | Met | Gly |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Ser | Gly | His | Gly | Ala | Asn | Phe | Leu | Asn | Asn | Tyr | Leu | Tyr | Asp | Gly | Glu |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Glu | Ile | Ala | Thr | Arg | Gly | Asn | Val | Ile | Val | Val | Thr | Phe | Asn | Tyr | Arg |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Val | Gly | Pro | Leu | Gly | Phe | Leu | Ser | Thr | Gly | Asp | Ala | Asn | Leu | Pro | Gly |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     | 42  | 155 |     |     |     |     | 160 |

Asn Tyr Gly Leu Arg Asp Gln His Met Ala Ile Ala Trp Val Lys Arg  
 165 170 175  
 Asn Ile Ala Ala Phe Gly Gly Asp Pro Asn Gln Ile Thr Leu Phe Gly  
 180 185 190  
 Glu Ser Ala Gly Gly Ala Ser Val Ser Leu Gln Thr Leu Ser Pro Tyr  
 195 200 205  
 Asn Lys Gly Leu Ile Arg Arg Ala Ile Ser Gln Ser Gly Val Ala Leu  
 210 215 220  
 Ser Pro Trp Val Ile Gln Lys Asn Pro Leu Phe Trp Ala Lys Lys Val  
 225 230 235 240  
 Ala Glu Lys Val Gly Cys Pro Val Gly Asp Ala Ala Arg Met Ala Gln  
 245 250 255  
 Cys Leu Lys Val Thr Asp Pro Arg Ala Leu Thr Leu Ala Tyr Lys Val  
 260 265 270  
 Pro Leu Ala Gly Leu Glu Tyr Pro Met Leu His Tyr Val Gly Phe Val  
 275 280 285  
 Pro Val Ile Asp Gly Asp Phe Ile Pro Ala Asp Pro Ile Asn Leu Tyr  
 290 295 300  
 Ala Asn Ala Ala Asp Ile Asp Tyr Ile Ala Gly Thr Asn Asn Met Asp  
 305 310 315 320  
 Gly His Ile Phe Ala Ser Ile Asp Met Pro Ala Ile Asn Lys Gly Asn  
 325 330 335  
 Lys Lys Val Thr Glu Glu Asp Phe Tyr Lys Leu Val Ser Glu Phe Thr  
 340 345 350  
 Ile Thr Lys Gly Leu Arg Gly Ala Lys Thr Thr Phe Asp Val Tyr Thr  
 355 360 365  
 Glu Ser Trp Ala Gln Asp Pro Ser Gln Glu Asn Lys Lys Lys Thr Val  
 370 375 380  
 Val Asp Phe Glu Thr Asp Val Leu Phe Leu Val Pro Thr Glu Ile Ala  
 385 390 395 400  
 Leu Ala Gln His Arg Ala Asn Ala Lys Ser Ala Lys Thr Tyr Ala Tyr  
 405 410 415  
 Leu Phe Ser His Pro Ser Arg Met Pro Val Tyr Pro Lys Trp Val Gly  
 420 425 430  
 Ala Asp His Ala Asp Asp Ile Gln Tyr Val Phe Gly Lys Pro Phe Ala  
 435 440 445  
 Thr Pro Thr Gly Tyr Arg Pro Gln Asp Arg Thr Val Ser Lys Ala Met  
 450 455 460  
 Ile Ala Tyr Trp Thr Asn Phe Ala Lys Thr Gly Asp Pro Asn Met Gly  
 465 470 475 480  
 Asp Ser Ala Val Pro Thr His Trp Glu Pro Tyr Thr Thr Glu Asn Ser  
 485 490 495  
 Gly Tyr Leu Glu Ile Thr Lys Lys Met Gly Ser Ser Ser Met Lys Arg  
 500 505 510  
 Ser Leu Arg Thr Asn Phe Leu Arg Tyr<sup>43</sup> Trp Thr Leu Thr Tyr Leu Ala  
 515 520 525

Leu Pro Thr Val Thr Asp Gln Glu Ala Thr Pro Val Pro Pro Thr Gly  
 530 535 540  
 Asp Ser Glu Ala Thr Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Glu Thr Ala  
 545 550 555 560  
 Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr  
 565 570 575  
 Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala  
 580 585 590  
 Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro  
 595 600 605  
 Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly  
 610 615 620  
 Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro  
 625 630 635 640  
 Pro Thr Gly Asp Ala Gly Pro Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser  
 645 650 655  
 Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val  
 660 665 670  
 Thr Pro Thr Gly Asp Ser Glu Thr Ala Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp  
 675 680 685  
 Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Glu Ala Ala Pro  
 690 695 700  
 Val Pro Pro Thr Asp Asp Ser Lys Glu Ala Gln Met Pro Ala Val Ile  
 705 710 715 720  
 Arg Phe

## (2) SEQ ID NO: 8 INFORMACIJA:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:
  - (A) ILGIS: 2184 bazių poros
  - (B) TIPAS: nukleino rūgštis
  - (C) SUSIVIJIMAS: dvigubas
  - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (genominė)
- (iii) HIPOTETINĖ: ne
- (iii) ANTIPRASMINĖ: ne
- (vi) ORIGINALO ŠALTINIS:
  - (A) ORGANIZMAS: Homo sapiens
  - (F) AUDINIO TIPAS: pieno liauka
- (ix) YPATYBĖ:
  - (A) VARDAS/RAKTAS: CDS
  - (B) PADĖTIS: 82 .. 2088
  - (D) KITA INFORMACIJA: /žymė= Variantas\_T
- (ix) YPATYBĖ:
  - (A) VARDAS/RAKTAS: subrendęs peptidas
  - (B) PADĖTIS: 151 .. 2085
- (ix) YPATYBĖ: 44
  - (A) VARDAS/RAKTAS: pasikartojimų sritis

- (B) PADĖTIS: 1756 .. 2052
- (ix) YPATYBĖ:
- (A) VARDAS/RAKTAS: pasikartojimo vienetą
- (B) PADĖTIS: 1756 .. 1788
- (ix) YPATYBĖ:
- (A) VARDAS/RAKTAS: pasikartojimo vienetą
- (B) PADĖTIS: 1789 .. 1821
- (ix) YPATYBĖ:
- (A) VARDAS/RAKTAS: pasikartojimo vienetą
- (B) PADĖTIS: 1822 .. 1854
- (ix) YPATYBĖ:
- (A) VARDAS/RAKTAS: pasikartojimo vienetą
- (B) PADĖTIS: 1855 .. 1887
- (ix) YPATYBĖ:
- (A) VARDAS/RAKTAS: pasikartojimo vienetą
- (B) PADĖTIS: 1888 .. 1920
- (ix) YPATYBĖ:
- (A) VARDAS/RAKTAS: pasikartojimo vienetą
- (B) PADĖTIS: 1921 .. 1953
- (ix) YPATYBĖ:
- (A) VARDAS/RAKTAS: pasikartojimo vienetą
- (B) PADĖTIS: 1954 .. 1986
- (ix) YPATYBĖ:
- (A) VARDAS/RAKTAS: pasikartojimo vienetą
- (B) PADĖTIS: 1987 .. 2019
- (ix) YPATYBĖ:
- (A) VARDAS/RAKTAS: pasikartojimo vienetą
- (B) PADĖTIS: 2020 .. 2052
- (xi) SEKOS ATVAIZDAVIMAS: SEQ ID NO: 8

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| ACCTTCTGTA TCAGTTAACT GTCAAGATGG AAGGAACAGC AGTCTCAAGA TAATGCAAAG | 60  |
| AGTTTATTCA TCCAGAGGCT G ATG CTC ACC ATG GGG CGC CTG CAA CTG GTT   | 111 |
| Met Leu Thr Met Gly Arg Leu Gln Leu Val                           |     |
| -23 -20 -15                                                       |     |
| GTG TTG GGC CTC ACC TGC TGC TGG GCA GTG GCG AGT GCC GCG AAG CTG   | 159 |
| Val Leu Gly Leu Thr Cys Cys Trp Ala Val Ala Ser Ala Ala Lys Leu   |     |
| -10 -5 1                                                          |     |
| GGC GCC GTG TAC ACA GAA GGT GGG TTC GTG GAA GGC GTC AAT AAG AAG   | 207 |
| Gly Ala Val Tyr Thr Glu Gly Gly Phe Val Glu Gly Val Asn Lys Lys   |     |
| 5 10 15                                                           |     |
| CTC GGC CTC CTG GGT GAC TCT GTG GAC ATC TTC AAG GGC ATC CCC TTC   | 255 |
| Leu Gly Leu Leu Gly Asp Ser Val Asp Ile Phe Lys Gly Ile Pro Phe   |     |
| 20 25 30 35                                                       |     |
| GCA GCT CCC ACC AAG GCC CTG GAA AAT CCT CAG CCA CAT CCT GGC TGG   | 303 |
| Ala Ala Pro Thr Lys Ala Leu Glu Asn Pro Gln Pro His Pro Gly Trp   |     |
| 40 45 50                                                          |     |
| CAA GGG ACC CTG AAG GCC AAG AAC TTC AAG AAG AGA TGC CTG CAG GCC   | 351 |
| Gln Gly Thr Leu Lys Ala Lys Asn Phe Lys Lys Arg Cys Leu Gln Ala   |     |
| 55 60 65                                                          |     |

## LT 4008 B

|                                                                                                                                                       |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ACC ATC ACC CAG GAC AGC ACC TAC GGG GAT GAA GAC TGC CTG TAC CTC<br>Thr Ile Thr Gln Asp Ser Thr Tyr Gly Asp Glu Asp Cys Leu Tyr Leu<br>70 75 80        | 399  |
| AAC ATT TGG GTG CCC CAG GGC AGG AAG CAA GTC TCC CGG GAC CTG CCC<br>Asn Ile Trp Val Pro Gln Gly Arg Lys Gln Val Ser Arg Asp Leu Pro<br>85 90 95        | 447  |
| GTT ATG ATC TGG ATC TAT GGA GGC GCC TTC CTC ATG GGG TCC GGC CAT<br>Val Met Ile Trp Ile Tyr Gly Gly Ala Phe Leu Met Gly Ser Gly His<br>100 105 110 115 | 495  |
| GGG GCC AAC TTC CTC AAC AAC TAC CTG TAT GAC GGC GAG GAG ATC GCC<br>Gly Ala Asn Phe Leu Asn Asn Tyr Leu Tyr Asp Gly Glu Glu Ile Ala<br>120 125 130     | 543  |
| ACA CGC GGA AAC GTC ATC GTG GTC ACC TTC AAC TAC CGT GTC GGC CCC<br>Thr Arg Gly Asn Val Ile Val Val Thr Phe Asn Tyr Arg Val Gly Pro<br>135 140 145     | 591  |
| CTT GGG TTC CTC AGC ACT GGG GAC GCC AAT CTG CCA GGT AAC TAT GGC<br>Leu Gly Phe Leu Ser Thr Gly Asp Ala Asn Leu Pro Gly Asn Tyr Gly<br>150 155 160     | 639  |
| CTT CGG GAT CAG CAC ATG GCC ATT GCT TGG GTG AAG AGG AAT ATC GCG<br>Leu Arg Asp Gln His Met Ala Ile Ala Trp Val Lys Arg Asn Ile Ala<br>165 170 175     | 687  |
| ACC TTC GGG GGG GAC CCC AAC AAC ATC ACG CTC TTC GGG GAG TCT GCT<br>Ala Phe Gly Gly Asp Pro Asn Asn Ile Thr Leu Phe Gly Glu Ser Ala<br>180 185 190 195 | 735  |
| AGA GGT GCC AGC GTC TCT CTG CAG ACC CTC TCC CCC TAC AAC AAG GGC<br>Gly Gly Ala Ser Val Ser Leu Gln Thr Leu Ser Pro Tyr Asn Lys Gly<br>200 205 210     | 783  |
| ATC ATC CGG CGA GCC ATC AGC CAG AGC GGC GTG GCC CTG AGT CCC TGG<br>Leu Ile Arg Arg Ala Ile Ser Gln Ser Gly Val Ala Leu Ser Pro Trp<br>215 220 225     | 831  |
| ATC ATC CAG AAA AAC CCA CTC TTC TGG GCC AAA AAG GTG GCT GAG AAG<br>Val Ile Gln Lys Asn Pro Leu Phe Trp Ala Lys Lys Val Ala Glu Lys<br>230 235 240     | 879  |
| ATG GGT TGC CCT GTG GGT GAT GCC GCC AGG ATG GCC CAG TGT CTG AAG<br>Val Gly Cys Pro Val Gly Asp Ala Ala Arg Met Ala Gln Cys Leu Lys<br>245 250 255     | 927  |
| ATT ACT GAT CCC CGA GCC CTG ACG CTG GCC TAT AAG GTG CCG CTG GCA<br>Val Thr Asp Pro Arg Ala Leu Thr Leu Ala Tyr Lys Val Pro Leu Ala<br>260 265 270 275 | 975  |
| AGC CTG GAG TAC CCC ATG CTG CAC TAT GTG GGC TTC GTC CCT GTC ATT<br>Gly Leu Glu Tyr Pro Met Leu His Tyr Val Gly Phe Val Pro Val Ile<br>280 285 290     | 1023 |
| AAT GGA GAC TTC ATC CCC GCT GAC CCG ATC AAC CTG TAC GCC AAC GCC<br>Asp Gly Asp Phe Ile Pro Ala Asp Pro Ile Asn Leu Tyr Ala Asn Ala<br>295 300 305     | 1071 |
| ACC GAC ATC GAC TAT ATA GCA GGC ACC AAC AAC ATG GAC GGC CAC ATC<br>Ala Asp Ile Asp Tyr Ile Ala Gly Thr Asn Asn Met Asp Gly His Ile<br>310 315 320     | 1119 |
| TC GCC AGC ATC GAC ATG CCT GCC ATC AAC AAG GGC AAC AAG AAA GTC<br>he Ala Ser Ile Asp Met Pro Ala Ile Asn Lys Gly Asn Lys Lys Val<br>325 330 335       | 1167 |

|                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |      |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|
| ACG<br>Thr<br>340 | GAG<br>Glu        | GAG<br>Glu        | GAC<br>Asp        | TTC<br>Phe        | TAC<br>Tyr<br>345 | AAG<br>Lys        | CTG<br>Leu        | GTC<br>Val        | AGT<br>Ser        | GAG<br>Glu<br>350 | TTC<br>Phe        | ACA<br>Thr        | ATC<br>Ile        | ACC<br>Thr        | AAG<br>Lys<br>355 | 1215 |
| GGG<br>Gly        | CTC<br>Leu        | AGA<br>Arg        | GGC<br>Gly        | GCC<br>Ala<br>360 | AAG<br>Lys        | ACG<br>Thr        | ACC<br>Thr        | TTT<br>Phe        | GAT<br>Asp<br>365 | GTC<br>Val        | TAC<br>Tyr        | ACC<br>Thr        | GAG<br>Glu        | TCC<br>Ser<br>370 | TGG<br>Trp        | 1263 |
| GCC<br>Ala        | CAG<br>Gln        | GAC<br>Asp        | CCA<br>Pro<br>375 | TCC<br>Ser        | CAG<br>Gln        | GAG<br>Glu        | AAT<br>Asn        | AAG<br>Lys<br>380 | AAG<br>Lys        | AAG<br>Lys        | ACT<br>Thr        | GTG<br>Val        | GTG<br>Val<br>385 | GAC<br>Asp        | TTT<br>Phe        | 1311 |
| GAG<br>Glu        | ACC<br>Thr        | GAT<br>Asp<br>390 | GTC<br>Val        | CTC<br>Leu        | TTC<br>Phe        | CTG<br>Leu        | GTG<br>Val<br>395 | CCC<br>Pro        | ACC<br>Thr        | GAG<br>Glu        | ATT<br>Ile        | GCC<br>Ala<br>400 | CTA<br>Leu        | GCC<br>Ala        | CAG<br>Gln        | 1359 |
| CAC<br>His        | AGA<br>Arg<br>405 | GCC<br>Ala        | AAT<br>Asn        | GCC<br>Ala        | AAG<br>Lys        | AGT<br>Ser<br>410 | GCC<br>Ala        | AAG<br>Lys        | ACC<br>Thr        | TAC<br>Tyr        | GCC<br>Ala<br>415 | TAC<br>Tyr        | CTG<br>Leu        | TTT<br>Phe        | TCC<br>Ser        | 1407 |
| CAT<br>His<br>420 | CCC<br>Pro        | TCT<br>Ser        | CGG<br>Arg        | ATG<br>Met        | CCC<br>Pro<br>425 | GTC<br>Val        | TAC<br>Tyr        | CCC<br>Pro        | AAA<br>Lys        | TGG<br>Trp<br>430 | GTG<br>Val        | GGG<br>Gly        | GCC<br>Ala        | GAC<br>Asp        | CAT<br>His<br>435 | 1455 |
| GCA<br>Ala        | GAT<br>Asp        | GAC<br>Asp        | ATT<br>Ile        | CAG<br>Gln<br>440 | TAC<br>Tyr        | GTT<br>Val        | TTC<br>Phe        | GGG<br>Gly        | AAG<br>Lys<br>445 | CCC<br>Pro        | TTC<br>Phe        | GCC<br>Ala        | ACC<br>Thr        | CCC<br>Pro<br>450 | ACG<br>Thr        | 1503 |
| GGC<br>Gly        | TAC<br>Tyr        | CGG<br>Arg        | CCC<br>Pro<br>455 | CAA<br>Gln        | GAC<br>Asp        | AGG<br>Arg        | ACA<br>Thr        | GTC<br>Val<br>460 | TCT<br>Ser        | AAG<br>Lys        | GCC<br>Ala        | ATG<br>Met        | ATC<br>Ile<br>465 | GCC<br>Ala        | TAC<br>Tyr        | 1551 |
| TGG<br>Trp        | ACC<br>Thr        | AAC<br>Asn<br>470 | TTT<br>Phe        | GCC<br>Ala        | AAA<br>Lys        | ACA<br>Thr        | GGG<br>Gly<br>475 | GAC<br>Asp        | CCC<br>Pro        | AAC<br>Asn        | ATG<br>Met        | GGC<br>Gly<br>480 | GAC<br>Asp        | TCG<br>Ser        | GCT<br>Ala        | 1599 |
| GTG<br>Val<br>485 | CCC<br>Pro        | ACA<br>Thr        | CAC<br>His        | TGG<br>Trp        | GAA<br>Glu        | CCC<br>Pro<br>490 | TAC<br>Tyr        | ACT<br>Thr        | ACG<br>Thr        | GAA<br>Glu        | AAC<br>Asn<br>495 | AGC<br>Ser        | GGC<br>Gly        | TAC<br>Tyr        | CTG<br>Leu        | 1647 |
| GAG<br>Glu<br>500 | ATC<br>Ile        | ACC<br>Thr        | AAG<br>Lys        | AAG<br>Lys        | ATG<br>Met<br>505 | GGC<br>Gly        | AGC<br>Ser        | AGC<br>Ser        | TCC<br>Ser        | ATG<br>Met<br>510 | AAG<br>Lys        | CGG<br>Arg        | AGC<br>Ser        | CTG<br>Leu        | AGA<br>Arg<br>515 | 1695 |
| ACC<br>Thr        | AAC<br>Asn        | TTC<br>Phe        | CTG<br>Leu        | CGC<br>Arg<br>520 | TAC<br>Tyr        | TGG<br>Trp        | ACC<br>Thr        | CTC<br>Leu        | ACC<br>Thr<br>525 | TAT<br>Tyr        | CTG<br>Leu        | GCG<br>Ala        | CTG<br>Leu        | CCC<br>Pro<br>530 | ACA<br>Thr        | 1743 |
| GTG<br>Val        | ACC<br>Thr        | GAC<br>Asp        | CAG<br>Gln<br>535 | GAG<br>Glu        | GCC<br>Ala        | ACC<br>Thr        | CCT<br>Pro        | GTG<br>Val<br>540 | CCC<br>Pro        | CCC<br>Pro        | ACA<br>Thr        | GGG<br>Gly        | GAC<br>Asp<br>545 | TCC<br>Ser        | GAG<br>Glu        | 1791 |
| GCC<br>Ala        | ACT<br>Thr        | CCC<br>Pro<br>550 | GTG<br>Val        | CCC<br>Pro        | ACC<br>Thr        | GGT<br>Gly<br>555 | GAC<br>Asp        | TCC<br>Ser        | GAG<br>Glu        | ACC<br>Thr        | GCC<br>Ala<br>560 | CCC<br>Pro        | GTG<br>Val        | CCG<br>Pro        |                   | 1839 |
| CCC<br>Pro        | ACG<br>Thr        | GGT<br>Gly<br>565 | GAC<br>Asp        | TCC<br>Ser        | GGG<br>Gly<br>570 | GCC<br>Ala        | CCC<br>Pro        | CCC<br>Pro        | GTG<br>Val        | CCG<br>Pro        | CCC<br>Pro<br>575 | ACG<br>Thr        | GGT<br>Gly        | GAC<br>Asp        | TCC<br>Ser        | 1887 |
| GGG<br>Gly<br>580 | GCC<br>Ala        | CCC<br>Pro        | CCC<br>Pro        | GTG<br>Val        | CCG<br>Pro<br>585 | CCC<br>Pro        | ACG<br>Thr        | GGT<br>Gly        | GAC<br>Asp        | TCC<br>Ser<br>590 | GGG<br>Gly        | GCC<br>Ala        | CCC<br>Pro        | CCC<br>Pro        | GTG<br>Val<br>595 | 1935 |
| CCG<br>Pro        | CCC<br>Pro        | ACG<br>Thr        | GGT<br>Gly        | GAC<br>Asp<br>600 | TCC<br>Ser        | GGG<br>Gly        | GCC<br>Ala        | CCC<br>Pro        | CCC<br>Pro        | GTG<br>Val<br>605 | CCG<br>Pro        | CCC<br>Pro        | ACG<br>Thr        | GGT<br>Gly<br>610 | GAC<br>Asp        | 1983 |

TCC GGG GCC CCC CCC GTG CCG CCC ACG GGT GAC TCC GGG GCC CCC CCT 2031  
 Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro  
 615 620 625

GTG CCC CCC ACA GAT GAC TCC AAG GAA GCT CAG ATG CCT GCA GTC ATT 2079  
 Val Pro Pro Thr Asp Asp Ser Lys Glu Ala Gln Met Pro Ala Val Ile  
 630 635 640

AGG TTT TAGCGTCCCA TGAGCCTTGG TATCAAGAGG CCACAAGAGT GGGACCCCAG 2135  
 Arg Phe  
 645

GGGCTCCCCT CCCATCTTGA GCTCTTCCTG AATAAAGCCT CATACCCCT 2184

(2) SEQ ID NO: 9 INFORMACIJA:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKOS:

(A) ILGIS: 668 aminorūgštys

(B) TIPAS: aminorūgštis

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: baltymas

(xi) SEKOS ATVAIZDAVIMAS: SEQ ID NO: 9:

Met Leu Thr Met Gly Arg Leu Gln Leu Val Val Leu Gly Leu Thr Cys  
 -23 -20 -15 -10

Cys Trp Ala Val Ala Ser Ala Ala Lys Leu Gly Ala Val Tyr Thr Glu  
 -5 1 5

Gly Gly Phe Val Glu Gly Val Asn Lys Lys Leu Gly Leu Leu Gly Asp  
 10 15 20 25

Ser Val Asp Ile Phe Lys Gly Ile Pro Phe Ala Ala Pro Thr Lys Ala  
 30 35 40

Leu Glu Asn Pro Gln Pro His Pro Gly Trp Gln Gly Thr Leu Lys Ala  
 45 50 55

Lys Asn Phe Lys Lys Arg Cys Leu Gln Ala Thr Ile Thr Gln Asp Ser  
 60 65 70

Thr Tyr Gly Asp Glu Asp Cys Leu Tyr Leu Asn Ile Trp Val Pro Gln  
 75 80 85

Gly Arg Lys Gln Val Ser Arg Asp Leu Pro Val Met Ile Trp Ile Tyr  
 90 95 100 105

Gly Gly Ala Phe Leu Met Gly Ser Gly His Gly Ala Asn Phe Leu Asn  
 110 115 120

Asn Tyr Leu Tyr Asp Gly Glu Glu Ile Ala Thr Arg Gly Asn Val Ile  
 125 130 135

Val Val Thr Phe Asn Tyr Arg Val Gly Pro Leu Gly Phe Leu Ser Thr  
 140 145 150

Gly Asp Ala Asn Leu Pro Gly Asn Tyr Gly Leu Arg Asp Gln His Met  
 155 160 165

Ala Ile Ala Trp Val Lys Arg Asn Ile Ala Ala Phe Gly Gly Asp Pro  
 170 175 180 185

Asn Asn Ile Thr Leu Phe Gly Glu Ser Ala Gly Gly Ala Ser Val Ser  
 190 195 200

Leu Gln Thr Leu Ser Pro Tyr Asn Lys Gly Leu Ile Arg Arg Ala Ile  
 205 210 215  
 Ser Gln Ser Gly Val Ala Leu Ser Pro Trp Val Ile Gln Lys Asn Pro  
 220 225 230  
 Leu Phe Trp Ala Lys Lys Val Ala Glu Lys Val Gly Cys Pro Val Gly  
 235 240 245  
 Asp Ala Ala Arg Met Ala Gln Cys Leu Lys Val Thr Asp Pro Arg Ala  
 250 255 260 265  
 Leu Thr Leu Ala Tyr Lys Val Pro Leu Ala Gly Leu Glu Tyr Pro Met  
 270 275 280  
 Leu His Tyr Val Gly Phe Val Pro Val Ile Asp Gly Asp Phe Ile Pro  
 285 290 295  
 Ala Asp Pro Ile Asn Leu Tyr Ala Asn Ala Ala Asp Ile Asp Tyr Ile  
 300 305 310  
 Ala Gly Thr Asn Asn Met Asp Gly His Ile Phe Ala Ser Ile Asp Met  
 315 320 325  
 Pro Ala Ile Asn Lys Gly Asn Lys Lys Val Thr Glu Glu Asp Phe Tyr  
 330 335 340 345  
 Lys Leu Val Ser Glu Phe Thr Ile Thr Lys Gly Leu Arg Gly Ala Lys  
 350 355 360  
 Thr Thr Phe Asp Val Tyr Thr Glu Ser Trp Ala Gln Asp Pro Ser Gln  
 365 370 375  
 Glu Asn Lys Lys Lys Thr Val Val Asp Phe Glu Thr Asp Val Leu Phe  
 380 385 390  
 Leu Val Pro Thr Glu Ile Ala Leu Ala Gln His Arg Ala Asn Ala Lys  
 395 400 405  
 Ser Ala Lys Thr Tyr Ala Tyr Leu Phe Ser His Pro Ser Arg Met Pro  
 410 415 420 425  
 Val Tyr Pro Lys Trp Val Gly Ala Asp His Ala Asp Asp Ile Gln Tyr  
 430 435 440  
 Val Phe Gly Lys Pro Phe Ala Thr Pro Thr Gly Tyr Arg Pro Gln Asp  
 445 450 455  
 Arg Thr Val Ser Lys Ala Met Ile Ala Tyr Trp Thr Asn Phe Ala Lys  
 460 465 470  
 Thr Gly Asp Pro Asn Met Gly Asp Ser Ala Val Pro Thr His Trp Glu  
 475 480 485  
 Pro Tyr Thr Thr Glu Asn Ser Gly Tyr Leu Glu Ile Thr Lys Lys Met  
 490 495 500 505  
 Gly Ser Ser Ser Met Lys Arg Ser Leu Arg Thr Asn Phe Leu Arg Tyr  
 510 515 520  
 Trp Thr Leu Thr Tyr Leu Ala Leu Pro Thr Val Thr Asp Gln Glu Ala  
 525 530 535  
 Thr Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Glu Ala Thr Pro Val Pro Pro  
 540 545 550  
 Thr Gly Asp Ser Glu Thr Ala Pro Val Pro<sup>49</sup> Pro Thr Gly Asp Ser Gly  
 555 560 565

Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro  
570 575 580 585

Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser  
590 595 600

Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val  
605 610 615

Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Asp Asp  
620 625 630

Ser Lys Glu Ala Gln Met Pro Ala Val Ile Arg Phe  
635 640 645

## APIBRĖŽTIS

1. Nukleino rūgšties molekulė, koduojanti polipeptidą, kuris yra tulžies druskos stimuliuojamos lipazės (BSSL) variantas, trumpesnis negu 722 aminorūgštys, ir minėtasis BSSL variantas yra SEQ ID NO 3 aminorūgščių sekos dalis, pažymėta 536-722 liekanomis.
2. Nukleino rūgšties molekulė pagal 1 punktą b e s i s k i r i a n t i tuo, kad jos koduojamas minėtasis BSSL variantas turi C-gale fenilalanino liekaną.
3. Nukleino rūgšties molekulė pagal 1 arba 2 punktus b e s i s k i r i a n t i tuo, kad jos koduojamas minėtasis BSSL variantas C-gale turi Gln-Met-Pro seką.
4. Nukleino rūgšties molekulė pagal bet kurį iš 1-3 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad jos koduojamas minėtasis BSSL variantas C-gale turi aminorūgščių seką, kuri sekoje SEQ ID NO 3 pažymėta 712-722 liekanomis.
5. Nukleino rūgšties molekulė pagal bet kurį iš 1-4 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad jos koduojamas minėtasis BSSL variantas turi mažiau negu 16 pasikartojimų vienetų.
6. Nukleino rūgšties molekulė pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji koduoja polipeptidą, kurio aminorūgščių seka turi bent 90% homologiją su aminorūgščių seka, sekų apraše parodyta kaip sekos SEQ ID NO 5,6 arba 9.
7. Nukleino rūgšties molekulė pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji koduoja polipeptidą, kuris turi aminorūgščių seką, sekų apraše parodytą kaip sekos SEQ ID NO 5,6 arba 9.
8. Nukleino rūgšties molekulė, koduojanti polipeptidą, kurio aminorūgščių seka turi bent 90% homologiją su aminorūgščių seka, kuri sekų apraše parodyta kaip seka SEQ ID NO 7, išskyrus tas nukleino rūgšties molekules, kurios koduoja polipeptidus, turinčius asparagino liekaną 187 pozicijoje.
9. Nukleino rūgšties molekulė pagal 8 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji koduoja polipeptidą, kuris turi aminorūgščių seką, sekų apraše parodytą kaip seka SEQ ID NO 7.
10. Polipeptidas, sekų apraše parodytas kaip sekos SEQ ID NO 5, 6, 7, arba 9.
11. Polipeptidas, koduojamas nukleino rūgščių sekos, pagal bet kurį iš 1-9 punktų.
12. Polipeptidas pagal 10 arba 11 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad yra grynu pavidalu.
13. Hibridinis genas, turintis nukleino rūgšties molekulę, pagal bet kurį iš 1-9 punktų.
14. Galintis replikuotis ekspresijos vektorius, turintis savo sudėtyje hibridinį geną pagal 13 punktą.
15. Vektorius pagal 14 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis sukurtas jaučio papildomos viruso vektorių pS258, pS259 arba pS299 pagrindu.

16. Ląstelė, turinti hibridinį geną pagal 13 punktą.

17. Ląstelė pagal 16 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad kilusi iš pelių ląstelių linijos C127 arba *E.coli*.

18. Rekombinantinio polipeptido gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad (i) nukleino rūgšties molekulę, pagal bet kurį iš 1-9 punktų, įterpia į hibridinį geną, galintį replikuotis specifinėje ląstelėje-šeimininkėje arba organizme-šeimininke; (ii) gautą rekombinantinį hibridinį geną įveda į ląstelę-šeimininkę arba organizmą-šeimininką; (iii) gautąją ląstelę identifikuoja ir augina auginimo terpėje arba ant jos; arba gautą organizmą identifikuoja ir padaugina polipeptido ekspresijai gauti (iv) ir šį polipeptidą išskiria.

19. Būdas pagal 18 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad hibridinis genas yra jaučio papildomos viruso vektorių pS258, pS259 arba pS299 sudėtyje.

20. Ekspresijos sistema, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji turi hibridinį geną, kuris gali ekspresuoti ląstelėje-šeimininkėje arba organizme-šeimininke, priėmusiame minėtąjį hibridinį geną, todėl gaminamas rekombinantinis polipeptidas, kai ekspresuoja hibridinis genas, o minėtasis hibridinis genas gautas įterpiančiam nukleino rūgšties seką, pagal bet kurį iš 1-9 punktų, į geną, galintį tarpininkauti minėtojo hibridinio geno ekspresijai.

21. Transgeninių nežmogiškos kilmės žinduolių, galinčių ekspresuoti BSSL variantą, sukūrimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad (a) ekspresijos sistemą pagal 20 punktą, įveda į apvaisintą kiaušinėlių arba nežmogiškos kilmės žinduolio embriono ląstelę tam, kad įjungtų ekspresijos vektorių į žinduolio gemalinę liniją, ir (b) iš gautojo introdukuoto apvaisinto kiaušinėlio arba embriono išaugina subrendusią nežmogiškos kilmės žinduolio patelę.

22. Transgeninių nežmogiškos kilmės žinduolių, galinčių ekspresuoti BSSL variantą ir negalinčių ekspresuoti savo paties BSSL, sukūrimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad (a) sunaikina žinduolio sugebėjimus ekspresuoti savąją BSSL taip, kad žinduolio BSSL nepasireiškia, ir įveda ekspresijos sistemą pagal 20 punktą į žinduolio gemalinę liniją taip, kad BSSL variantas ekspresuoja žinduolyje; ir/arba (b) žinduolio BSSL geną arba jo dalį pakeičia ekspresijos sistema pagal 20 punktą.

23. Transgeninis nežmogiškos kilmės žinduolis, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis priima į savo genomą DNR seką pagal bet kurį iš 1-9 punktų.

24. Transgeninis nežmogiškos kilmės žinduolis pagal 23 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame DNR seka yra žinduolio gemalinėje linijoje.

25. Transgeninis nežmogiškos kilmės žinduolis pagal 23 arba 24 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame DNR seka yra žinduolio pieno baltymo gene.

26. Transgeninis nežmogiškos kilmės žinduolis pagal bet kurį iš 23-25 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis priklauso grupei, sudarytai iš pelių, žiurkių, triušių, avių, kiaulių ir galvijų.

**LT 4008 B**

27. Palikuonys, b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad jie yra transgeninių nežmogiškos kilmės žinduolių pagal bet kurį iš 23-26 punktų.
28. Pienas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad gautas iš transgeninių nežmogiškos kilmės žinduolių pagal bet kurį iš 23-27 punktų.
29. Mišinys kūdikiui, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jo sudėtyje yra pieno pagal 28 punktą.
30. Mišinys kūdikiui, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis turi polipeptidą pagal bet kurį iš 10-12 punktų.
31. Mišinio kūdikiui gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad į mišinį kūdikio mitybai papildomai deda polipeptidą pagal bet kurį iš 10-12 punktų.
32. Polipeptidas pagal bet kurį iš 10-12 punktų, skirtas panaudoti kaip priedas sudarant kūdikio mitybos mišinį.
33. Farmacinė kompozicija, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad turi polipeptidą pagal bet kurį iš 10-12 punktų.
34. Polipeptidas pagal bet kurį iš 10-12 punktų, skirtas panaudoti gydymui.
35. Polipeptido pagal bet kurį iš 10-12 punktų panaudojimas vaistų, gydančių patologijas, susijusias su egzokrininiu kasos nepakankamumu, gamyboje.
36. Panaudojimas pagal 35 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad polipeptidą pagal 10-12 punktus naudoja vaistų, gydančių pūslės fibrozę, gamyboje.
37. Panaudojimas pagal 35 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad polipeptidą pagal 10-12 punktus naudoja vaistų, gydančių lėtinį pankreatitą, gamyboje.
38. Panaudojimas pagal 35 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad polipeptidą pagal 10-12 punktus naudoja vaistų, gydančių riebalų įsiurbimo sutrikimą, gamyboje.
39. Panaudojimas pagal 35 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad polipeptidą pagal 10-12 punktus naudoja vaistų, gydančių riebaluose tirpstančių vitaminų įsiurbimo sutrikimą, gamyboje.
40. Panaudojimas pagal 35 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad polipeptidą pagal 10-12 punktus naudoja vaistų, gydančių riebaluose tirpstančių vitaminų įsiurbimo sutrikimą dėl fiziologinių priežasčių, gamyboje.
41. Panaudojimas pagal 35 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad polipeptidą pagal 10-12 punktus naudoja vaistų, pagerinančių dietinių lipidų įsisavinimą, gamyboje.
42. Panaudojimas pagal 35 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad polipeptidą pagal 10-12 punktus naudoja vaistų, skirtų neišnešiotiems naujagimiams ir pagerinančių dietinių lipidų įsisavinimą, gamyboje.

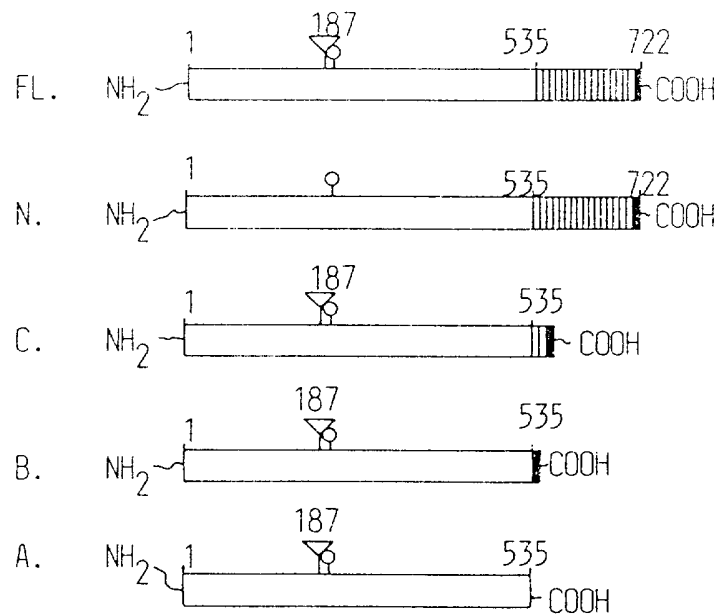
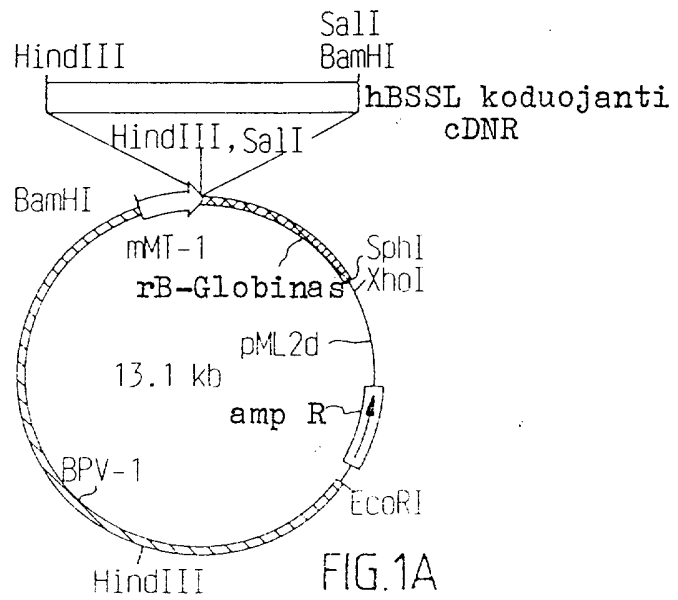


FIG.1B

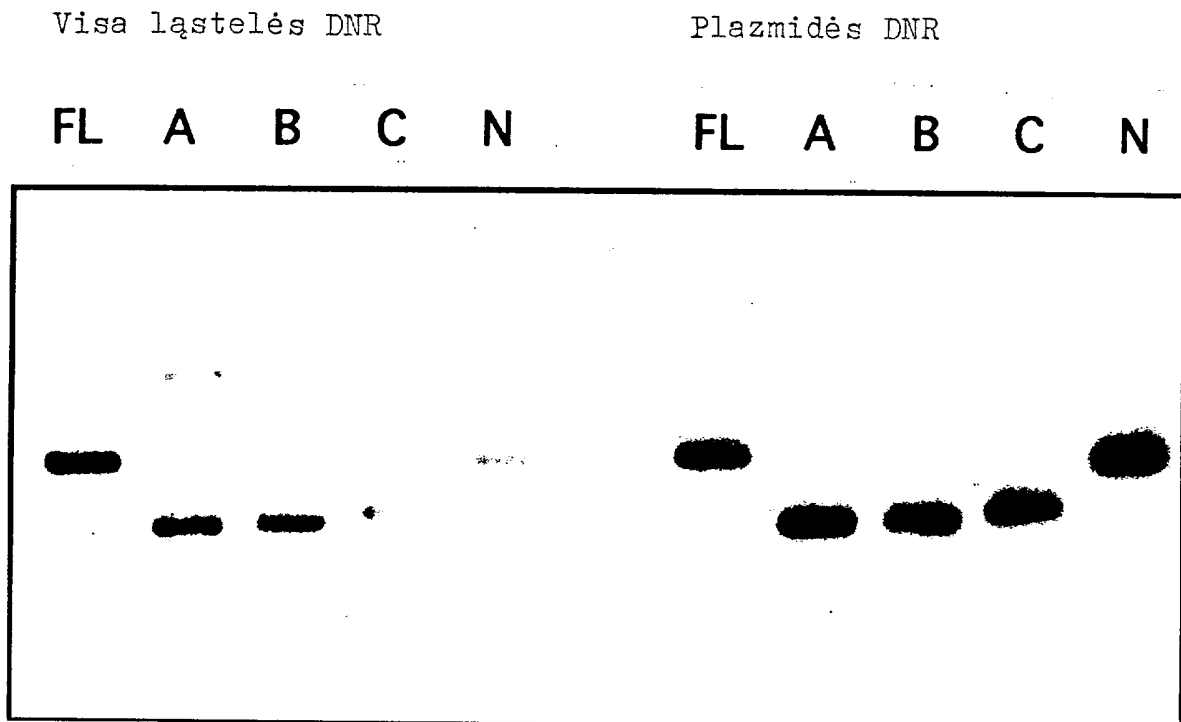


FIG.2

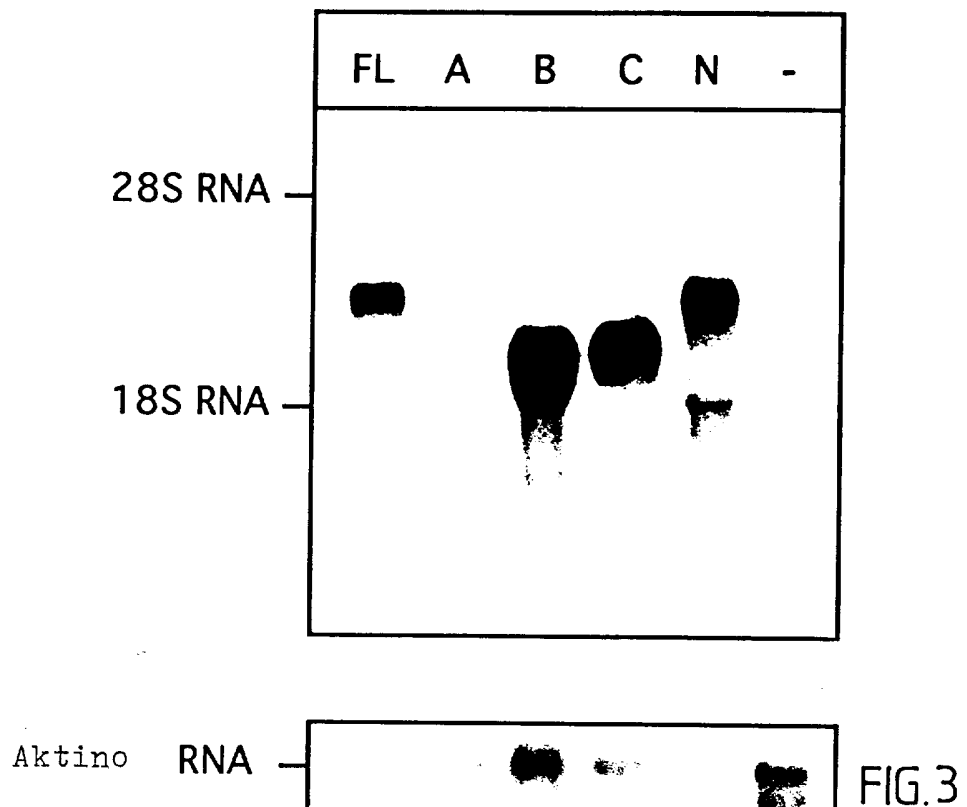
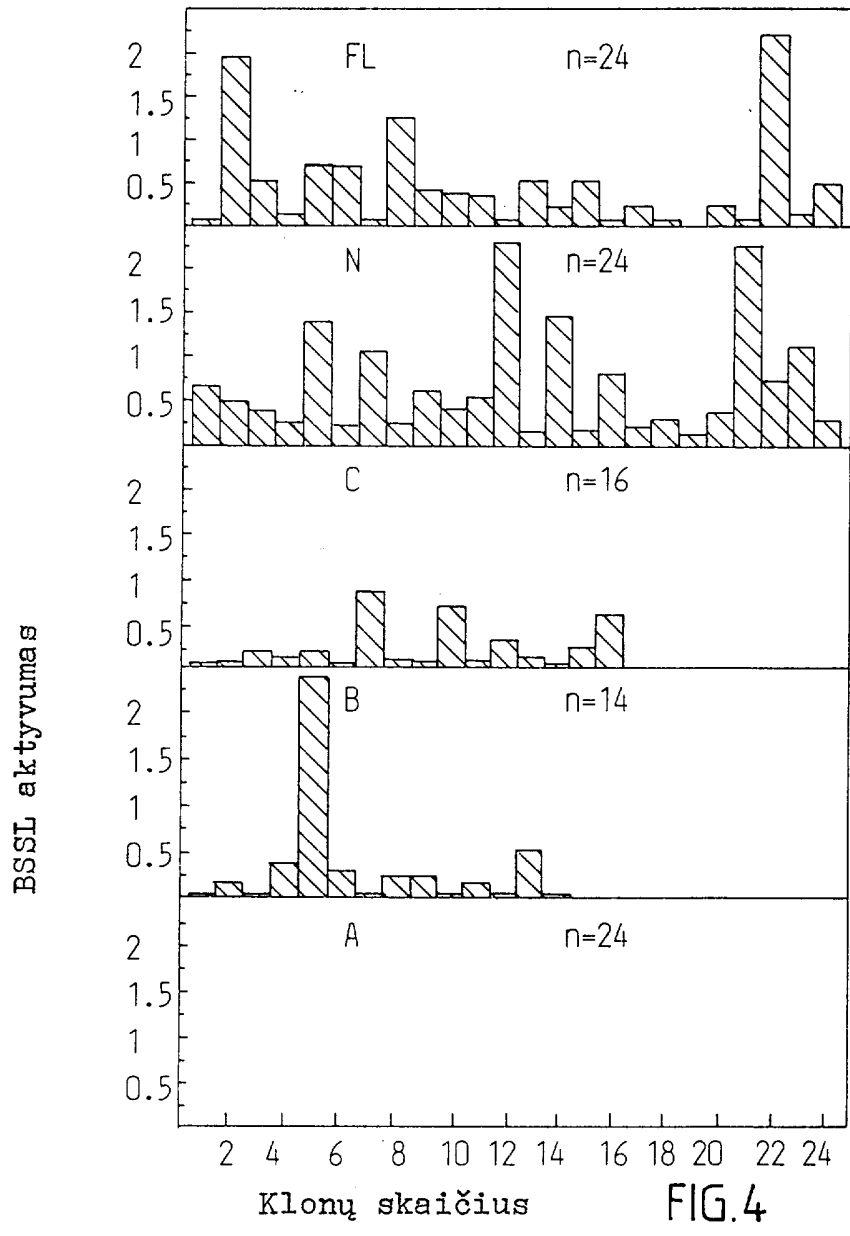


FIG.3



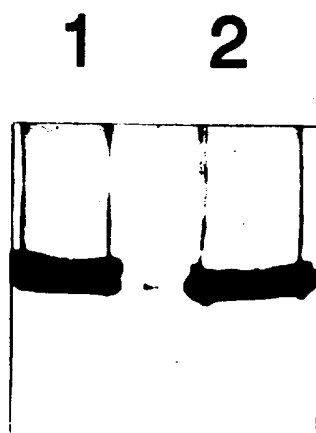
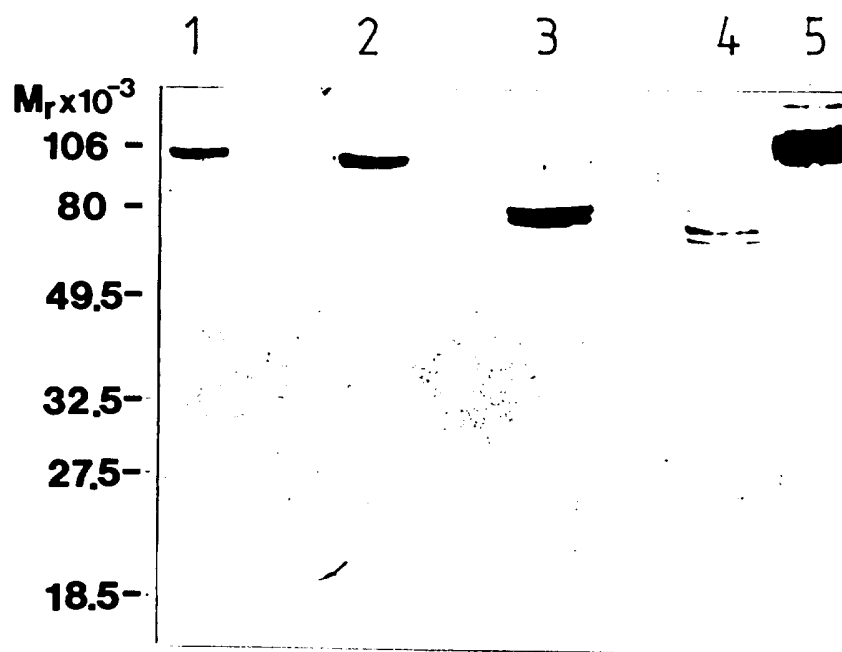
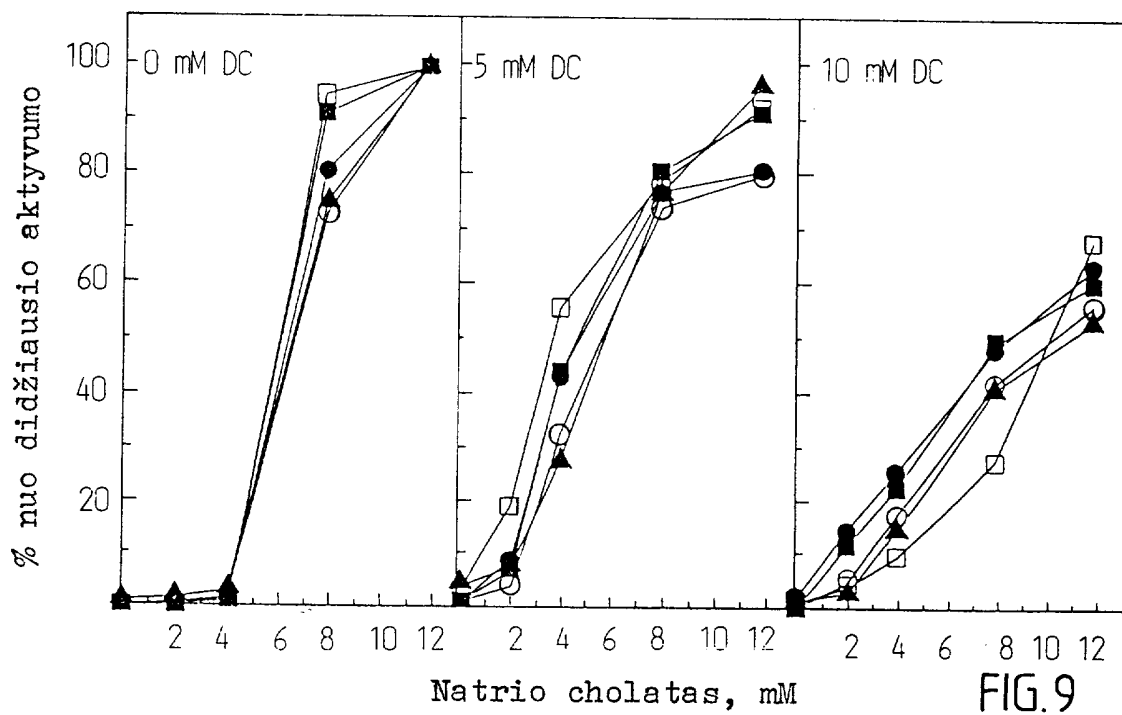
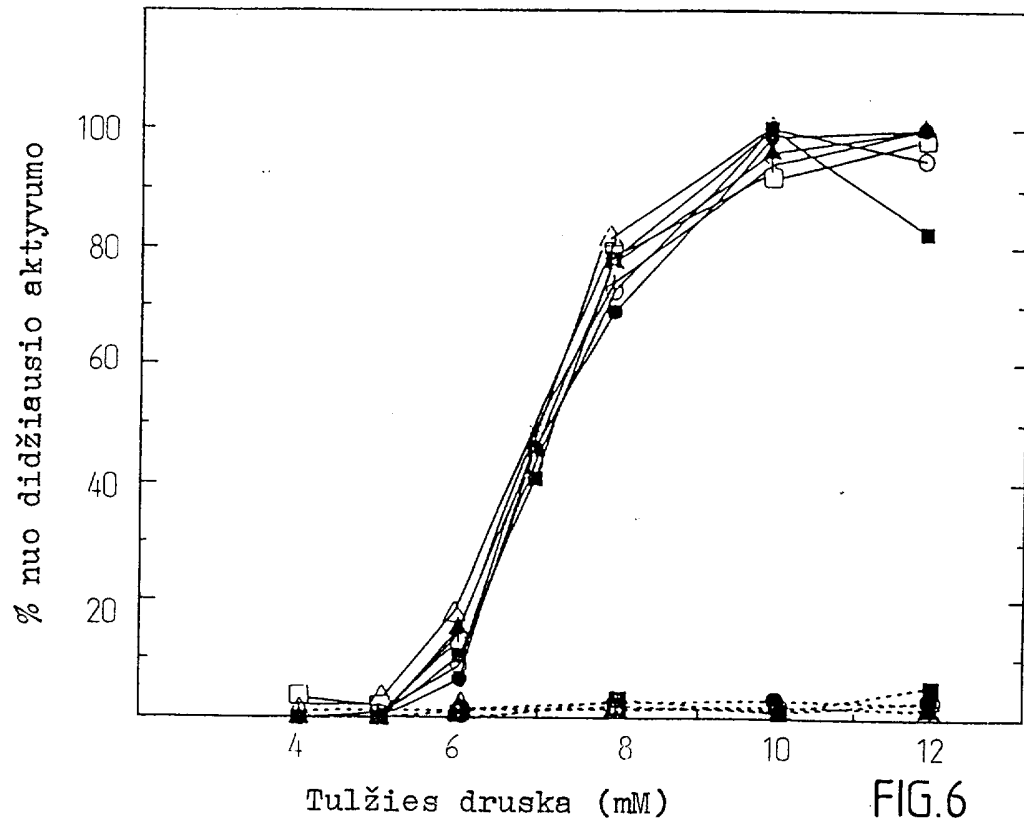


FIG.5



6/14

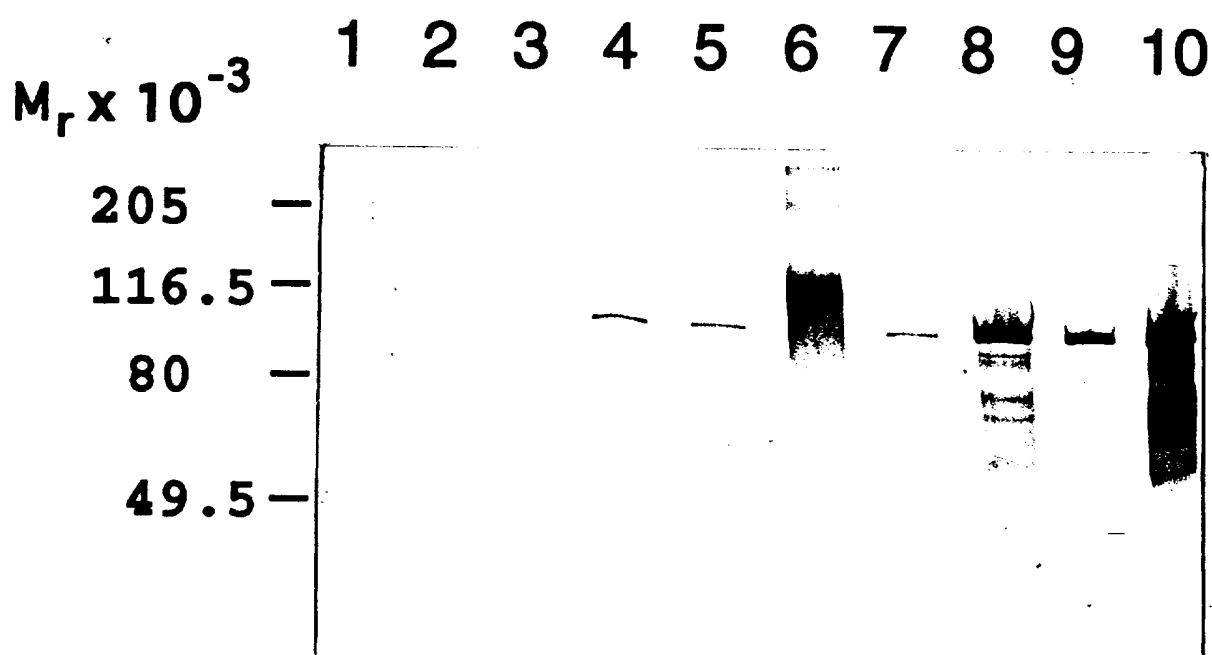
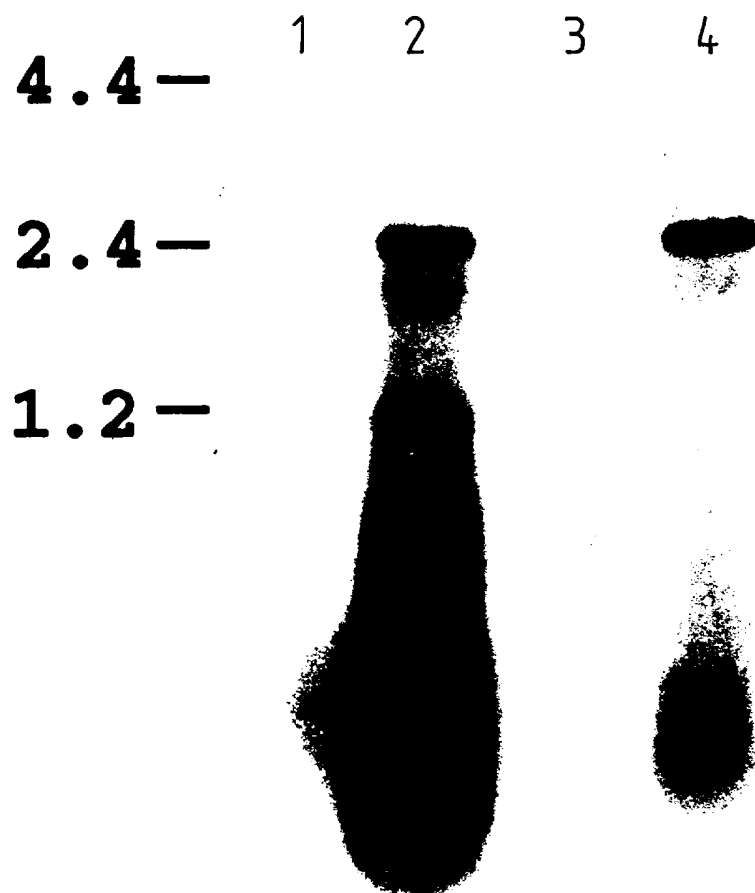


FIG. 7

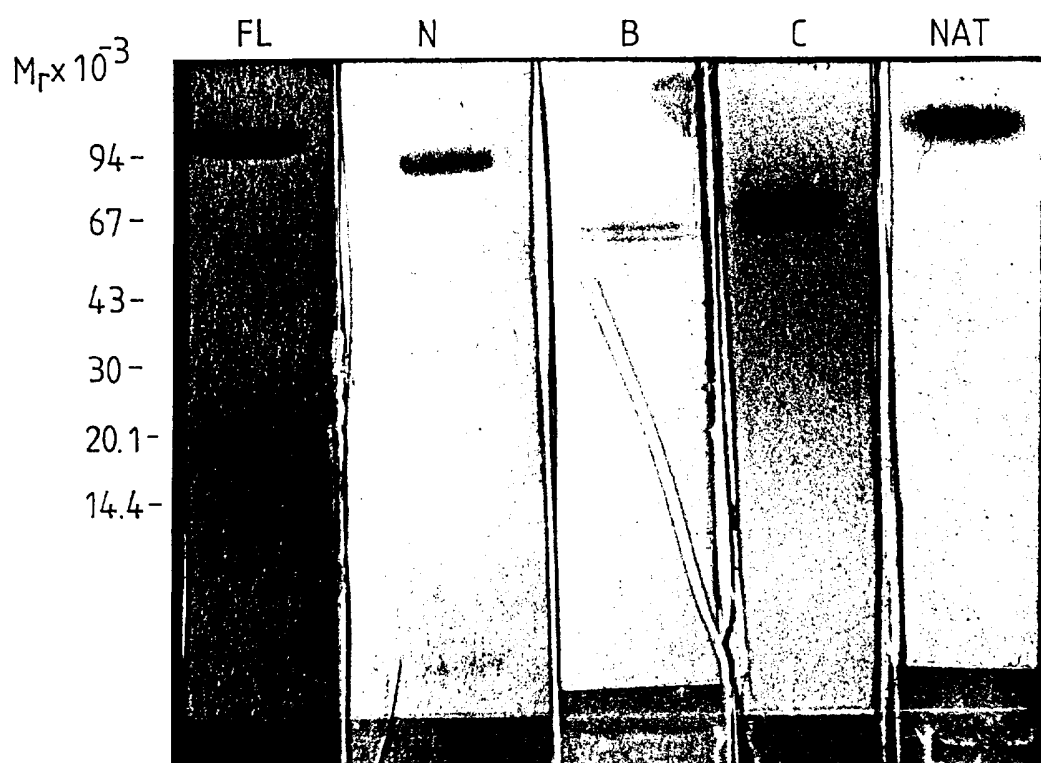
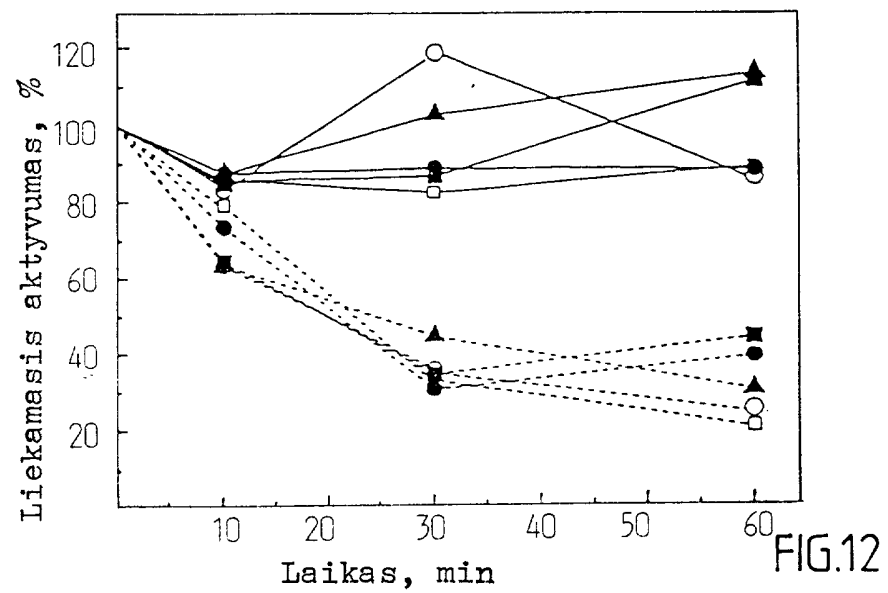
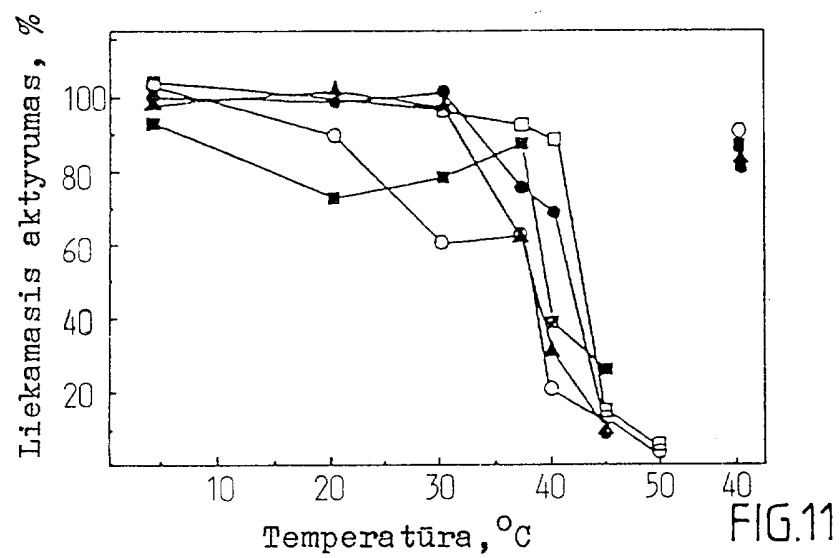
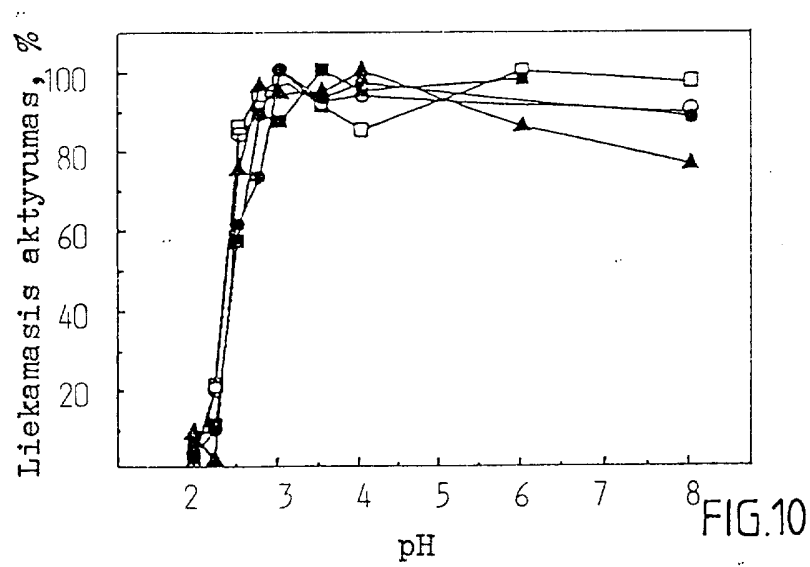


FIG. 8



9/14

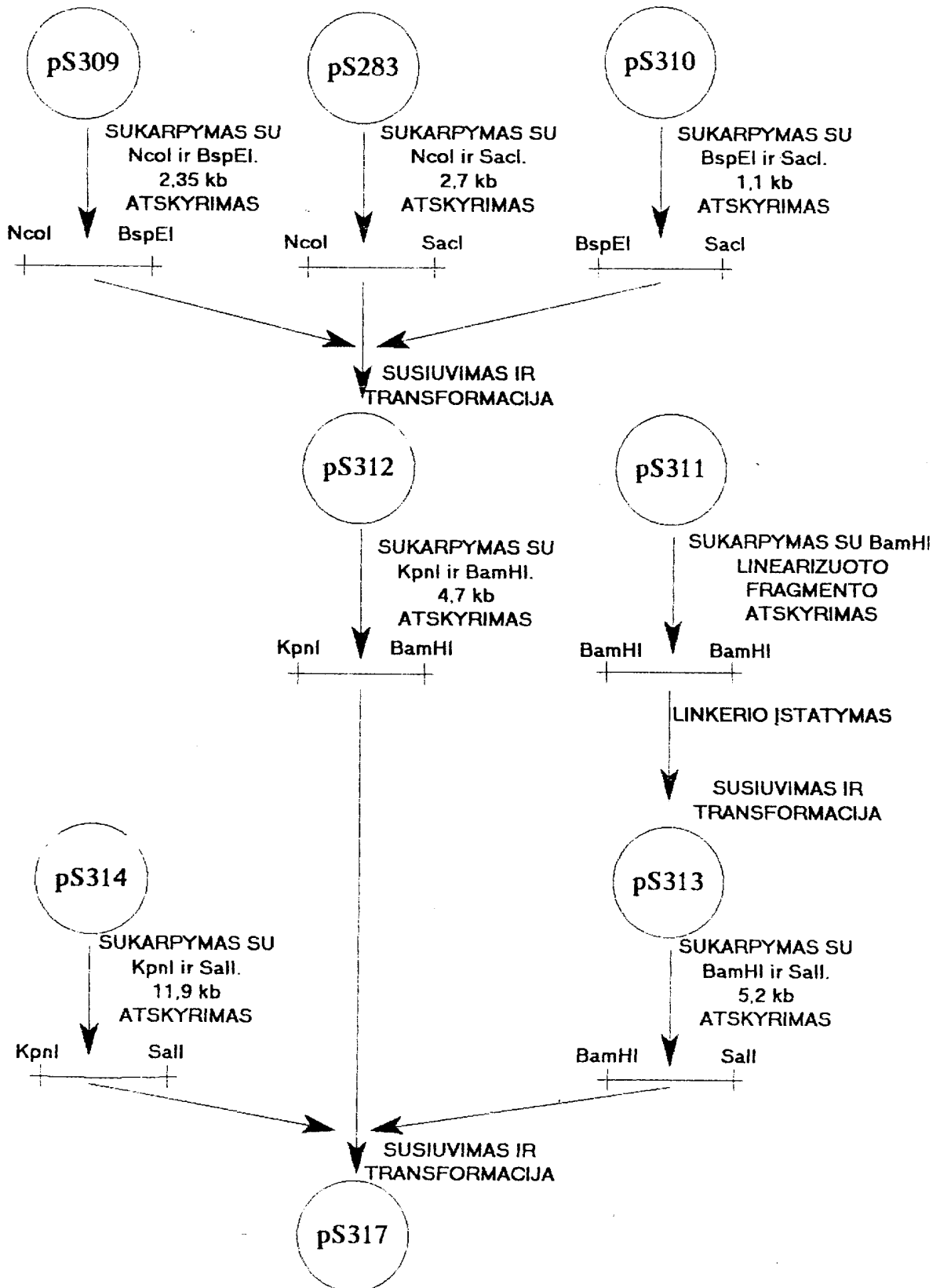


Fig. 13

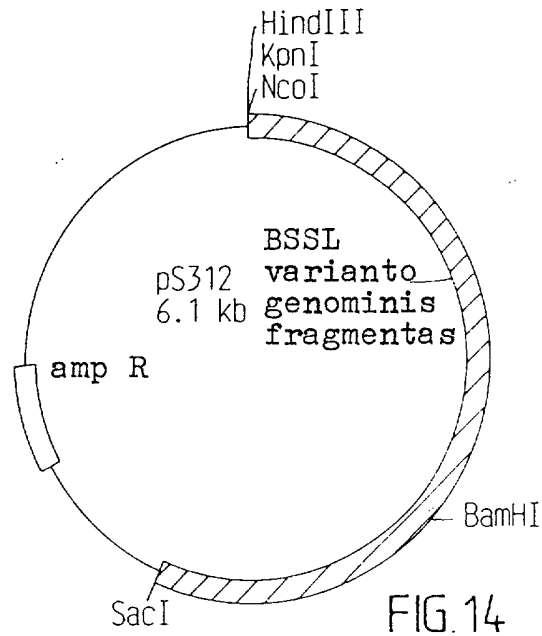


FIG. 14

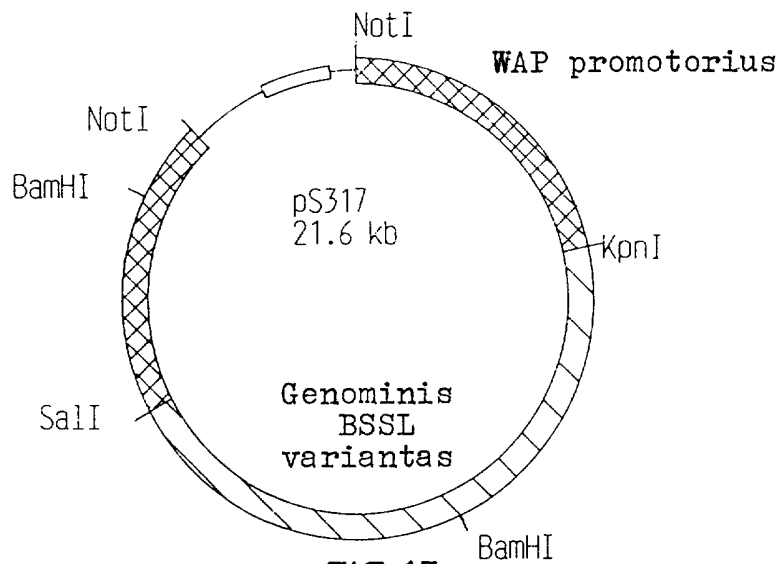


FIG. 15

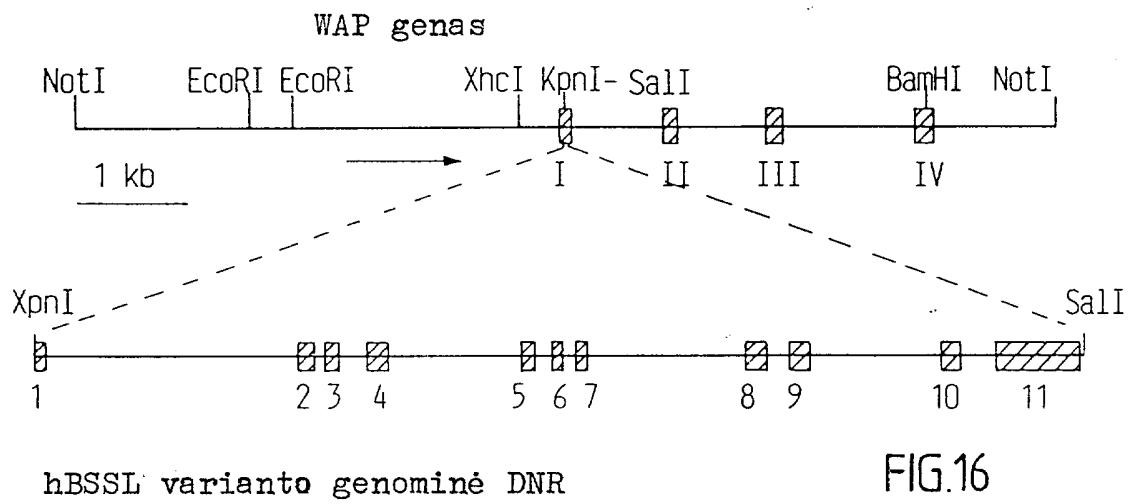


FIG.16

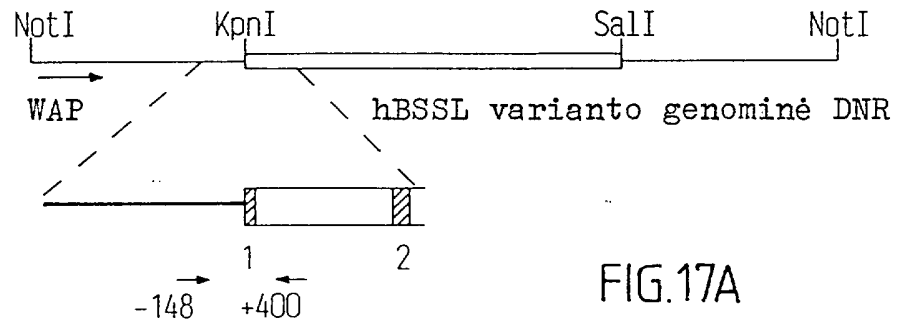


FIG.17A

| Pradmuo    | Seka ( 5' -3')           |
|------------|--------------------------|
| 5'-pradmuo | CTGTGTGGCAAGAAGGAAGTGTGT |
| 3'-pradmuo | CAACTCCTGACCTCAAGTGATC   |

FIG.17B

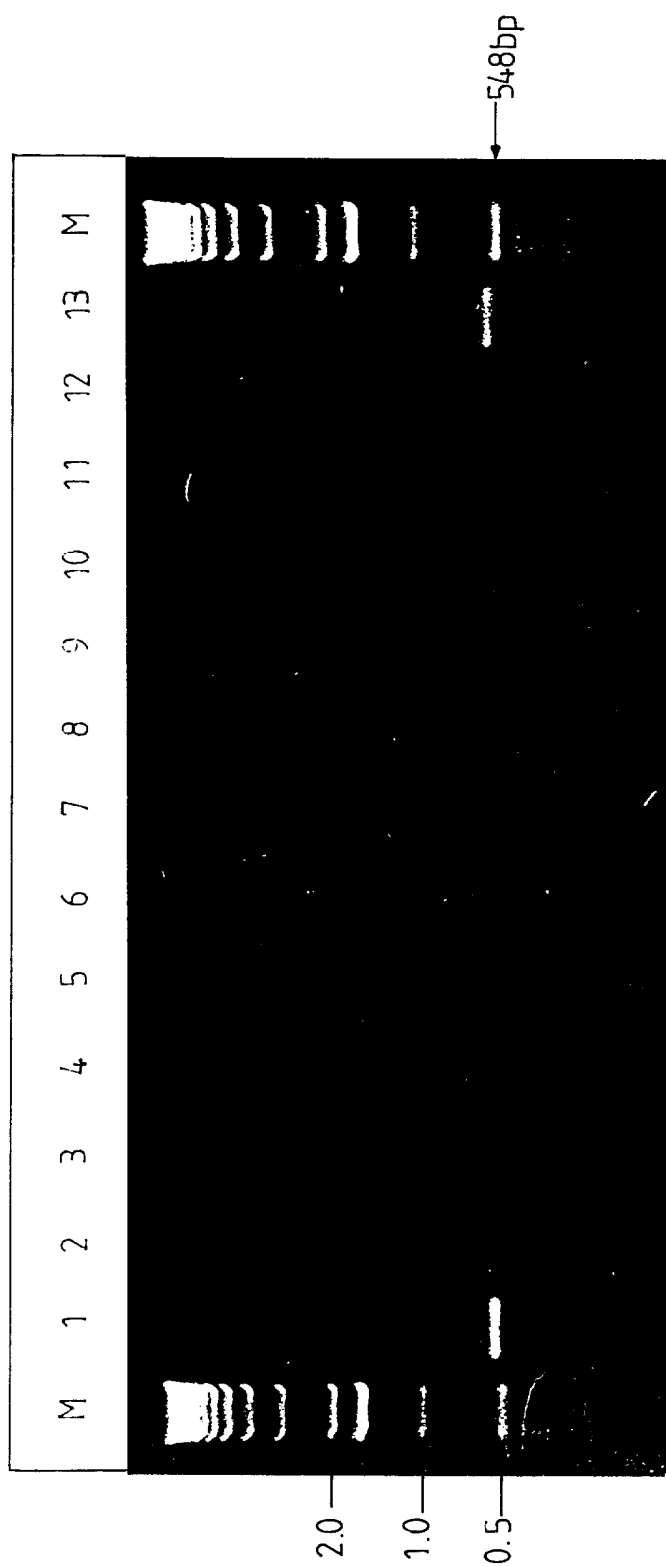


FIG.17C

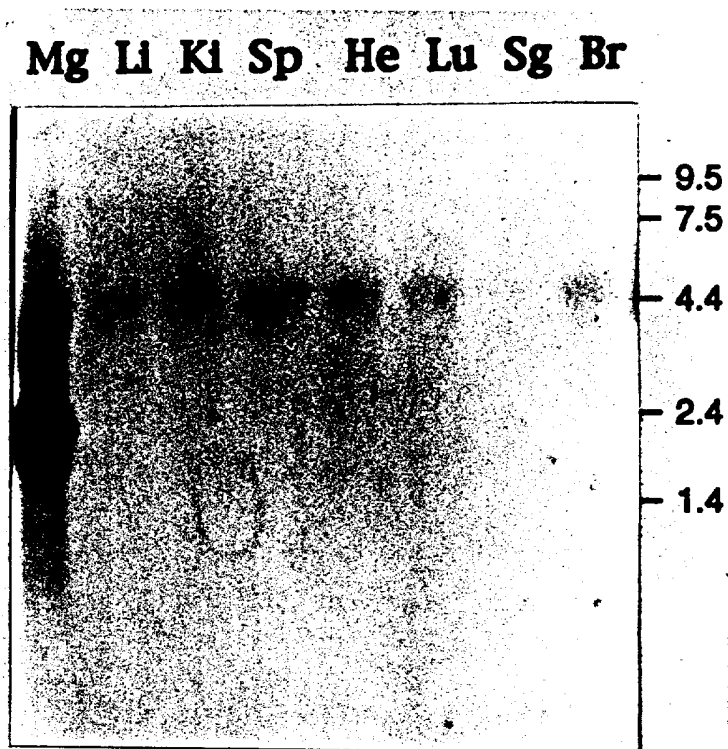


FIG.18

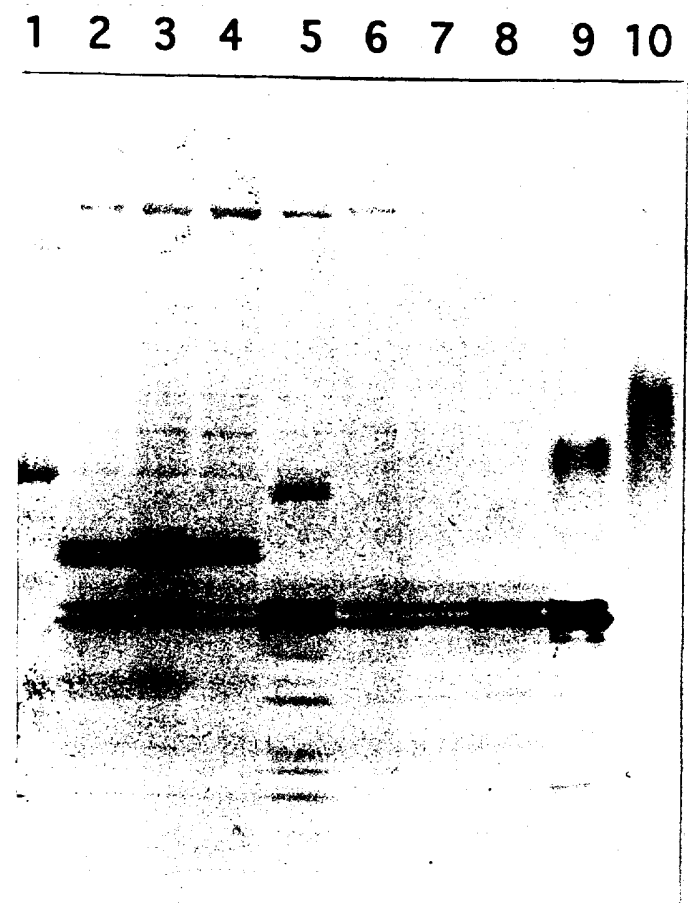


FIG.19