

PO101501

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

71:217/BE

A2

KIVONAT

Javított termelhetőségű FAP α -specifikus antitest

A találmány tárgya antitest-fehérje, amely specifikusan képes kötni fibroblaszt-aktivációs alfa-fehérjét (FAP α -t), amely egy sejtfelszíni, membránkött fehérje, az F19-epitópot hordozza, és tumoros stroma-fibroblasztokon expresszálódik. A találmány szerinti antitest-fehérjék F19-jelű, egérezetű monoklonális antitestből származó, komplementaritást meghatározó régiókkal és olyan vázrégió-módosításokkal rendelkeznek, amely javított termelhetőséget eredményez gazdasejtekben olyan kiméra antitestekhez viszonyítva, amelyek F19-ből származó variábilis régiókkal és idegen konstans régiókkal rendelkeznek.

A találmány tárgya az antitest-fehérjét és gyógyászatilag elfogadható hordozót tartalmazó gyógyszerkészítmény tumorok kezelésére vagy leképezésére szolgáló alkalmazásra, amely tumorok aktivált, stroma-fibroblasztokkal társultak. A találmány szerinti eljárás lehetővé teszi aktivált, stroma-fibroblasztok jelenlétének detektálását és leképezését sebgyógyulásban, gyulladásban vagy tumorban, humán páciensekben.

Továbbá előállítottak rekombináns FAP-fehérjét expresszáló sejtvonalakat és ezeknek megfelelő, FAP-nélküli kontrollokat anti-FAP monoklonális antitestek jellemzésére.

jellemző ábra: Φ



Javított termelhetőségű FAP α -specifikus antitest

A találmány olyan antitest-fehérjékre vonatkozik, amelyek specifikusan képesek kötni fibroblaszt-aktivációs alfa-fehérjét (FAP α). Szintén a találmány tárgyát képezi az antitestek alkalmazása diagnosztikai és terápiás célokra, valamint eljárások az antitestek előállítására.

Epitél rákbetegségek inváziós növekedése számos, jellegzetes celluláris és molekuláris változással társult a támasztást biztosító kötőszöveti vázban (stromában). Sok epitél rákbetegség-típus reaktív stromájának nagymértékben konzisztens molekuláris jellege indukálja a fibroblaszt aktivációs alfa-fehérjét (mostantól fogva FAP-nak jelöljük), amely reaktív kötőszöveti fibroblasztokból származó sejtfelszíni molekula, melyet eredetileg az F19-jelű monoklonális antitesttel azonosítottak [Garin-Chesa P. et al., (1990)]. Reaktív kötőszöveti fibroblasztok sejtfelszíni glikoproteinje potenciális antitest-célpont humán epitél rákbetegségekben [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 7235]. Mivel az FAP-antigén szelektíven expresszálódik egy sor epitél karcinóma stromájában, függetlenül a helytől és hisztológiai típustól, az FAP-t célzó koncepciót epitél rákbetegségek és bizonyos más állapotok leképezésére, diagnózisára és kezelésére fejlesztették ki. Ebből a célból termeltették az F19-jelű monoklonális antitestet, amely specifikusan képes kötődni FAP-hez, és amelyet leírtak az USP 5.059.523. és WO 93/05804. számú szabadalmi iratokban, melyeket teljes egészükben a kitanítás részének tekintünk.

Az egyik súlyos probléma, ami nem-humán eredetű antitestek



emberekben való in vivo alkalmazásakor felmerül, hogy gyorsan kifejlődik humán anti-nem-humán válasz, amely csökkenti az antitest hatékonyságát páciensekben és hátrányosan befolyásolja a folyamatos adagolást. Nem-humán antitestek humanizálása általában kétféleképpen érhető el: (1) nem-humán/humán kiméra antitestek előállításával, amelyekben a nem-humán variábilis régiók humán konstans régiókhoz vannak kapcsolva [Boulianne, G. L. et al, Nature 312, 643 (1984)], vagy (2) nem-humán variábilis régiókból átültetünk komplementaritást meghatározó régiókat (CDR) humán variábilis régiókba, és azután ezeket az „átalakított humán” variábilis régiókat hozzákapcsoljuk humán konstans régiókhoz [Riechmann, L. et al, Nature 332, 323 (1988)]. A kiméra antitestek, bár szignifikánsan jobbak, mint az egerből származó antitestek, még képesek anti-egér választ kiváltani emberekben [LoBuglio, A.F. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 4220 (1989)]. CDR-átültetett vagy átalakított humán antitestek nem tartalmaznak, vagy kevés olyan fehérjeszekvenciát tartalmaznak, amelyet egereredetű antitestből származónak lehet azonosítani. Bár CDR-átültetéssel humanizált antitest még képes némi immunreakciót, például anti-allotípusú vagy anti-idiotípusú választ kiváltani, amint az természetes humán antitestek esetén látható, a CDR-átültetett antitest szignifikánsan kisebb immunogenitással rendelkezik, mint az egerből származó antitest, ezáltal lehetővé teszi páciensek hosszabb kezelését.

Antitestek diagnosztikára, leképezésre és terápiára való nagybani alkalmazását továbbá súlyosan korlátozza nagy mennyiségben való termelhetőségük. Sok esetben natív, kiméra és/vagy



CDR-átültetett antitestek rekombináns expressziójának mértéke sejttenyészet-rendszerekben alacsony. A gyenge termelhetőséghez hozzájáruló faktor lehet a vezetőszekvencia kiválasztása, és a termelésre kiválasztott gazdasejt kiválasztása, valamint a konformáció nem megfelelő kialakulása és csökkent mértékű szekréción. A konformáció nem megfelelő kialakulása a nehéz és könnyű láncok tökéletlen szerveződéséhez, vagy transzportálásra nem megfelelő konformáció kialakulásához vezethet, amely akadályozza az egyik vagy mindkét lánc szekréción. Általában elfogadott tény, hogy az L-lánc biztosítja a szerveződött fehérje szekréción való képességét. Bizonyos esetekben több, sőt akár egyetlen szubsztitúció is eredményezheti antitestek fokozott termelhetőségét.

Diagnosztikai és terápiás célokból, betegségekkel specifikusan társult antigének specifikus immunológiai eszközökkel, emberekbe való célba juttatásának klinikai jelentősége miatt növekvő igény van olyan antitestekre, amelyekben kombinálódik az antigénspecifitás, az alacsony immunogenitás és a nagymértékű termelhetőség.

Ezért a találmány szerinti megoldás alapjául az a probléma szolgált, hogy elő lehet-e állítani olyan antitest-fehérjéket, amelyekben kombinálódik FAP specifikus kötésének tulajdonsága, alacsony immunogenitás emberekben és nagymértékű termelhetőség rekombináns rendszerekben.

A technikai probléma a találmány szabadalmi igénypontjaiban jellemzett, előnyös megvalósítási módja szerint oldható meg.

A találmány tárgyát képezik új antitest-fehérjék, amelyek az F19-jelű monoklonális antitest (ATCC nyilvántartási száma: HB



8269) komplementaritást meghatározó régióival rendelkeznek, amely új antitest-fehérjék specifikusan képesek kötődni fibroblaszt aktiváló fehérjéhez (FAP), az antitest vázrégió-módosításokkal rendelkezik, amely javított termelhetőséget eredményez gazdasejtekben, olyan kiméra antitesthez viszonyítva, amely F19 variábilis régiókkal és idegen konstans régiókkal rendelkezik.

A leírásban az „antitest-fehérje” kifejezésen monoklonális antitest antigénkötő specifitásával rendelkező fehérjét értünk.

„Monoklonális antitest komplementaritást meghatározó régió” kifejezésen a leírásban olyan aminosav-szekvenciákat értünk, amelyek specifikus antigénkötésben játszanak szerepet Kabat szerint [Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (5. kiadás, NIH Publication No. 91-3242., US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD), Chothia és Lesk által leírtakkal összhangban [J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)] .

A leírásban a „vázrégió-módosítások” kifejezésen egy vagy több aminosav cseréjét, delécióját vagy addícióját értjük az egyedi komplementaritást meghatározó régiókat körülvevő variábilis régiókban. A vázrégió-módosítások hatással lehetnek az antitest-fehérje immunogenitására, termelhetőségére vagy kötőspecifitására.

„Fibroblaszt aktivációs fehérje (FAP)” kifejezés fibroblaszt aktivációs alfa-fehérjét (FAP α) is jelent, amely a szerin-proteáz-géncsaládhoz tartozó, membránkötött glikoprotein (WO 97/34927 számú szabadalmi irat). Kibocsátott vagy szekretált formája nem ismeretes az FAP-nek. Az FAP-t az F19-jelű monoklonális anti-



testhez való kötődésével lehet jellemezni, amelyet a HB 8269. nyilvántartási számon, az ATCC-nél deponált hibridóma-sejtvonalból lehet kinyerni.

Egy antitest-fehérje „fibroblaszt aktivációs fehérjére specifikus kötődése” kifejezést a leírásban úgy definiáljuk, hogy milyen mértékben képes specifikusan felismerni és kötni FAP-t expresszáló humán sejteket. A találmány szerinti fehérjék kötési specifitását standard módszerekkel lehet meghatározni a kötési specifitás elemzése céljából, például a 6., 8. és 12. példában leírt módon.

A „kiméra antitest” kifejezés olyan antitest-fehérjére utal, amely a 17. és 18. ábrákon bemutatott könnyű és nehéz láncból származó variábilis régiókkal, és idegen konstans régiókkal rendelkezik. Az „idegen konstans régiók” kifejezésen olyan konstans régiókat értünk, amelyek eltérnek az F19 konstans régióitól. A találmány szerinti antitest-fehérje és kiméra antitestek összehasonlításához tudnunk kell, hogy ilyen kiméra antitestnek ugyanolyan konstans régiókat kell tartalmaznia, mint az antitest-fehérjének. Bemutatás és összehasonlítás céljára kizárólag a 19-22. ábrákon bemutatott, humán konstans nehéz és könnyű láncokat használjuk fel példaként.

A találmány szerinti antitest-fehérjék előállítására céljából meghatároztuk az F19-jelű, egérből származó antitest nehéz és könnyű láncát kódoló gének nukleinsavszekvenciáit, F19 hibridóma-sejtekből (ATCC nyilvántartási száma: HB 8269) extrahált RNS-ből.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a talál-



mány tárgyát olyan antitest-fehérjék képezik, amelyek F19-jelű (ATCC nyilvántartási száma: HB 8269) monoklonális antitestből származó, komplementaritást meghatározó régiókkal rendelkeznek, amely új antitest-fehérjék specifikusan képesek fibroblaszt aktivációs fehérjét (FAP) kötni, és olyan vázrégió-módosításokkal rendelkeznek, amely javított termelhetőséget eredményez gazdaszövetekben olyan kiméra antitestekhez viszonyítva, amelyek F19-ből származó variábilis régiókkal és idegen konstans régiókkal rendelkeznek, amely antitest-fehérje F19-jelű, egerből származó antitestből származik (ATCC nyilvántartási száma: HB 8269).

Humanizált FAP-specifikus antitest-fehérjék előállítása céljából létrehoztunk egy olyan kiméra-antitestet, amely F19 könnyű és nehéz láncának variábilis régióit és humán könnyű és nehéz láncból származó, konstans régiókat tartalmazott, megfelelő sorrendben. Kiméra eger/humán antitestek előállítása és termeltetése jól ismert [Boulianne et al., (1984), mint fent], melyet szemléltető módon bemutatunk az 1. és 2. példában.

A találmány szerinti antitest-fehérjék variábilis régiói tipikusan immunoglobulin konstans régiójának (F_c) legalább egy részletéhez vannak kapcsolva, tipikusan humán immunoglobulin konstans régiójához. Humán konstans régiót kódoló DNS-szekvenciákat jól ismert eljárások szerint lehet izolálni sokféle humán sejtéből, de előnyösen immortalizált B-sejtekből [lásd Kabat et al., mint fent, és WO 87/02671. számú szabadalmi iratot]. Ennélfogva a találmány szerinti antitest-fehérjék tartalmazhatják a teljes konstans régiót vagy annak egy részletét, amíg az FAP-antigénhez specifikus kötődést képesek mutatni. A



konstans régió típusának és terjedelmének kiválasztása attól függ, hogy effektor funkciók, például komplement-kötés vagy antitest-függő celluláris toxicitás kívánatos-e, valamint az antitest-fehérje kívánt farmakológiai tulajdonságaitól. A találmány szerinti antitest-fehérje tipikusan két könnyű lánc/nehéz lánc-párból álló tetramer, de lehet dimer is, azaz egy könnyű lánc/nehéz lánc párból áll, például az Fab- vagy Fv-fragmens.

Ennélfogva, a találmány előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát képezik a találmány szerinti antitest-fehérjék, amelyek könnyű lánc variábilis régióját és nehéz lánc variábilis régióját tartalmazzák, mindkettő humán konstans régióhoz kapcsolva. A könnyű lánc variábilis régiója humán kappa konstans régióhoz kapcsolódik, és a nehéz lánc variábilis régiója humán gamma-1 konstans régióhoz kapcsolódik. Szakember számára más humán konstans régiók is rendelkezésre állnak könnyű és nehéz láncok humanizálására.

Tehát a találmány másik előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány szerinti antitest-fehérjék humán kappa konstans régiót tartalmaznak.

A találmány másik előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány szerinti antitest-fehérjék humán gamma-1 konstans régiót tartalmaznak.

Egy adott „kiméra F19-antitest”-fehérje (cF19) a 17-22. ábrákon bemutatott könnyű és nehéz lánc variábilis és konstans régióiból áll. A cF19 specifikusan és nagy aviditással képes kötődni a FAP-antigénhez. A 2. példában bemutatottak szerint, cF19 expressziójának mértéke COS-sejtekben (afrikai zöld majom vesé-



jéből származó sejtek) alacsony, körülbelül 10-60 ng/ml tartományban van, amely legalább 10-szer alacsonyabb, mint a legtöbb más antitest.

A cF19-expresszió mértékének fokozása céljából az F19 V_L-régió vezetőszekvenciájában egy cserét végeztünk, prolint cseréltünk leucinra a 9. helyzetben. A a vezetőszekvenciában végrehajtott, egyetlen aminosav-csere legalább megduplázta a COS-sejtekben termelődött kiméra antitest mennyiségét. Ezen konkrét kiméra antitest COS-sejtekben való expresszálására a könnyű lánc alábbi mutáns vezetőszekvenciáját: MDSQAQVLMLLLLWVSGTCG, és a nehéz lánc alábbi vezetőszekvenciáját alkalmaztuk: MGWSWVFLFLLSGTAGVLS.

A találmányi leírásban alkalmazott, gazdasejtben való „javított termelhetőség” kifejezésen az expresszió mértékének és/vagy a tisztított antitest hozamának lényegi javulását értjük, ha a fentebb definiált, vázrégió-módosítások nélküli, kiméra antitest-expresszió mértékéhez és/vagy antitest-hozamához hasonlítjuk. Két konkrét példában bemutatjuk a javított termelhetőséget, COS-sejteket alkalmazó expressziós rendszerben (2. és 5. példában) és CHO-sejteket alkalmazó expressziós rendszerben (10. és 11. példában) szemlélítve.

Míg a vezetőszekvencia mutációja a kiméra F19-antitest expressziós hozamának csak duplázódásához vezet, a leírásban lényegi javuláson azt értjük, ha az expresszió mértéke és/vagy a tisztítás hozama legalább 10-es faktorral javul.

A találmány előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát olyan antitest-fehérjék képezik, amelyek azzal jellemez-



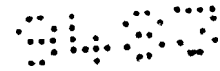
hetők, hogy expressziójuk mértéke nyers tápközegből vett mintákban, ELISA-val meghatározva és/vagy tisztított antitest hozamuk meghaladja vázrégió-módosítások nélküli kiméra antitestek expressziójának mértékét és/vagy tisztítási hozamukat, legalább 10-szeres faktorral.

A találmány előnyösebb megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát olyan antitest-fehérjék képezik, amelyek azzal jellemezhetők, hogy expressziójuk mértéke nyers tápközegből vett mintákban, ELISA-val meghatározva és/vagy tisztított antitest hozamuk meghaladja vázrégió-módosítások nélküli kiméra antitestek expressziójának mértékét és/vagy tisztítási hozamukat, legalább 20-szoros faktorral.

A találmány legelőnyösebb megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát olyan antitest-fehérjék képezik, amelyek azzal jellemezhetők, hogy expressziójuk mértéke nyers tápközegből vett mintákban, ELISA-val meghatározva és/vagy tisztított antitest hozamuk meghaladja vázrégió-módosítások nélküli kiméra antitestek expressziójának mértékét és/vagy tisztítási hozamukat, legalább 100-szoros faktorral.

A találmány szerinti, rekombináns antitest-fehérje javított termelhetőségét általában úgy lehet kimutatni eukarióta sejtekre, ahogyan COS és CHO (kínai hörcsög petefészkéből származó sejtek) eukarióta sejtekre kimutatjuk (5. és 11. példák). A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgya rekombináns antitest-fehérje, amelyet javított termelhetőség jellemez eukarióta sejtekben.

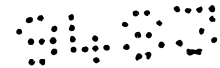
A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány



mány tárgyát antitest-fehérjék képezik, amelyekkel kapcsolatban az eukarióta sejtek kínai hörcsög petefészkéből származó sejtek (CHO-sejtek).

Váratlanul azt találtuk, hogy a könnyű lánc variábilis régió-
nak bizonyos vázrégió-módosításai javított termelhetőséget hatá-
roznak meg a találmány szerinti antitestekre. Előállítottuk a
könnyű lánc átalakított, variábilis régióinak három verzióját,
amelyek jelölése: A, B és C, melyeket az 1-6. ábrákon mutatunk be.

A könnyű lánc variábilis régiójának A, B és C verziói lényegi
javulást mutattak CHO-sejtekben (lásd 11. példát) való termelhe-
tőségben. Míg a könnyű lánc variábilis régiójának A és C verziói
csak két általánosan előforduló aminosavban különböznek a könnyű
lánc variábilis régiójának B-verziójától, további lényegi javu-
lást mutatnak a termelhetőségben. Legalább további 10-szeres kü-
lönbség van az antitest-szekrécio mértékében a humán, átalakí-
tott F19 könnyű lánc B-verziója és az A- vagy C-verzió között. A
humán, átalakított F19 könnyű lánc A és C verziói az aminosav-
szekvenciájukban csak két aminosavban különböznek, a 36. (Tyr
mutációja Phe-re) és 87. helyzetben (Tyr mutációja Asp-ra)
(Kabat szerinti nómenklatura). A könnyű lánc variábilis régiójá-
nak B-verzióját tartalmazó antitestek szekrécios kapacitására
kifejtett negatív hatás közvetett lehet, mivel ha a Tyr-Asp és
Tyr-Phe mutációkat egyedileg vagy együtt vizsgáljuk, aligha
okozhatják a fehérje nem megfelelő konformációját. Azért nem va-
lószerű, hogy ez az eset áll fenn, mivel az antigénkötést vizs-
gáló eljárások azt mutatják, hogy az F19 könnyű lánc B-verzióját
tartalmazó immunoglobulinok hasonló aviditással rendelkeznek



azokkal, amelyek F19 könnyű lánc A vagy C verzióját tartalmazák, ami alapján feltételezzük, hogy a konformáció kialakulása nagyjából hibátlan.

Úgy tűnik, hogy az átalakított humán F19 könnyű lánc B-verziója különösen felelős a szekréció mértékének csökkenéséért, az A és C verzióhoz viszonyítva.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát olyan antitest-fehérjék képezik, amelyekben a könnyű lánc régió a 87. Kabat-helyzetében lévő aminosav aszparagintól eltérő.

A találmány egy előnyösebb megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát olyan antitest-fehérjék képezik, amelyekben a könnyű lánc régió 87. Kabat-helyzetében lévő aminosav aromás vagy alifás aminosav.

A találmány legelőnyösebb megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát olyan antitest-fehérjék képezik, amelyekben a könnyű lánc régió a 87. Kabat-helyzetében lévő aminosav tirozin vagy fenilalanin.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát olyan antitest-fehérjék képezik, amelyekben a könnyű lánc régió a 36. Kabat-helyzetében lévő aminosav aromás aminosav.

A találmány egy különösen előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát specifikus antitest-fehérjék képezik, amelyeket egyedileg közölt, átalakított, könnyű és nehéz láncok variábilis régióiból állítunk elő.

A könnyű lánc variábilis régióinak A és C verziói különösen



jól megfelelnek a találmány szerinti megoldásban, kivételesen nagymértékű termelhetőségük miatt, miközben teljes mértékben megőrzik FAP-kötő specifitásukat és alacsony immunogenitással rendelkeznek. Ez különösen akkor helytálló, ha F19 variábilis régiójával és ugyanolyan konstans régióval rendelkező kiméra antitestekhez hasonlítjuk azokat, de akkor is, ha könnyű lánc B-verziójához hasonlítjuk.

Ennélfogva, a találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát olyan antitest-fehérjék képezik, amelyek a könnyű lánc variábilis régiójában a 2. számú szekvenciát tartalmazzák.

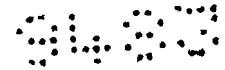
A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát olyan antitest-fehérjék képezik, amelyekben a könnyű lánc variábilis régióját az 1. számú nukleotidszekvencia kódolja.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát olyan antitest-fehérjék képezik, amelyek a könnyű lánc variábilis régiójában a 6. számú szekvenciát tartalmazzák.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát olyan antitest-fehérjék képezik, amelyekben a könnyű lánc variábilis régióját az 5. számú nukleotid-szekvencia kódolja.

Szintén a találmány tárgyát képezi a nehéz lánc számos különböző variábilis régiója, amely javított termelhetőség tekintetében különösen jól működik a könnyű lánc A és C verzióinak variábilis régióival.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány

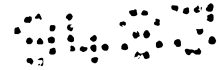


mány tárgyát olyan antitest-fehérjék képezik, amelyek a nehéz lánc variábilis régiójában a 8., 10., 12. vagy 14. számú szekvencia (SEQ ID NO: 8, 10, 12 vagy 14) bármelyikét tartalmazzák.

A találmány egy másik előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát olyan antitest-fehérjék képezik, amelyekben a nehéz lánc variábilis régióját a 7., 9., 11. vagy 13. számú nukleotid-szekvencia bármelyike kódolja.

A találmány egy nagyon jelentősen előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát olyan antitest-fehérjék képezik, amelyek a könnyű lánc variábilis régiójában a 2. számú szekvenciát tartalmazzák, és a nehéz lánc variábilis régiójában a 12. számú szekvenciát tartalmazzák. A legelőnyösebben az antitest-fehérje továbbá a könnyű lánc konstans régiójában a 20. számú szekvenciát tartalmazza, és a nehéz lánc konstans régiójában a 22. számú szekvenciát tartalmazza.

Tehát a találmány tárgya egy további vonatkozásában olyan antitest-fehérje, amely 2. számú aminosav-szekvenciát tartalmaz. Ilyen antitest-fehérje előnyösebben 12. számú aminosav-szekvenciát tartalmaz. Az antitest-fehérje előnyösebben továbbá 20. számú aminosav-szekvenciát és 22. számú aminosav-szekvenciát tartalmaz. A találmány tárgya egy további vonatkozásában ebben a bekezdésben leírtak szerinti antitest-fehérje, amely radioaktív izotóphoz, előnyösen ^{131}I -hoz, ^{125}I -hoz, ^{186}Re -hoz, ^{188}Re -hoz vagy ^{90}Y -hoz van konjugálva. A találmány tárgya egy további vonatkozásában olyan DNS-molekula, amely ebben a bekezdésben, fentebb leírt antitest-fehérjét kódol. A találmány tárgya egy további vonatkozásában ilyen DNS-molekulát hordozó gazdasejt. Ennek meg-

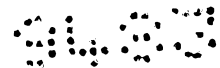


felelően, a találmány tárgya egy további vonatkozásában eljárás ebben a bekezdésben leírtak szerinti antitest-fehérje előállítására, amelyben ilyen gazdasejteket tenyésztünk olyan körülmények között, amelyben a gazdasejt expresszálja az antitest-fehérjét, és izoláljuk a fehérjét. A találmány tárgya egy további vonatkozásában gyógyászati készítmény, amely találmány szerinti antitest-fehérjét és gyógyászatiilag elfogadható hordozót tartalmaz. A találmány egy további különösen előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyat olyan antitest-fehérjék képezik, amelyekben a könnyű lánc variábilis régióját az 1. számú nukleotid-szekvencia kódolja, és a nehéz lánc variábilis régióját a 11. számú nukleotid-szekvencia kódolja.

A találmány egy további különösen előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyat olyan antitest-fehérjék képezik, amelyek a könnyű lánc variábilis régiójában a 2. számú szekvenciát tartalmazzák, és a nehéz lánc variábilis régiójában a 8. számú szekvenciát tartalmazzák.

A találmány egy további különösen előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyat olyan antitest-fehérjék képezik, amelyekben a könnyű lánc variábilis régióját az 1. számú nukleotid-szekvencia kódolja, és a nehéz lánc variábilis régióját a 7. számú nukleotid-szekvencia kódolja.

Rágcsálóból származó antitest variábilis régiójának humanizálását szakember által ismert eljárások alkalmazásával lehet elérni. Az EP 0239400. számú szabadalmi iratban leírják rágcsáló-eredetű variábilis régió CDR-jeinek átültetését humán variábilis régió vázrégiójába. A WO 90/07861. számú szabadalmi iratban le-



írják CDR-átültetett variábilis régió átalakítását úgy, hogy bevisznek további vázrégió-módosításokat. A WO 92/11018. számú szabadalmi iratban leírnak humanizált Ig előállítására szolgáló eljárást, amelyben donor CDR-eket kombinálnak olyan akceptor vázrégióval, amely nagymértékű homológiát mutat a donor vázrégióval. A WO 92/05274. számú szabadalmi iratban leírnak vázrégióban mutáns antitestek előállítására szolgáló eljárást, rágcső-eredetű antitestből kiindulva. Rágcsőből származó monoklonális antitestek humanizálása képezi az alábbi szabadalmi iratokban leírt találmányok tárgyát: EP 0368684; EP 0438310; WO 92/07075 vagy WO 92/22653. Szakember képes a találmány szerinti antitesteket előállítani nyilvánosan rendelkezésre álló, F19-jelű, monoklonális antitestből kiindulva, szakember által ismert eljárások alkalmazásával, például a WO 92/05274. számú szabadalmi iratban leírtak szerint. A találmány szerinti antitest-fehérjéket kódoló DNS-molekulákhoz természetesen szakember által ismert szintetikus eljárások alkalmazásával is hozzájuthatunk, például a megfelelő oligonukleotidok kémiai szintézisével, azt követően azok ligálásával és amplifikációs eljárások alkalmazásával [lásd Frank et al., Methods Enzymol. 154, 221-249 (1987)].

A találmány tárgyát képezik egy további vonatkozásában olyan nukleinsavmolekulák, amelyek a fentebb leírt, találmány szerinti antitest-fehérjék kódolására vonatkozó információkat tartalmazznak. A találmány szerinti nukleinsavmolekula előnyösen olyan nukleinsavmolekula, amely az 1., 3., 5., 7., 9., 11., 13. vagy 15. számú nukleotidszekvenciával rendelkezik.

A találmány tárgyát képezi egy további vonatkozásában



rekombináns DNS-vektor, amely a fentebb említett nukleinsavak bármelyikének nukleotidszekvenciáját tartalmazza, különösen úgy, hogy a nukleotid-szekvencia működőképesen kapcsolódik expressziós szabályzó szekvenciához, úgymint expressziós vektorokban. Olyan rekombináns DNS-t részesítünk előnyben, amely expressziós vektor.

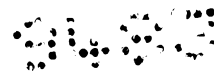
A találmány tárgya egy további vonatkozásában olyan gazdasejt, amely fentebb leírt vektort, különösen expressziós vektort tartalmaz. Ilyen gazdasejt lehet prokarióta sejt vagy eukarióta sejt. Ilyen gazdasejt előnyösen eukarióta sejt, élesztősejt vagy emlős sejt. A gazdasejt előnyösebben CHO- (kínai hörcsögből petefészkéből származó) sejt vagy COS-sejt.

Ennek megfelelően, a találmány tárgya még egy további vonatkozásában eljárás a találmány szerinti antitest-fehérje előállítására. Ebben az eljárásban:

(a) a fentebb leírt gazdasejtet olyan körülmények között tenyésztjük, amelyben a gazdasejt az antitest-fehérjét expresszálja, és

(b) izoláljuk az antitest-fehérjét.

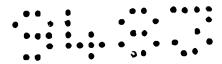
Emlős gazdasejteket, előnyösen CHO- vagy COS-sejteket részesítünk előnyben. A találmány szerinti antitest-fehérjék termelésére szolgáló gazdasejteket transzfektálhatjuk egyetlen vektorral, amely mindkét, a könnyű és nehéz láncnak megfelelő expressziós egységet tartalmazza (lásd például WO 94/11523. számú szabadalmi iratot). A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány szerinti antitest-fehérjék termelésére szolgáló gazdasejtet két olyan plazmiddal kotransz-



fektáljuk, amelyek könnyű és nehéz láncoknak megfelelő expre-sziós egységeket tartalmaznak, külön-külön (lásd például EP 0481790. számú szabadalmi iratot).

A találmány szerinti antitest-fehérjék nagymértékben specifi-kus eszközt biztosítanak terápiás ágensek FAP-antigénhez való célba juttatására. Ezért a találmány tárgyát képezik egy további vonatkozásában a találmány szerinti olyan antitest-fehérjék, amelyek terápiás ágensekhez vannak konjugálva. Szakember által is-mert, sok terápiás ágens közül előnyösen alkalmazhatók radioak-tív izotópok, toxinok, toxoidok, gyulladást okozó ágensek, enzi-mek, antiszensz molekulák, peptidek, citokinek és kemoterápiás ágensek. Radioaktív izotópként gamma, béta és alfa-emittáló ra-dioaktív izotópokat alkalmazhatunk terápiás ágensként. Terápiás radiokatív izotópként β -emittáló radioaktív izotópokat része-sítjük előnyben. $^{186}\text{Rénium}$, $^{188}\text{rénium}$, $^{131}\text{jód}$ és $^{90}\text{ittrium}$ bizonyult különösen hasznos β -emittáló izotópként, amelyek alkalmazásával elérhető lokalizált besugárzás és malignus tumorsejtek elpusztí-tása. Ezért radioaktív izotópként különösen előnyös $^{186}\text{rénium}$, $^{188}\text{rénium}$, $^{131}\text{jód}$ vagy $^{90}\text{ittrium}$ alkalmazása terápiás ágensként, me-lyet a találmány szerinti antitest-fehérjékhez konjugálunk. Pél-dául, a találmány szerinti antitest jóddal való radioaktív jelölésére alkalmazhatjuk a WO 93/05804. szabadalmi iratban leírt eljárást.

A találmány tárgya egy további vonatkozásában a találmány szerinti olyan antitest-fehérjék, amelyek jelölve vannak. Ilyen FAP-specifikus, jelölt antitest lehetővé teszi az FAP-antigén in vitro és/vagy in vivo lokalizálását és/vagy detektálását. A je-



lölő definiálható markerként, amely közvetlenül vagy közvetve detektálható. A közvetve detektálható markert magát nem lehet detektálni, hanem szükség van további közvetlenül detektálható markerre, amely specifikus a közvetett markerre. A találmány szerinti megoldásban előnyösen detektálható markereket alkalmazunk. A sokféle detektálható marker közül a legelőnyösebben az alábbiakat választjuk: enzimek, festékek, radioaktív izotópok, digoxigenin vagy biotin.

A találmány tárgya egy további vonatkozásában a találmány szerinti antitest-fehérjék, amelyek leképezhető ágenshez vannak konjugálva. A sokféle leképezhető ágens közül szakember számára különösen a radioaktív izotópok állnak rendelkezésre. A találmány szerinti megoldásban γ -emittáló radioaktív izotópokat részesítünk előnyben. A legelőnyösebben ^{125}J ódot alkalmazunk.

A találmány tárgyát képezik egyik vonatkozásában a fentebb leírt, találmány szerinti antitest-fehérjét és gyógyászatilag elfogadható hordozót tartalmazó gyógyszerkészítmények. Ilyen gyógyszerkészítmények olyan tumorok kezelésére alkalmasak, amely tumorok aktivált, stroma-fibroblasztokkal társultak. Két lehetséges effektor elv létezik anti-tumorstroma immunterápia céljára, amelyek szinergikusan hathatnak: (a) módosítatlan (nem-konjugált, „csupasz”), találmány szerinti antitest immunológiai pusztítást vagy gyulladásos reakciókat indukálhat a tumorstromában, míg (b) terápiás ágenshez, például radioaktív izotóphoz vagy más toxikus anyaghoz konjugált antitest alkalmazásával elérhetünk lokalizált besugárzást és malignus tumorsejtek pusztulását. Ennek megfelelően, a találmány tárgya egy további vo-



natkozásában a fentebb leírtak szerinti antitest-fehérje alkalmazása gyógyszerkészítmények előállítására, speciálisan tumorok kezelésére.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a gyógyszerkészítmények olyan találmány szerinti antitest-fehérjét tartalmaznak, amely a fentebb leírtak szerinti terápiás ágenshez van konjugálva, valamint gyógyászatilag elfogadható hordozót, amelyek aktivált, stroma-fibroblasztokkal társult tumorok kezelésére alkalmasak. A találmány egy másik előnyös megvalósítási módja szerint, a gyógyszerkészítmények olyan találmány szerinti antitest-fehérjét tartalmaznak, amely a fentebb leírtak szerinti leképezhető ágenshez van konjugálva, valamint gyógyászatilag elfogadható hordozót, amelyek aktivált, stroma-fibroblasztok jelenlétének leképezésére sebgyógyulásban, gyulladások bőrben vagy tumorban, egy humán páciensben. A találmány legelőnyösebb megvalósítási módja szerint, a fentebb említett gyógyszerkészítményeket olyan tumor esetén alkalmazzuk, amely az alábbi rákbetegség-csoportból származik: vastag- és vékonybélrák, nem aprósejtes tüdőrák, mellrák, fej- és nyakrák, petefészekrák, tüdőrák, hólyagrák, hasnyálmirigy-rák és az agy metasztázisos rákjai.

Állati vagy emberi testben előnyösnek bizonyulhat a fentebb említett gyógyszerkészítmények alkalmazása intravénásan vagy más módon, például szisztémásan, lokálisan vagy topikálisan a kérdéses szövethez vagy szervhez, a betegség típusától és eredetétől, vagy a kezelt problémától, például tumortól függően. Például szisztémás beadás akkor kívánatos, ha különböző szervek vagy



szervrendszerek szorulnak kezelésre, például szisztémás autoimmun betegségek, vagy allergiák, vagy idegen szervek vagy szövetek transzplantációi esetén, vagy olyan tumorok esetén, amelyek diffúzak vagy nehéz lokalizálni azokat. Lokális beadási mód akkor jöhet szóba, ha csak lokális neopláziás manifesztációt vagy immunológiai hatást várunk, például lokális tumorok esetén.

A találmány szerinti antitest-fehérjéket különböző, szakember által ismert beadási módszerekkel alkalmazhatjuk, különösen intravénás injekció vagy célszövetbe irányuló közvetlen injekció formájában. Szisztémás alkalmazásban az intravénás, intravaszkuláris, intramuszkuláris, intraarteriális, intraperitoneális, orális vagy intratekális beadási módot részesítjük előnyben. Lokálisabb alkalmazást érhetünk el szubkután, intrakután, intrakardiális, intralobáris, intramedulláris, intrapulmonális vagy közvetlenül a kezelendő szövetbe (kötőszövet, csontszövet, izomszövet, idegszövet, epitel szövet) vagy annak közelébe. A kezelés kívánt időtartamától és hatékonyságától függően, az antitestet tartalmazó gyógyszerkészítményeket beadhatjuk egyszeri vagy néhány alkalommal, időszakosan, például naponta vagy néhány naponta, hetente vagy havonta, és eltérő dózisokban.

A fentebb leírt alkalmazásokra megfelelő antitest-preparátumok előállítása céljából szakember injektálható, fiziológiailag elfogadható, steril oldatokat alkalmazhat. Parenterális injekcióhoz vagy infúzióhoz, felhasználásra kész oldatok előállítása céljából vizes, izotóniás oldatok, például nátrium-klorid-vagy megfelelő plazmafehérje-oldatok könnyen hozzáférhetőek. A gyógyszerkészítmények lehetnek liofilizátumok vagy száraz prepa-



rátumok formájában, amelyeket ismert injektálható oldattal fel lehet oldani felhasználás előtt, steril körülmények között, például egy reagenskészlet részeként. A találmány szerinti antitest-készítmények végső preparálását injekció, infúzió vagy perfúzió céljára úgy végezzük, hogy a találmány szerinti tisztított antitesteket összekeverjük steril, fiziológiailag elfogadható oldattal, amelyet kiegészíthetünk ismert hordozóanyagokkal és/vagy adalékanyagokkal (például szérum-albuminnal, dextrózzal, nátrium-biszulfittal, EDTA-val).

Az alkalmazott antitest mennyisége függ a betegség természetétől. Rákbeteg-páciensekben a „csupasz” antitest alkalmazott dózisa 0,1 és 100 mg/m² között, előnyösen 5 és 50 mg/m² között lehet alkalmanként. Radioaktívan, például jód-131-el jelölt antitestek esetén meg kell határozni a maximálisan tolerált dózist (MTD), amelyet nem szabad túllépni a terápiás beállításokban. Radioaktívan jelölt antitestet rákbetegeknek akkora dózisokat tartalmazó, ismételt (havonta vagy hetente) intravénás infúziókkal adunk be, amely dózisok az MTD alatt vannak [lásd például Welt et al., J. Clin. Oncol. 12, 1193-1203 (1994)].

A találmány tárgya egy vonatkozásában a találmány szerinti antitest-fehérjék alkalmazása rák kezelésére. A találmány előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgya terápiás ágenshez konjugált, találmány szerinti antitest-fehérjék alkalmazása a fentebb leírtak szerint, rák kezelésére. A találmány egy másik előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgya leképezhető ágenshez konjugált, találmány szerinti antitest-fehérjék alkalmazása aktivált, stroma-fibroblasztok leképezésé-



re. A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgya jelölt találmány szerinti antitest-fehérjék alkalmazása aktivált, stroma-fibroblasztok jelenlétének detektálására egy mintában.

A találmány tárgyát képezi egy vonatkozásában eljárás tumorok kezelésére, amelyben a tumor aktivált, stroma-fibroblasztokkal társult, amely fibroblasztok specifikusan képesek komplexet kialakítani a találmány szerinti antitest-fehérjékkel, amelyek csupasz/módosítatlan antitestként, módosított antitestként, például fúziós fehérjeként vagy terápiás ágenshez konjugált antitest-fehérjeként vannak jelen, amely eljárásban a tumort érintkeztetjük a tumor kezelésére hatékony mennyiségű antitesttel. A találmány előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgya eljárás a fentebb említett tumorok kezelésére, amelyben a tumor az alábbi rákbetegség-csoportból származó ráksejtekkel rendelkezik: vastag- és vékonybélrákok, nem aprósejtes tüdőrákok, mellrákok, fej- és nyakrák, petefészekrákok, tüdőrákok, hólyagrákok, hasnyálmirigy-rákok és az agy metasztázisos rákjai. A tumorok kezelésére szolgáló, fentebb leírt eljárást végezhetjük in vitro vagy in vivo.

A találmány tárgyát képezi egy vonatkozásában eljárás aktivált, stroma-fibroblasztok jelenlétének detektálására sebgyógyulásban, gyulladásban vagy tumorokban, amelyben

(a) a feltételezhetően aktivált, stroma-fibroblasztokat tartalmazó mintát érintkeztetjük a találmány szerinti antitest-fehérjével olyan körülmények között, amely alkalmas az antitest és antigén közötti komplex kialakulására,



(b) detektáljuk a komplex jelenlétét, ezáltal detektáljuk az aktivált, stroma-fibroblasztok jelenlétét sebgyógyulásban, gyulladásban vagy tumorban.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát képezi eljárás aktivált, stroma-fibroblasztok jelenlétének detektálására tumorban, amelyben a tumor az alábbi rákbetegség-csoportból származó ráksejtekkel rendelkezik: vastag- és vékonybélrák, nem aprósejtes tüdőrák, mellrák, fej- és nyakrák, petefészekrák, tüdőrák, hólyagrák, hasnyálmirigy-rák és az agy metasztatizáló rákjai. A találmány szerint legelőnyösebben alkalmazott antitest-fehérjék a fentebb leírtak szerint vannak megjelölve.

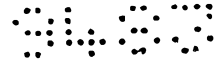
A találmány tárgya egy további vonatkozásában eljárás aktivált, stroma-fibroblasztok jelenlétének leképezésére sebgyógyulásban, gyulladt bőrben (reumatoid artritiszre és cirrózisra szintén pozitív) vagy tumorban, egy humán páciensben, amelyben:

(a) leképező ágenshez konjugált, találmány szerinti antitest-fehérjét beadunk humán páciensnek olyan körülmények között, amely alkalmas az antitest és antigén közötti komplex kialakulására,

(b) leképezzük az így kialakult bármilyen komplexet,

(c) ezáltal leképezzük aktivált, stroma-fibroblasztok jelenlétét egy humán páciensben.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány tárgyát képezi eljárás aktivált, stroma-fibroblasztok jelenlétének leképezésére tumorokban, amelyben a tumor az alábbi rákbetegség-csoportból származó ráksejtekkel rendelkezik: vas-



tag- és vékonybélrákok, nem aprósejtes tüdőrákok, mellrákok, fej- és nyakrák, petefészekrákok, tüdőrákok, hólyagrákok, hasnyálmirigy-rákok és az agy metasztatizisos rákjai.

A találmány tárgya egy további vonatkozásában eljárás tumor-stroma detektálására, amelyben:

(a) egy alkalmas mintát érintkeztetünk a találmány szerinti antitest-fehérjével olyan körülmények között, amely alkalmas az antitest és antigén közötti komplex kialakulására,

(b) detektáljuk a így kialakult bármilyen komplex jelenlétét,

(c) a komplex jelenlétét tumor-stroma jelenlétére vonatkoztatjuk.

A találmány szerinti megoldásban előnyösen detektálható markerrel jelölt antitestet alkalmazunk.

A találmány tárgyát képezik egy további vonatkozásában eljárás tumor-stroma leképezésére egy humán páciensben, amelyben

(a) leképezhető ágenshez konjugált, találmány szerinti antitest-fehérjét beadunk a páciensnek olyan körülmények között, amely alkalmas az antitest és antigén közötti komplex kialakulására,

(b) leképezzük az így kialakult bármilyen komplexet, és ezáltal leképezzük a tumor-stroma jelenlétét humán páciensben.

Ábrák rövid leírása:

1. ábra: F19 humán, átalakított könnyű lánc variábilis régió A-verziójának (hF19L_A) DNS-szekvenciája: 1. számú szekvencia (SEQ ID NO: 1).

2. ábra: F19 humán, átalakított könnyű lánc variábilis régió A-verziójának (hF19L_A) aminosav-szekvenciája: 2. számú szekvencia



(SEQ ID NO: 2).

3. ábra: F19 humán, átalakított könnyű lánc variábilis régió B-verziójának (hF19L_B) DNS-szekvenciája: 3. számú szekvencia (SEQ ID NO: 3). Az A-verziótól eltérő nukleotidok alá vannak húzva és vastag betűvel vannak szedve.

4. ábra: F19 humán, átalakított könnyű lánc variábilis régió B-verziójának (hF19L_B) aminosav-szekvenciája: 4. számú szekvencia (SEQ ID NO: 4). Az A-verziótól eltérő aminosavak alá vannak húzva és vastag betűvel vannak szedve.

5. ábra: F19 humán, átalakított könnyű lánc variábilis régió C-verziójának (hF19L_C) DNS-szekvenciája: 5. számú szekvencia (SEQ ID NO: 5). Az A-verziótól eltérő nukleotidok alá vannak húzva és vastag betűvel vannak szedve.

6. ábra: F19 humán, átalakított könnyű lánc variábilis régió C-verziójának (hF19L_C) aminosav-szekvenciája: 6. számú szekvencia (SEQ ID NO: 6). Az A-verziótól eltérő aminosavak alá vannak húzva és vastag betűvel vannak szedve.

7. ábra: F19 humán, átalakított nehéz lánc variábilis régió A-verziójának (hF19H_A) DNS-szekvenciája: 7. számú szekvencia (SEQ ID NO: 7).

8. ábra: F19 humán, átalakított nehéz lánc variábilis régió A-verziójának (hF19H_A) aminosav-szekvenciája: 8. számú szekvencia (SEQ ID NO: 8).

9. ábra: F19 humán, átalakított nehéz lánc variábilis régió B-verziójának (hF19H_B) DNS-szekvenciája: 9. számú szekvencia (SEQ ID NO: 9). Az A-verziótól eltérő nukleotidok alá vannak húzva és vastag betűvel vannak szedve.



10. ábra: F19 humán, átalakított nehéz lánc variábilis régió B-verziójának (hF19H_B) aminosav-szekvenciája: 10. számú szekvencia (SEQ ID NO: 10). Az A-verziótól eltérő aminosavak alá vannak húzva és vastag betűvel vannak szedve.

11. ábra: F19 humán, átalakított nehéz lánc variábilis régió C-verziójának (hF19H_C) DNS-szekvenciája: 11. számú szekvencia (SEQ ID NO: 11). Az A-verziótól eltérő nukleotidok alá vannak húzva és vastag betűvel vannak szedve.

12. ábra: F19 humán, átalakított nehéz lánc variábilis régió C-verziójának (hF19H_C) aminosav-szekvenciája: 12. számú szekvencia (SEQ ID NO: 12). Az A-verziótól eltérő aminosavak alá vannak húzva és vastag betűvel vannak szedve.

13. ábra: F19 humán, átalakított nehéz lánc variábilis régió D-verziójának (hF19H_D) DNS-szekvenciája: 13. számú szekvencia (SEQ ID NO: 13). Az A-verziótól eltérő nukleotidok alá vannak húzva és vastag betűvel vannak szedve.

14. ábra: F19 humán, átalakított nehéz lánc variábilis régió D-verziójának (hF19H_D) aminosav-szekvenciája: 14. számú szekvencia (SEQ ID NO: 14). Az A-verziótól eltérő aminosavak alá vannak húzva és vastag betűvel vannak szedve.

15. ábra: F19 humán, átalakított nehéz lánc variábilis régió E-verziójának (hF19H_E) DNS-szekvenciája: 15. számú szekvencia (SEQ ID NO: 15). Az A-verziótól eltérő nukleotidok alá vannak húzva és vastag betűvel vannak szedve.

16. ábra: F19 humán, átalakított nehéz lánc variábilis régió E-verziójának (hF19H_E) aminosav-szekvenciája: 16. számú szekvencia (SEQ ID NO: 16). Az A-verziótól eltérő aminosavak alá vannak



húzva és vastag betűvel vannak szedve.

17. ábra: F19 kiméra könnyű lánc variábilis régió (chF19LC)
aminosav-szekvenciája: 17. számú szekvencia (SEQ ID NO: 17).

18. ábra: F19 kiméra nehéz lánc variábilis régió (chF19HC)
aminosav-szekvenciája: 18. számú szekvencia (SEQ ID NO: 18).

19. ábra: Humán kappa könnyű lánc konstans régió DNS-
szekvenciája: 19. számú szekvencia (SEQ ID NO: 19).

20. ábra: Humán könnyű lánc konstans régió aminosav-
szekvenciája: 20. számú szekvencia (SEQ ID NO: 20).

21. ábra: Humán nehéz lánc konstans régió DNS-szekvenciája:
21. számú szekvencia (SEQ ID NO: 21).

22. ábra: Humán nehéz lánc konstans régió aminosav-
szekvenciája: 22. számú szekvencia (SEQ ID NO: 22).

23. ábra: Emlős sejtben működő expressziós vektorok, melyeket
kiméra és átalakított, humán kappa könnyű láncokból és humán
gamma-1 nehéz láncokból álló, humán antitestek termeltetésére
alkalmaztunk.

23 A. Könnyű láncot kódoló expressziós vektor: pKN100

23 B. Nehéz láncot kódoló expressziós vektor: pG1D105

24. ábra: Egérből származó F19 könnyű lánc variábilis régió-
jának DNS- és aminosav-szekvenciája, módosítva kiméra F19 könnyű
láncot tartalmazó konstrukcióban való alkalmazásra. A restrikti-
ós helyeket vastag betűvel jelöltük. A Kozak-szekvencia, 1-3
CDR-ek és a splicing-donorhely alá van húzva.

25. ábra: Egérből származó F19 nehéz lánc variábilis régiójá-
nak DNS- és aminosav-szekvenciája, módosítva kiméra F19 nehéz
láncot tartalmazó konstrukcióban való alkalmazásra. A restrikti-



ós helyeket vastag betűvel jelöltük. A Kozak-szekvencia, 1-3 CDR-ek és a splicing-donorhely alá van húzva.

26. ábra: F19 kiméra antitest DNS-szekvenciája pKN100-jelű emlős expressziós vektorba klónozva. A restriktációs helyeket vastag betűvel és aláhúzással jelöltük. CDR-ek (1-3) és a splicing-donorhely alá vannak húzva. Ez egérez eredetű F19 könnyű lánc DNS-szekvenciája pKN100-jelű eukarióta expressziós vektorban. A vektor tartalmazza a humán kappa konstans régió génjének cDNS-verzióját [allotípus Km(3)], amely erős mesterséges terminációs szekvenciával terminálódik. Továbbá a Neo-jelű szelektálható gén szintén ezzel a mesterséges szekvenciával terminálódik, és szintén ugyanabban az orientációban van, mint a kappa könnyű lánc expressziós kazetta.

A pKN100-jelű eukarióta expressziós vektor esszenciális komponensei az alábbiak:

- 1-6 = EcoRI-hasítóhely
- 7-1571 = HCMVi-promóter/enhanszer
- 583-587 = TATAA-box
- 610 = transzkripció start hely
- 728-736 = splicing donorhely
- 731 = intron kezdete
- 1557 = intron vége
- 1544-1558 = splicing akceptorhely
- 1590-1598 = Kozak-szekvencia
- 1599-1658 = peptid-vezetőszekvencia
- 1659-1997 = egérez eredetű F19 könnyű lánc
- 1996-2004 = splicing donorhely



2011-2657 = humán Kappa konstans régió [Km(3)] génjének

cDNS-kópiája

2664-2880 = mesterséges spaC2 terminációs szekvencia

2887-7845 = A pSV2neo-vektor DNS-fragmentuma, amely Amp-rezisztenciagént (ellenkező orientációban), CoIEI és SV40 replikációs origókat és Neo-rezisztenciagént (ugyanabban az orientációban, mint a HCMVi-KCT-kazetta) tartalmaz

7852-8068 = mesterséges spaC2 terminációs szignál

Ez a szekvencia közvetlenül az EcoRI-hasítóhelytől (1-6. helyzet) szintézisiránnyal szemben végződik, a szekvencia kezdeténél. Ez a DNS-szekvencia vektorként cirkuláris lenne.

27. ábra: F19 kiméra antitest DNS-szekvenciája pgld105-jelű emlős expressziós vektorba klónozva. A restriktációs helyeket vastag betűvel és aláhúzással jelöltük. CDR-ek (1-3) és a splicing-donorhely alá vannak húzva. Ez a DNS-szekvencia egérreredetű F19 nehéz lánc DNS-szekvenciája pGld105-jelű eukarióta expressziós vektorban. A vektor tartalmazza a humán gamma-1 konstans régió génjének cDNS-verzióját [allotípus G1m(non-a, z, -x), amely Gm1(17)-allotípusként is ismeretes].

A konstrukció esszenciális komponensei az alábbiak:

1-2501 = pBR322-alapú szekvencia, amely ampicillin-rezisztenciagént, CoIEI plusz SV40 replikációs origót és elszórt SV40 korai promótert tartalmaz

2502-3226 = dhfr-gén

3233-4073 = SV40 poli-A-szekvencia stb.

4074-4079 = ligált BamHI- és BglII-hasítóhely (BstYI)



sav-szekvenciákat egymás alá rendeztük, és összehasonlítottuk az A-verzióval, a vonalkázás nukleotid-azonosságot, a pontozás aminosav-azonosságot jelent ebben a szekvenciában. Az aminosavakat Kabat és munkatársai által (1991) leírtak szerint számoztuk. A CDR-ek elhelyezkedését bekereteztük.

30. ábra: F19 L_A (humán, átalakított könnyű lánc A-verziója) DNS-szekvenciája pKN100-jelű emlős expressziós vektorba klónozva. A restriktációs helyeket vastag betűvel és aláhúzással jelöltük. CDR-ek (1-3) és a splicing-donorhely alá vannak húzva. Ez átalakított F19 könnyű lánc A-verziójának DNS-szekvenciája pKN100-jelű eukarióta expressziós vektorba klónozva. A vektor tartalmazza a humán kappa konstans régió génjének cDNS-verzióját [allotípus Km(3)], amely erős mesterséges terminációs szekvenciával terminálódik. Továbbá a Neo-jelű szelektálható gén szintén ezzel a mesterséges szekvenciával terminálódik, és szintén ugyanabban az orientációban van, mint a kappa könnyű lánc expressziós kazetta.

A vektor komponensei az alábbiak:

- 7-1571 = HCMVi-promóter/enhanszer
- 583-587 = TATAA-box
- 610 = transzkripció start hely
- 728-736 = splicing donorhely
- 731 = intron kezdete
- 1557 = intron vége
- 1544-1558 = splicing akceptorhely
- 1590-1598 = Kozak-szekvencia
- 1599-1658 = peptid-vezetőszekvencia



1659-1997 = átalakított F19 könnyű lánc A-verziója

1996-2004 = splicing donorhely

2011-2657 = humán Kappa konstans régió [Km(3)] génjének

cDNS-kópiája

2664-2880 = mesterséges spaC2 terminációs szekvencia

2887-7845 = A pSV2neo-vektor DNS-fragmentuma, amely Amp-rezisztenciagént (ellenkező orientációban), CoIEI és SV40 replikációs origókat és Neo-rezisztenciagént (ugyanabban az orientációban, mint a HCMVi-KCT-kazetta) tartalmaz

7852-8068 = mesterséges spaC2 terminációs szignál

Ez a szekvencia közvetlenül az EcoRI-hasítóhelytől (1-6. helyzet) szintézisiránnyal szemben végződik, a szekvencia kezdeténél. Ez a DNS-szekvencia vektorként cirkuláris lenne.

31. ábra: PCR-re alapuló eljárás humán, átalakított F19 nehéz lánc előállítására. Ezen az ábrán vázlatosan bemutatjuk az előállítás stratégiáját. A pontozott vonalak legalább 21 bázisból álló, komplementer szekvenciákat jeleznek a primerekben.

32. ábra: Átalakított, humán F19 nehéz lánc variábilis régió A-E verzióinak nukleotidszekvenciái és levezetett aminosav-szekvenciái. A nukleotidszekvenciákat és a levezetett aminosav-szekvenciákat egymás alá rendeztük, és összehasonlítottuk az A-verzióval, a vonalkázás nukleotid-azonosságot, a pontozás aminosav-azonosságot jelent ebben a szekvenciában. Az aminosavakat Kabat és munkatársai által (1991) leírtak szerint számoztuk. A CDR-ek elhelyezkedését bekereteztük.

33. ábra: F19Ha (humán, átalakított, nehéz lánc A-verziója)



DNS-szekvenciája pglD105-jelű emlős expressziós vektorba klónoztva. A restriktációs helyeket vastag betűvel és aláhúzással jeöltük. CDR-ek (1-3) és a splicing-donorhely alá vannak húzva. Ez a DNS-szekvencia pG1D105-jelű eukarióta expressziós vektor DNS-szekvenciája, amely F19 nehéz lánc variábilis régió A-verzióját tartalmazza. A vektor tartalmazza a humán gamma-1 konstans régió génjének cDNS-verzióját [allotípus G1m(non-a, z, -x), amely Gm1(17)-allotípusként is ismeretes].

A konstrukció esszenciális komponensei az alábbiak:

1-2501 = pBR322-alapú szekvencia, amely ampicillin-rezisztenciagént, CoIEI plusz SV40 replikációs origót és el-sorvasztott SV40 korai promótert tartalmaz

2502-3226 = dhfr-gén

3233-4073 = SV40 poli-A-szekvencia stb.

4080-4302 = SPA-hely plusz C2 terminációs szignál

4303-5867 = HCMVi-promóter

5879-5885 = egyedi HindIII restriktációs hasítóhely immunoglobulinból származó variábilis gének klónozására

5886-5894 = Kozak-szekvencia

5895-5951 = szignálpeptid

5952-6323 = átalakított F19 nehéz lánc A-verziója

6323-6330 = splicing donorhely

6331-6336 = egyedi BamHI restriktációs hasítóhely immunoglobulinból származó variábilis gének klónozására

6337-7388 = humán gamma-1 konstans régiók cDNS-kópiája, melyet megelőz egy 62 bp méretű intron

7389-7709 = Arnie terminációs szekvencia



A konstrukcióban alkalmazott, humán gamma-1 konstans régió G1m- (non-a, z, -x) allotípussal rendelkezett, amely Gm1(17)-allotípusként is ismeretes, amelyet egy glutaminsav (E) határoz meg a 356. helyzetben (Eu-számozás szerint), egy metionin (M) a 358. helyzetben (Eu-számozás szerint) és egy lizin (K) a 214. helyzetben (Eu-számozás szerint). Ez a három aminosav alá van húzva a fenti szekvenciában.

34. ábra: Nehéz (A-panel) és könnyű láncok (B-panel) RNS-splicing-eseményei, amelyek az F19-antitest expressziója alatt mennek végbe emlős sejtekben -vázlatos rajz.

A. Nehéz lánc RNS-splicingjai

B. Kappa könnyű lánc RNS-splicingjai

35. ábra: CD8-FAP-hoz kötődött L_AH_C -felülúszó koncentrációfüggése.

36. ábra: Biotinilált L_AH_C kötődése humán FAP-hez.

37. ábra: CD8-FAP hordoz F19-epitópot, cF19-el detektálva.

1. példa

Egér-humán kiméra gének előállítás

A kiméra F19-antitestet (cF19) úgy terveztük, hogy egéreredetű F19 V_L - illetve V_H -régiókat kapcsoltunk humán kappa illetve gamma-1 konstans régiókhoz, ebben a sorrendben. Az egéreredetű F19 V_L - és V_H -régiókat kódoló cDNS-szekvenciákat szegélyező, 5' - és 3' -végi szekvenciák módosítására PCR-primereket alkalmaztunk (1. táblázat). Az F19 könnyű lánc V-régiójára specifikus PCR-primereket terveztünk. Ezeket az átalakított egéreredetű F19 variábilis régiókat azután emlős sejtekben működő olyan expresz-



sziós vektorokba szubklónoztuk, amelyek már tartalmazták a humán kappa (pKN100-vektor) vagy gamma-1 (pG1D105-vektor) konstans régióit (23. ábra). Ezekben a vektorokban humán citomegalovírus (HCMV) promótert/enhanszert alkalmazunk a könnyű és nehéz láncok hatékony átírása céljából. A vektorok tartalmaznak még SV40 replikációs origót, hatékony DNS-replikáció és azt követően COS-sejtekben való fehérjeexpresszió lehetővé tétele céljából. Az expressziós vektorokat úgy terveztük, hogy a variábilis régiókat HindIII-BamHI-DNS-fragmentumként inszertáltuk. PCR-primeket terveztünk, hogy a restrikciós hasítóhelyeket bevigyük az V-régiókat kódoló cDNS-ek 5'-(HindIII) és 3'-(BamHI) végeihez. A PCR-primereket továbbá úgy terveztük, hogy bevigyünk Kozak-szekvenciát (GCCGCCACC) mind a könnyű, mind a nehéz láncot kódoló cDNS-ek 5'-végeihez, hatékony transzláció lehetővé tétele céljából [Kozak, M., J. Mol. Biol. 196, 947 (1987)], és hogy bevigyünk splicing donorhelyeket mind a könnyű, mind a nehéz láncot kódoló cDNS-ek 3'-végeihez, hogy a variábilis régiók a splicing során a konstans régiókhoz kerüljenek. A kiméra F19 könnyű és nehéz láncot kódoló konstrukcióhoz alkalmazott PCR-primereket bemutatjuk az 1. táblázatban. Az egérereredetű F19 V_L- és V_H-régiók DNS- és aminosav-szekvenciáit bemutatjuk a 24. és 25. ábrákon, ahogyan át lettek alakítva kiméra F19 könnyű és nehéz láncok előállítására. A pKN100- és pG1D105-jelű, eukarióta expressziós vektorokba klónozott, egérereredetű F19 könnyű és nehéz láncok DNS-szekvenciáit bemutatjuk a 26. és 27. ábrákon.

1. TÁBLÁZAT: PCR-primerek kiméra F19-antitest előállítására



A. Könnyű lánc variábilis régió

1. Az 5' -vég előállítására szolgáló primer (37 tagú)

5' CAGA **AAGCTT** GCCGCCACC ATG GAT TCA CAG GCC CAG 3'

HindIII Kozak-szekvencia M D S Q A Q

2. A 3' -vég előállítására szolgáló primer (35 tagú)

5' CCGA**GGATCC**ACTCACGTTT CAG CTC CAG CTT GGT 3'

BamHI splicing donorhely

B. Nehéz lánc variábilis régió

1. Az 5' -vég előállítására szolgáló primer (37 tagú)

5' CAGA **AAGCTT** GCCGCCACC ATG GGA TGG AGC TGG GTC 3'

HindIII Kozak-szekvencia M G W S W V

2. A 3' -vég előállítására szolgáló primer (35 tagú)

5' CCGA **GGATCC** ACTCACC TGA GGA GAC GGT GAC TGA 3'

BamHI splicing donorhely

2. példa

Kiméra F19-antitest expresszálása és kötési aktivitása

Kiméra F19 könnyű és nehéz láncokat kódoló, két plazmid DNS-t (lásd 1. példát) kotranszfektáltunk COS-sejtekbe, kiméra F19-antitest tranziens expressziója céljából, a lentebb leírtak szerint. 72 órás inkubálás után, a tápközeget elkülönítettük, centrifugáltuk a sejttörmelékek eltávolítása céljából, és ELISA-val analizáltuk humán IgG1-szerű antitest előállítására céljából. A kiméra F19 antitestet tartalmazó COS-sejtfelülűszót analizáltuk arra vonatkozóan, hogy milyen mértékben képes FAP-antigént sejtfelületen expresszáló, HT 1080-sejtekhez kötődni (lásd 13. példát).

COS-sejtek transzfekeciója elektroporáció alkalmazásával



A kiméra vagy átalakított, humán nehéz illetve könnyű láncok verzióit tartalmazó, pgld105- illetve pKN100-jelű, emlős expressziós vektorokat COS-sejtekben teszteltük F19-antitestek tranziens expressziójára nézve. COS7-sejteket rutinszerűen passzáltunk penicillint (50 IU/ml), sztreptomocint (50 µg/ml), L-glutamint és 10% hőinkativált gamma-globulintól mentes, magzati borjúsérumot (FCS, Harlan Sera-Lab., kat.sz. D0001) tartalmazó DMEM-be (Gibco BRL kat. #41966). A DNS-t elektroporációval vittük be COS-sejtekbe, Gene Pulsar készülék (BioRad) alkalmazásával. A DNS-t (vektoronként 10 µg) hozzáadtuk 0,8 ml, 1×10^7 sejt/ml-es alikvothoz, foszfát-pufferolt sóoldathoz (PBS, kalcium- és magnézium-iontól mentes). 1900 V, 25 µF elektromos impulzust alkalmaztunk. 10 perces regenerálódási idő után, szobahőmérsékleten, az elektroporáción átesett sejtekhez hozzáadtunk 8 ml, 5% FCS-t tartalmazó DMEM-et. 37°C-on, 72 óráig végzett inkubáció után, a tápközeget elkülönítettük, centrifugáltuk a sejttörmelékek eltávolítása céljából, és steril körülmények között tároltuk 4°C-on rövid ideig, vagy -20°C-on hosszabb ideig.

***Szerveződött IgG1/kappa-antitest koncentrációjának mérése
COS-sejtek felülúszójában, ELISA alkalmazásával***

Transzfektált COS-sejtek által termelt antitest-mintákat ELISA-val vizsgáltunk annak meghatározása céljából, hogy mennyi kiméra vagy átalakított, humán antitestet termelt. Az antitest detektálása céljából, tálcákat kecskében termeltetett, (Fcγ-fragmentumra specifikus) anti-humán-IgG-vel (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., #109-005-098) burkoltunk. COS-sejtekből származó mintákat hígítási sorban lehígítottunk, és hozzáadtuk az



egyes mérőhelyekhez. 1 óra hosszáig inkubáltuk 37°C-on, és mos-
tuk, majd hozzáadtunk tormából származó peroxidázzal konjugált,
kecskében termeltetett, anti-humán kappa könnyű láncot (Sigma,
A-7164). 30 perces, 37°C-on végzett inkubáció és mosás után hoz-
záadtunk „K-blue” szubsztrátot (3,3',5,5'-tetrametil-benzidin és
hidrogén-peroxid keverékét, Bionostics Limited, #KB175) 30 per-
cig, szobahőmérsékleten. A reakciót „Red Stop” oldat (Bionostics
Limited, #RS20) alkalmazásával leállítottuk, és leolvastuk az
optikai denzitást mikrotálca-leolvasóban 650 nm-en. Standardként
tisztított, ismert koncentrációjú, humán IgG1/Kappa-antitestet
alkalmaztunk.

Kiméra F19-antitest expressziójának mértéke COS-sejtekben
alacsony volt (2. táblázat), 10 és 60 ng/ml közötti érték, amely
legalább tizede az antitestek többségének.

Kiméra F19-antitestexpresszió mértékének fokozása céljából az
F19 V_L-régió vezetőszekvenciáját megváltoztattuk úgy, hogy egy
leucint szubsztituáltunk prolinra a -9. helyzetben. Ez az egyet-
len aminosav-csere a vezetőszekvenciában legalább megduplázta a
COS-sejtekben termelődött kiméra antitest mennyiségét.

Sejtkötési eredmények azt mutatják, hogy kiméra F19 specifi-
kusan és a várakozásnak megfelelő aviditással képes kötődni az
FAP-célhoz.

2. TÁBLÁZAT: Kiméra F19-antitest koncentrációi COS-sejtek felül-

úszóiban (három független transzfekcióból származó eredmények)

Transzfektált antitest-komponensek		Humán γ 1/K
Nehéz lánc	Kappa könnyű lánc	μ g/ml-ben
cF19	cF19 (F19 vezetőszekvencia)	0,060
cF19	cF19 (mutáns vezetőszekvencia)	0,212
cF19	cF19 (F19 vezetőszekvencia)	0,056
cF19	cF19 (mutáns vezetőszekvencia)	0,108
cF19	cF19 (F19 vezetőszekvencia)	0,011
cF19	cF19 (mutáns vezetőszekvencia)	0,087

3. példa

Átalakított humán F19 könnyű lánc A-C-verzióinak (L_A - L_B) előállítás

Az átalakított humán F19 V_L -régió (L_A) első verzióját átfedő PCR-fragmentumok alkalmazásával állítottuk elő, Daugherty, B. L. és munkatársai [Nucl. Acids Res. 19, 2471 (1991)] által leírt módszerhez hasonlóan. Tíz oligonukleotidot szintetizáltunk, amelyek öt primer-párból álltak: APCR1-vla1, vla2-vla3, vla4-vla5, vla6-vla7 és vla8-APCR4 (3. táblázat és 28. ábra). A szomszédos párok között legalább 21 bázisból álló átfedő szekvencia volt (28. ábra). Az APCR1 és APCR4 a szegélyező pUC19-vektorszekvenciákhoz képes hibridizálódni. A mutagén primereket úgy terveztük, hogy 5'-végük közvetlenül követte egy kodon ide-oda mozgó helyzetét. Ezt a stratégiát alkalmaztuk annak kivédésére, hogy a mutagén primerrel komplementer szál 3'-végéhez a DNS-polimeráz a PCR alatt feleslegesen hozzáadjon egy nukleotidot [Sharrocks, A.

D. és Shaw. P. E., Nucl. Acids Res. 20, 1147 (1992)]. A megfelelő primer-párokat (egyenként 0,2 μ M) kombináltunk 10 ng „B”-verziójú, átalakított humán L25V_L-régiót kódoló cDNS-el, és 1 egység AmpliTaq (Perkin Elmer Cetus) DNS-polimerázzal, 50 μ l PCR-pufferben, amely 10 mM Tris-HCl-ot (pH 8,3), 50 mM KCl, 200 μ M dNTP-eket és 1,5 mM MgCl₂-ot tartalmazott. Ezt ásványi olajjal felülrétegeztük, és PCR-t végeztünk 25 ciklusban, az egyes ciklusok az alábbi lépésekből álltak: denaturációs lépés 94°C-on, 1 percig, primer-összehibridizálási lépés 55°C-on, 1 percig, és lánchosszabbítási lépés 72°C-on, 2 percig. Ezt követte egyetlen ciklus, amelyben egy további lánchosszabbítási lépés volt 72°C-on, 10 percig, majd lehűtés 4°C-ra. A primer-összehibridizálási és lánchosszabbítási lépések közötti idő 2,5 perc volt. Az öt reakcióból származó termékeket (A, B, C, D és E) azután gélelektroforézissel tisztítottuk, majd DNS-elúció következett „Wizard PCR preps” (Promega) alkalmazásával. A-, B-, C-, D- és E-jelű PCR-termékeket összeállítottuk komplementaritásuk szerint. Egy második PCR-reakciósorozatban B és C, valamint D és E (egyenként 50 ng) PCR-termékeket hozzáadtunk 50 μ l PCR-reakcióhoz (a fentebb leírtak szerint), amely 1 egység AmpliTaq (Perkin Elmer Cetus) DNS-polimerázt tartalmazott. A reakciósorozat 20, fentebb ismerttetett ciklusból állt, kivéve azt, hogy az összehibridizálási hőmérsékletet 60°C-ra emeltük. A harmadik PCR-reakciósorozatban, F- és G-jelű PCR-termékeket PCR-amplifikáltunk, 1 μ l-t használtunk az előző PCR-reakcióból és a megfelelő PCR-primereket (vla2-vla5 vagy vla6-APCR4). A PCR-reakciók 1 egység AmpliTaq DNS-polimerázt tartalmaztak 50 μ l PCR-reakcióban (a fen-



tebb leírtak szerint), és 25 ciklusban amplifikáltunk, mint az első szakaszban. A negyedik PCR-reakciósorozatban a H-jelű PCR-terméket amplifikáltuk, 1-1 μ l-t alkalmazva az előző PCR-reakcióból és a PCR-primerek közül a vla2-APCR4-párt. Végül, A és H PCR-termékeket összeállítottuk komplementaritásuk szerint, a fentebb leírtakhoz hasonló kétlépéses PCR-reakcióban, amelyben terminális primerként RSP-t és UP-t alkalmaztunk. A teljesen összeállított fragmentum megfelelt az egész, vezetőszekvenciát tartalmazó, átalakított humán F19 V_L-régiónak, melyet HindIII- és BamHI-enzimekkel emésztettünk, és pUC19-be klónoztunk szekvenálás céljából. A pontos DNS-szekvenciát tartalmazó klón jelölése: reshF19La (29. ábra), és azután ezt pKN100-jelű eukarióta expressziós vektorba szubklónoztuk. A reshF19La DNS-szekvenciáját pKN100-ba szubklónozva bemutatjuk a 30. ábrán.

Az átalakított, humán F19 V_L-régiót (L_B) az La-ra leírt vázlat szerint állítottuk elő, de vla4- és vla7-primereket vlb4- és vlb7-primerekkel helyettesítettük (3. táblázat), a leírt sorrendben. Az L_B DNS-szekvenciáját bemutatjuk a 29. ábrán.

Az átalakított humán F19V_L-régió (L_C) harmadik verzióját QuikChangeTM, Stratagene cégtől származó, helyspecifikus mutagenesis-reagenskészlet alkalmazásával állítottuk elő. A QuikChange helyspecifikus mutagenesis módszerét a gyártó utasításai szerint végeztük, dupla szálú DNS-templátként reshF19La alkalmazásával pKN100-vektorban. F19Lc-szensz és F19Lc-antiszensz, mutagén primereket (3. táblázat) terveztünk erre az eljárásra, a gyártó utasításai szerint. Röviden összefoglalva, mindkét mutagén primer tartalmazta a kívánt pontmutációt (a Kabat-helyzetben, a 49.



pozíciónak (Phe) megfelelő TTT-kódon meg van változtatva Tyr-t kódoló TAT-ra), és az L_A szemközti szálain lévő, ugyanilyen szekvenciához van hibridizálva pKN100-vektorban. A pontmutációt az egész V_L -régió DNS-szekvenálásával igazoltuk. Az L_C DNS-szekvenciáját bemutatjuk a 29. ábrán. Hogy kizárjuk annak valószínűségét, hogy random mutációk történjenek a pKN100-ban a PCR-reakció alatt, az V_L -régiót kihasítottuk a pKN100-vektorból HindIII/BamHI-fragmentumként, és újra szubklónoztuk módosítatlan pKN100-vektorba, amelyet előzőleg ugyanezen két restrikciós enzimmel emésztettünk.

3. TÁBLÁZAT: Átalakított, humán F19 könnyű lánc variábilis régióinak előállítására szolgáló PCR-primerek

1. Primerek az „A”-verzió szintéziséhez

F19v1a1 (36 tag):

5' -GTCATCACAATGTCTCCGGAGGAACCTGGAACCCAG-3'

F19v1a2 (29 tag):

5' -CTCCGGAGACATTGTGATGACCCAATCTC-3'

F19v1a3 (45 tag):

5' -GAATATAAAAGGCTCTGACTGGACTTGACAGTTGATGGTGGCCCTC-3'

F19v1a4 (72 tag):

5' -CAGTCAGAGCCTTTTATATTCTAGAAATCAAAGAACTACTTGGCCTGGTAT
CAGCAGAAACCAGGACAGCC-3'

F19v1a5 (44 tag):

5' -ACCCCAGATTCCCTAGTGCTAGCCCAAAGATGAGGAGTTTGGG-3'

F19v1a6 (67 tag):

5' -TAGCACTAGGGAATCTGGGGTACCTGATAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTTTG



GGACAGACTTCACCCTC-3'

F19v1a7 (53 tag):

5' -GTCCCTTGTCCGAACGTGAGCGGATAGCTAAAATATTGCTGACAGTAATAAAC-3'

F19v1a8 (33 tag):

5' -GCTCACGTTCGGACAAGGGACCAAGGTGGAAAT-3'

2. Primerek a „B”-verzió szintéziséhez

F19v1b4 (72 tag):

5' -CAGTCAGAGCCTTTTATATTCTAGAAATCAAAAGAACTACTTGGCCTGG

TTCCAGCAGAAACCAGGACAGCC-3'

F19v1b7 (57 tag):

5' -GTCCCTTGTCCGAACGTGAGCGGATAGCTAAAATATTGCTGACAGTCATA

AACTGCC-3'

3. Primerek a „C”-verzió szintéziséhez

F19Lc-szensz (34 tag):

5' -CCCAAACCTCCTCATCTATTGGGCTAGCACTAGGG-3'

F19Lc-antiszensz (34 tag):

5' -CCCTAGTGCTAGCCCAATAGATGAGGAGTTTGGG-3'

4. Primerek, amelyek a szegélyező PUC19-vektor szekvenciáihoz képesek hibridizálódni

APCR1 (17 tag, szensz primer): 5' -TACGCAAACCGCCTCTC-3'

APCR4 (18 tag, antiszensz primer): 5' -GAGTGCACCATATGCGGT-3'

RSP(-24) (16 tag, szensz primer): 5' -AACAGCTATGACCATG-3'

UP(-40) (17 tag, antiszensz primer): 5' -GTTTTCCCAGTCACGAC-3'

4. példa

Átalakított, humán F19 könnyű lánc A - E- (H_A - H_E) verzióinak előállítása

Előállítottuk átalakított, humán F19 V_H -régiók (H_A) „A”-ver-



zióját olyan PCR-eljárás alkalmazásával, amely megegyezett az átalakított, humán F19 V_L-régió (L_A) „A” verziójának előállítására leírtakkal (31. ábra). A templát DNS átalakított, humán 226 V_H „A”-verziója volt [Léger, O.J.P. et al., Hum. Antibod. 8, 3 (1997)]. Hat PCR-primert terveztünk és szintetizáltunk humán F19 V_H-régió „A”-verziójának előállítására (4. táblázat). A, B, C és D PCR-termékekhez jutottunk, ha PCR-primer-párként APCR1-Vha1-et, Vha2-Vha3-at, Vha4-Vha5-öt és Vha6-APCR4-et alkalmaztuk, ebben a sorrendben. A PCR körülményei lényegében ugyanazok voltak, mint a humán F19 V_L-régió előállítására leírtak. A hibátlan DNS-szekvenciát tartalmazó klónt reshF19Ha-nak jelöltük (32. ábra), és azután pG1D105-jelű, eukarióta expressziós vektorba szubklónoztuk. A pG1D105-be klónozott reshF19Ha DNS-szekvenciáját bemutatjuk a 33. ábrán.

Az átalakított, humán F19 V_H-régió (H_C) harmadik verzióját az La-ra leírt vázlat szerint állítottuk elő, de Vha4-primert Vhc4-primerrel helyettesítettük (4. táblázat), a leírt sorrendben. A H_C DNS-szekvenciáját bemutatjuk a 32. ábrán. Az átalakított, humán F19 V_H-régió második (H_B) és negyedik (H_D) verzióját Kamman és munkatársai által leírt PCR-mutagenézis módszerekre alapozva állítottuk elő [Kamman et al., Nucl. Acids Res. 17, 5404 (1989)]. H_B és H_D esetén F19VHbd6 mutagén primert (Tyr-91-ről Phe-91-re, 4. táblázat) alkalmaztunk APCR4-el párosítva PCR-reakciókban, templát-DNS-ként H_A-t és H_C-t alkalmazva, ebben a sorrendben. VHb és VHD PCR-termékeket PstI és BamHI restriktációs enzimekkel emésztettük, és előzőleg ugyanezzel a két restriktációs enzimmel emésztett reshF19Ha-ba és reshF19Hc-be szubklónoztuk, ebben a sorrendben. H_B és H_D DNS-szekvenciáit bemutatjuk a 32. ábrán.



Az átalakított, humán F19 V_H-régió „E”- (H_E) verzióját Kamman és munkatársai által leírt, már említett PCR-mutagenézismódszerekre alapozva állítottuk elő [Kamman et al., mint fent]:

A reshF19He esetén az F19MscIHe-jelű mutagén primert (5. táblázat) alkalmaztuk F19V_HHindIII-primerrel (5. táblázat) párosítva a PCR-reakciókban, templát DNS-ként pgld105-jelű expressziós vektorba klónozott H_C-t alkalmaztunk. A megfelelő primer-párokat (egyenként 0,2 µM) kombináltuk 10 ng átalakított humán 226 V_H-régió „A”-verziójának cDNS-ével, 100 µl PCR-pufferben, amely 10 mM KCl-ot, 10 mM ammónium-szulfátot, 20 mM Tris-HCl-ot (pH 8,8), 2 mM magnézium-szulfátot, 0,1% Triton X-100-at és 200 µM dNTP-ket tartalmazott. A reakciókeverékeket felülrétegeztük ásványi olajjal, és 94°C-on tartottuk 5 percre. Azután hozzáadtunk 1 egység „Deep Vent” DNS-polimerázt (New England Biolabs) [“Hot start” PCR; Chou Q. et al., Nucl. Acids Res. 20, 1717 (1992)], és 25 ciklusból álló PCR-t végeztünk „TRIO-Thermoblock” ciklizáló termosztátban (Biometra, Göttingen, Németország). Az egyes ciklusok az alábbi lépésekből álltak: denaturációs lépés 94°C-on, 1 percig, primer-összehibridizálási lépés 70°C-on, 1 percig, és lánc-hosszabbítási lépés 72°C-on, 2 percig. Ezt követte egyetlen ciklus, amelyben egy további lánc-hosszabbítási lépés volt 72°C-on, 10 percig, majd lehűtés 4°C-ra. A PCR-termékeket azután extraháltuk és TAE 1,4%-os standard agaróz-gélen tisztítottuk, QIAquickTM gél-extrakciós reagenskészlet alkalmazásával, a gyártó utasításait követve (QIAGEN, Ltd., UK). Azután a V_HHe PCR-terméket MscI- és HindIII-jelű restrikciós enzimekkel emésztettük, és pgld105-be klónozott, reshF19Hc-be ligáltuk, melyet előzőleg ugyanezzel a két restrikciós enzimmel emésztettünk. Az MscI restrikciós



hasítóhely egyedi módon megtalálható az átalakított humán F19 V_H-régió valamennyi verziójában, és nincs jelen a pgld105 expresziós vektorban. A HindIII restrikciós hely egyetlen hasítóhelyként van jelen pgld105-ben, V_H immunoglobulin-gének klónozására. Elektroporáció-kompetens XL-1 Blue E. coli sejteket transzformáltunk 1 l ligált DNS-el, és ampicillint tartalmazó agaróz-tálcákra szélesztettük. Azután direkt PCR-rel szűrtük a kolóniákat inszertumok jelenlétére és helyes méretére [Güssow, D. és Clackson T., Nucl. Acids Res. 17, 4000 (1989)] HCMi- és Huc 1-primerekkel, melyek a szegélyező pgld105-vektorszekvenciákhoz képesek hibridizálódni (5. táblázat). Pozitív kolóniákhoz származó DNS-t preparáltunk „Plasmid Midi kit” alkalmazásával, a gyártó (QIAGEN Ltd., UK) utasításait követve. DNS-szekvenálást a didezoxi-láncterminációs módszerrel végeztük [Sanger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463 (1977)], közvetlenül cirkuláris vektor-DNS-ből, szokásos hődenaturáció [Andersen, A. et al., Biotechniques 13, 678 (1992)] és Sequenase 2.0 (USB, Cleveland, OH) alkalmazásával. A reshF19He DNS-szekvenciáját bemutatjuk a 32. ábrán.

4. TÁBLÁZAT: Átalakított, humán F19 nehéz láncban lévő variábilis régió A-D verzióinak előállítására szolgáló PCR-primerek

1. Primerek az „A”-verzió szintéziséhez

F19vha1 (46 tag):

5' -GTGTATTCAGTGAAGGTGTATCTACTAGTTTTACAGCTGACTTTCAC-3'

F19vha2 (53 tag):

5' -TAGTAGATACACCTTCACTGAATACACCATACTGGGTTAGACAGG

CCCCTG-3'

F19vha3 (71 tag):



5' -CCCTTGAACCTTCTGGTTGTAGTTAGGAATACCATTGTTAGGATTAATACC
TCCTATCCACTCCAGCCTTTG-3'

F19vha4 (71 tag):

5' -TAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCCGGGCCACCTTGACCGTAGGCAA
GTCTGCCAGCACCGCCTACATGG-3'

F19vha5 (63 tag):

5' -GCATGGCCCTCGTCGTAACCATAGGCGATTCTTCTTCTGGCGCAGTAGT
AGACTGCAGTGTCC-3'

F19vha6 (48 tag):

5' -CTATGGTTACGACGAGGGCCATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAAC-3'

2. Primerek a „C”-verzió szintéziséhez

F19vhc4 (71 tag):

5' -TAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCCGGGTCACCATCACCGTAGACA
CCTCTGCCAGCACCGCCTACATGG-3'

3. Primerek a „B”- és „D”- verzió szintéziséhez

F19vhbd6 (27 tag):

5' -GGACACTGCAGTCTACTTCTGCGCCAG-3'

4. Primerek, amelyek a szegélyező PUC19-vektor szekvenciáihoz képesek hibridizálódni

APCR1 (17 tag, szensz primer): 5' -TACGCAAACCGCCTCTC-3'

APCR4 (18 tag, antiszensz primer): 5' -GAGTGCACCATATGCGGT-3'

5. TÁBLÁZAT: Átalakított, humán F19 nehéz láncban lévő variábilis régió E-verziójának előállítására szolgáló PCR-primer

1. Primer az „E”-verzió szintéziséhez

F19MscIHe (65 tag, antiszensz):

5' -CCTTTGGCCAGGGGCCTGTCTAACCCAGTGTATGGTGTATTTCAGTGAAGGTG

MscI

TATCCACTAGTTTCCACTAGTTT-3'

2. Primerek, amelyek a szegélyező pgld105-jelű emlős expressziós



vektor szekvenciáihoz képesek hibridizálódni

HCMi (28 tag, szensz primer): 5' -GTCACCGTCCTTGACACGCGTCTCGGGA-3'

Hucyl (17 tag, antiszensz primer): 5' -TTGGAGGAGGGTGCCAG-3'

5. példa

Átalakított, humán F19-antitest koncentrációi COS-sejtek felülűszóiban

COS-sejteket transzfektáltunk átalakított, humán F19-antitest-konstrukciók sorozatával, és megmértük a humán antitest-koncentrációt IgG1/Kappa ELISA alkalmazásával, a 2. példában leírtak szerint.

6. TÁBLÁZAT: Átalakított, humán F19-antitest koncentrációi COS-sejtek felülűszóiban

Transzfektált antitest-komponensek		Humán γ 1/K
Nehéz lánc	Kappa könnyű lánc	Koncentráció (μ g/ml)
H _A	L _A	2,50
H _A	L _B	0,18
H _B	L _A	1,25
H _B	L _B	0,10
H _D	L _A	1,15
H _D	L _B	0,18
H _A	L _A	1,50
H _A	L _C	1,56
H _C	L _A	1,47
H _C	L _C	1,97
cF19	L _A	1,54
cF19	L _B	0,07
cF19	L _C	2,14

7. TÁBLÁZAT: Átalakított, humán F19-antitest koncentrációi COS-



sejtek felülúszóiban

Transzfektált antitest-komponensek		Humán $\gamma 1/K$
Nehéz lánc	Kappa könnyű lánc	Koncentráció ($\mu\text{g/ml}$)
H_A	L_A	2,00
H_A	L_C	2,50
H_C	L_A	2,90
H_C	L_C	3,00
H_E	L_A	2,80
H_E	L_C	3,50

RNS-splicing események, amelyek szükségesek immunoglobulin-gének expressziójához emlős sejtekben

Mind a pKN100, mind a pglD105 emlős expressziós vektor rendelkezik intronnal a variábilis és konstans régiók között, amely kiesik a génexpresszió folyamata alatt, létrehozva messenger RNS-t. A splicing eseményt bemutatjuk a 34. ábrán, amely DNS-rekombinációból áll a nehéz vagy könnyű lánc splicing-donorhelye és az immunoglobulin splicing-akceptorhelye között.

6. példa

cF19 és $L_A H_C$ kötődésének vizsgálata FAP-ot expresszáló humán sejtekhez áramlási citometriás analízissel

Azt teszteltük, hogy az $L_A H_C$ milyen mértékben képes rekombináns illetve sejtfelszínen endogén módon expresszálódott FAP-hoz kötődni.

A példát $L_A H_C$ celluláris FAP-hoz való kötődésének meghatározása céljából végeztük. Celluláris célpontként FAP-t természetes

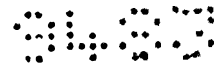


körülmények között expresszázó MF-SH humán tumorsejteket [Shirasuma, K. et al., Cancer 55, 2521-32 (1985)] és FAP-transzfektált humán tumorsejtvonalakat alkalmaztunk. L_AH_C -t citofluorimetriás vizsgálati eljárásokban tanulmányoztuk célsejtekhez való direkt kötődésének elemzésével, valamint rágcsálóó-eredetű F19 vagy kiméra cF19 anti-FAP-antitestek kötődésére kifejtett gátló hatás által.

Az alkalmazott antitestek és sejtvonalak az alábbiak voltak: F19 (rágcsálóóeredetű anti-humán FAP antitest, IgG1-alosztály), mIgG (rágcsálóóeredetű immunoglobulin, IgG-osztály), cF19 (kiméra monoklonális anti-humán FAP-antitest, IgG1-alosztály), L_AH_C (átalakított monoklonális anti-humán FAP-antitest, IgG1-alosztály), hIgG1 (humán immunoglobulin, IgG1-alosztály), MF-SH (humán malignus fibrosus hisztiocitóma sejtvonal), HT-1080 (humán fibroszarkóma sejtvonal), HT-1080FAP 33. klón (humán FAP-t kódoló cDNS-sel transzfektált HT-1080-sejtvonal). Az antitesteket a 8. és 12. példában leírtak szerint biotiniláltuk.

L_AH_C direkt kötődése humán tumorsejtvonalak felszínén lévő FAP-hoz

A vizsgált tumorsejtvonalból 5×10^5 sejtet inkubáltunk jégen, 30 percig, jelölt koncentrációjú teszt vagy kontroll antitesttel, 0,2 ml össztérfogatban, foszfát-pufferolt sóoldatban (PBS), melyet kiegészítettünk 1% marhaszérum-albuminnal (BSA). Ezt követően a sejteket kétszer mostuk 2 ml PBS-el, felszuszpendáltuk 0,2 ml 1% BSA-val kiegészített, 0,2 ml PBS-ben, és szekunder reagensként hozzáadtunk 1:20 hígításban egérben termeltetett, anti-humán, FITC-jelölt IgG-t (Dianova), és további 30



percig inkubáltuk jégen.

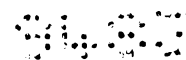
Más módszer szerint, a vizsgált tumorsejtvonalból 5×10^5 sejtet inkubáltunk jégen, 30 percig, jelölt koncentrációjú, biotinnal jelölt cF19-el, 0,2 ml össztérfogatban, PBS-ben, melyet kiegészítettünk 1% BSA-val. Ezt követően a sejteket kétszer mostuk 2 ml PBS-el, felszuszpendáltuk 0,2 ml 1% BSA-val kiegészített, 0,2 ml PBS-ben, és szekunder reagensként hozzáadtunk 1:40 hígításban sztreptavidin-FITC-t (Dianova), és további 30 percig inkubáltuk jégen.

A sejteket ismét mostuk kétszer 2 ml PBS-el, felszuszpendáltuk 0,5 ml össztérfogat PBS-ben, amely 1% paraformaldehiddel (PFA) volt kiegészítve, és jégen tartottuk. Egyetlen sejt fluoreszcenciát citofluorimetriásan határoztuk meg, celluláris zöld fluoreszcencia analízisével 488 nm-en, EPICS XL (Coulter) fluoreszcencia-aktivált sejtanalizátorban.

L_AH_c kompetíciója biotinilált cF19-el FAP-t expresszáló humán sejtvonalakon lévő sejtfelszíni FAP-kötésért

A vizsgált tumorsejtvonalból 5×10^5 sejtet inkubáltunk jelölt mennyiségű teszt vagy kontroll antitesttel, melyet 1 µg/ml biotinnal jelölt cF19-antitesttel együtt adtunk hozzá. Ezt követően a sejteket kétszer mostuk 2 ml PBS-el, felszuszpendáltuk 0,2 ml 1% BSA-val kiegészített, 0,2 ml PBS-ben, és szekunder reagensként hozzáadtunk 1:40 hígításban sztreptavidin-FITC-t (Dianova), és további 30 percig inkubáltuk jégen.

A sejteket azután mostuk kétszer 2 ml PBS-el, felszuszpendáltuk 0,5 ml össztérfogatú, 1% PFA-val kiegészített PBS-ben és jégen tartottuk. Egyetlen sejt fluoreszcenciát citofluorimetriásan



határoztuk meg, celluláris zöld fluoreszcencia analízásával 488 nm-en, EPICS XL (Coulter) fluoreszcencia-aktivált sejtanalizátorban.

A cF19 és az L_AH_c egyaránt koncentrációfüggő módon, specifikusan képes kötődni FAP-transzfektált HT-1080FAP 33. klónjának humán tumorsejtjeihez (8. táblázat). Nem detektáltunk kötődést FAP-negatív HT-1080-sejtekhez (9. táblázat). cF19 és L_AH_c egyaránt koncentrációfüggő módon képes kötődni olyan humán MF-SH-sejtekhez, amelyek endogén módon expresszálnak FAP-ot (10. táblázat).

Biotinilált cF19 képes kötődni humán HT-1080FAP 33. klónjához (11. táblázat), koncentrációfüggő módon. Nem detektáltunk kötődést FAP-negatív HT-1080-sejtekhez (12. táblázat).

Biotinilált cF19 kötődését HT-1080FAP 33. klónjához gátolta mind a jelöletlen cF19, mind a jelöletlen L_AH_c (13. táblázat).

Kimutattuk, hogy a cF19-jelű, kiméra anti-humán FAP monoklonális antitest, valamint az L_AH_c átalakított humán anti-humán FAP monoklonális antitest (10. példa) közvetlenül képes kötődni humán sejtvonalakon expresszált FAP-hoz, akár endogén expresszáldott ez a fehérje, akár azt kódoló cDNS-el transzfektáltuk. Kimutattuk, hogy az a kötődés koncentrációfüggő. Biotinilált cF19 kötődése gátolható jelöletlen cF19-el és jelöletlen L_AH_c -vel.

Citofluorimetriás technológiát, direkt kötődést, valamint specifikus kötőreagensek gátlását alkalmazva kimutattuk, hogy kiméra cF19 és átalakított L_AH_c humán monoklonális antitestek sejtfelszínen expresszáldott FAP-ra specifikusak.



8. táblázat: Anti-FAP-antitestek kötődése HT-1080FAP 33.

klónjának sejtjeihez

Antitest koncentrációja	Átlagos fluoreszcencia-intenzitás		
	hIgG1	cF19	L _A H _C
ng/ml			
500,0	0,12	6,65	2,76
100,0	0,12	1,63	0,66
20,0	0,12	0,43	0,22
4,0	0,12	0,17	0,15
0,8	0,12	0,14	0,13

9. táblázat: Anti-FAP-antitestek kötődése nem-transzfectált HT-1080-sejtekhez

Antitest koncentrációja	Átlagos fluoreszcencia-intenzitás		
	hIgG1	cF19	L _A H _C
ng/ml			
500,0	0,11	0,11	0,12
100,0	0,11	0,11	0,11
20,0	0,11	0,11	0,12
4,0	0,11	0,11	0,12
0,8	0,11	0,11	0,11

10. táblázat: Anti-FAP-antitestek kötődése MF-SH-sejtekhez

Antitest koncentrációja	Átlagos fluoreszcencia-intenzitás		
	hIgG1	cF19	L _A H _C
ng/ml			
4000	0,6	3,6	2,8
2000	n.d.	3,3	2,5
1000	n.d.	2,4	1,9
500	n.d.	1,8	1,3

n.d.: nem végeztük el



11. táblázat: Biotinilált cF19-antitest kötődése HT-1080FAP 33. klónjának sejtjeihez

Antitest koncentrációja	Átlagos fluoreszcencia-intenzitás	
	Biotinilált hIgG1	Biotinilált cF19
ng/ml		
5000,0	0,2	36,5
1000,0	0,2	18,1
200,0	0,2	4,5
40,0	0,2	1,3
8,0	0,2	0,5
1,6	0,3	0,3

12. táblázat: Biotinilált cF19-antitest kötődése nem-transz-fektált HT-1080-sejtekhez

Antitest koncentrációja	Átlagos fluoreszcencia-intenzitás	
	Biotinilált hIgG1	Biotinilált cF19
ng/ml		
5000,0	0,1	0,1
1000,0	0,1	0,1
200,0	0,1	0,1
40,0	0,1	0,1
8,0	0,1	0,1
1,6	0,1	0,1



13. táblázat: Anti-FAP antitestek kompetíciója biotinilált cF19 kötődésével HT-1080FAP 33. klónjának sejtjeihez

Kompetitor antitest	Kompetitor antitest	Átlagos fluoreszcencia-intenzitás
nincs	0,00	11,2
hIgG1	1,00	9,0
hIgG1	3,16	11,3
hIgG1	10,00	9,8
hIgG1	31,66	10,3
cF19	1,00	7,5
cF19	3,16	4,8
cF19	10,00	1,3
cF19	31,66	1,2
L _A H _C	1,00	8,0
L _A H _C	3,16	5,5
L _A H _C	10,00	2,9
L _A H _C	31,66	1,7

Biotinilált cF19-et 1 µg/ml koncentrációban alkalmaztunk a 13. táblázatban bemutatott valamennyi kísérletben.

7. példa

L_AH_C monoklonális antitest in vitro immuneffektor funkciói

Ezt a kísérletet abból a célból végeztük, hogy meghatározzuk, az L_AH_C monoklonális antitest (mAb) milyen mértékben képes fibroblaszt aktivációs antigént (FAP-t) expresszáló célpontokat specifikusan lizálni humán komplement vagy humán mononukleáris leukociták jelenlétében.

Elsősorban azt vizsgáltuk, hogy az L_AH_C képes-e olyan HT-1080FAP 33. klónjának sejtjei elleni citotoxikus hatásokat



mediálni, amelyek humán FAP-ot expresszálnak a felszínen. A citotoxicitást in vitro határoztuk meg, az alábbi megközelítést alkalmazva: ^{51}Cr -jelölt célsejteket inkubáltunk $\text{L}_\text{A}\text{H}_\text{C}$ jelenlétében, effektorként humán szérumot alkalmaztunk, amely komplement vagy humán MNC (perifériás vérből származó mononukleáris sejtek) forrásaként szolgált. ^{51}Cr felszabadulását mértük a célsejt-lízis mértékeként.

Az alkalmazott antitestek és sejtvonalak az alábbiak voltak: $\text{L}_\text{A}\text{H}_\text{C}$ (átalakított humán anti-humán FAP IgG1-antitest), hIgG1 (humán IgG1 izotípus-kontroll), 3S193 (rágcsálóból származó monoklonális anti-Lewis^y IgG3 antitest), mIgG (rágcsálóból származó IgG-kontroll), HT-1080 (humán fibroszarkóma), HT-1080FAP 33. klónja (HT1080, humán FAP-ot kódoló cDNS-el transzfektálva), MCF-7 (humán mell-adenokarcinóma sejtvonal).

Célsejtek komplement-mediált lízise $\text{L}_\text{A}\text{H}_\text{C}$ -vel

Tumorsejteket radioaktívan jelöltünk úgy, hogy RPMI1640-tápközegben inkubáltuk azokat $100\ \mu\text{Ci}$ ^{51}Cr (NEN)-el 37°C -on egy óra hosszáig. Ezt követően a sejteket kétszer mostuk ^{51}Cr -mentes tápközegben, és felfuszpendáltuk 2×10^5 sejt/ml koncentrációban.

Komplement-forrásként humán szérumot frissen preparáltunk különböző önkéntesekből származó vérből. Vért a kari vénába szűrással vettünk, szobahőmérsékleten hagytuk megalvadni egy óra hosszáig, és 4°C -on tároltuk egy éjszakán át. A szérumot centrifugálással elkülönítettük és eltávolítottuk az üledéktől.

Az vizsgált antitestet törzsoldatból hígítottuk megfelelő koncentrációra RPMI1640 sejttenyészet-tápközegben.

Feltüntetett sejtvonalból származó, 1×10^5 radioaktívan je-



lőtt tumorsejtet 2 óra hosszáig, 37 C-in inkubáltunk egy inkubátorban (95% levegő és 5% szén-dioxid) különböző koncentrációjú teszt vagy kontroll antitestek és 25 térf.% humán szérum jelenlétében, ez utóbbi szolgált humán komplement forrásaként. Az inkubálást U-alakú, 96 mérőhelyet tartalmazó tálcákban végeztük, 200 l össtérfogatú RPMI1640-ben és három párhuzamost indítottunk. Az inkubációs idő után a tálcákat centrifugáltuk, 100 l felülúszót eltávolítottunk, és a radioaktivitást meghatároztuk gamma-számlálóban. A beépült radioaktivitás teljes mennyiségét 10^4 célsejt mérésével határoztuk meg. A spontán felszabadulást olyan aktivitásként definiáltuk, amely a célsejtekből szabadult fel mindkét antitest és komplement nélkül a leírt inkubációs idő alatt.

A specifikus lízist az alábbiak szerint számítottuk:

$$\text{spec. lízis (\%-ban)} = \frac{(\text{minta akt.}) - (\text{spontán felszab. akt.})}{(\text{max. akt.}) - (\text{spontán felszab. akt.})} \times 100$$

L_AH_c antitest-függő celluláris toxicitása (ADCC)

Tumorsejteket radioaktívan jelöltünk úgy, hogy RPMI1640-tápközegben inkubáltuk azokat 100 μCi ^{51}Cr -al 37°C-on egy óra hosszáig. Ezt követően a sejteket kétszer mostuk ^{51}Cr -mentes tápközegben, és felfuszpendáltuk 2×10^5 sejt/ml koncentrációban.

MNC-ket (perifériás vérből származó mononukleráris sejteket) preparáltunk perifériás vérből, melyet egészséges humán önkéntesektől, a kari vénába szűrással vettünk. A véralvadást 20% citrát-puffer hozzáadásával gátoltuk. 4 ml vérből származó MNC-t centrifugálással (30 percig, 400 g-n és szobahőmérsékleten) tisztítottunk 3 ml limfocita-preparáló tápközegen (Boehringer

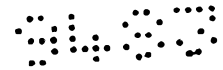


Mannheim, Germany). MNC-t (perifériás vérből származó mononukleáris sejteket) kivettük a gradiensből, háromszor mostuk és RPMI1640-el hígítottuk a megfelelő koncentrációra. Limfoctaktivált killer-sejtek (LAK) MNC-ből (perifériás vérből származó mononukleráris sejtek) származtak úgy, hogy 5 napig inkubáltuk azt 37°C-on, 95% levegőt és 5% szén-dioxidot tartalmazó inkubátorban, $1,3 \times 10^6$ sejt/ml kezdeti sűrűséggel, 100 U rekombináns humán interleukin-2 (IL-2) jelenlétében. Az vizsgált antitestet törzsoldatból hígítottuk megfelelő koncentrációra RPMI1640 sejtenyészet-tápközegben.

Feltüntetett sejtvonalból származó, 1×10^4 radioaktívan jelölt tumorsejtet 5 óra hosszáig, 37°C-in inkubáltunk 5% szén-dioxid és különböző koncentrációjú teszt vagy kontroll antitestek és MNC jelenlétében. Az inkubálást U-alakú, 96 mérőhelyet tartalmazó tálcákban végeztük, 200 μ l össztérfogatú RPMI1640-ben és két párhuzamost indítottunk. Az inkubációs idő után a tálcákat centrifugáltuk, 100 μ l felülúszót eltávolítottunk, és a radioaktivitást meghatároztuk gamma-számlálóban. A beépült radioaktivitás teljes mennyiségét 10^4 célsejt mérésével határoztuk meg. A spontán felszabadulást olyan aktivitásként definiáltuk, amely a célsejtekből szabadult fel mindkét antitest és effektorsejtek nélkül a leírt inkubációs idő alatt.

A specifikus lízist az alábbiak szerint számítottuk:

$$\text{spec. lízis (\%-ban)} = \frac{(\text{minta akt.}) - (\text{spontán felszab. akt.})}{(\text{max. akt.}) - (\text{spontán felszab. akt.})} \times 100$$



Tumorsejtek antitest-mediált komplement-lízise

Nem figyeltünk meg L_AH_C -specifikus, komplement-mediált lízist (mint fentebb, az izotípus-kontroll esetén látható) HT-1080FAP 33. klónjának sejtjein, melyeket L_AH_C -vel kezeltünk 50 $\mu\text{g/ml}$ -ig (14. táblázat, 15.a táblázat).

Komplement forrásául szolgáló, humán szérum lítikus aktivitását kimutattuk MCF-7 humán mellkarcinóma-sejtek lízisével, 12,5 $\mu\text{g/ml}$ 3S193 jelenlétében, ami egy rágcsőeredetű, monoklonális anti-Lewis^y-antitest és ismeretes, hogy komplement-aktiváló képességgel rendelkezik (15.b táblázat).

Tumorsejtek antitest-mediált celluláris lízise

L_AH_C jelenlétében, egészen 10 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációig, nem detektáltunk L_AH_C -specifikus ADCC-t (antitest-függő celluláris toxicitást), humán MNC (16. táblázat) vagy humán LAK-sejtek (limfokin-aktivált killer sejtek, 17. táblázat) által mediálva, lízisként mérve HT-1080FAP 33. klónon, mint fentebb, az izotípus-kontroll esetén látható, 50:1 effektor-cél-aránynál.

Megfelelő in vitro vizsgálati eljárásokban, effektormechanizmusként humán komplementet vagy humán MNC-t alkalmazva, L_AH_C -jelű humán anti-FAP monoklonális antitest nem mutatott detektálható citotoxikus hatásokat, mint fentebb, az izotípus-kontroll esetén, tumor-sejtvonalként FAP-t expresszáló HT-1080FAP 33. klónra.



14. táblázat: HT-1080FAP, 33. klón, tumorsejtek specifikus komplement lízise (%-ban kifejezve) L_AH_C -vel mediálva

Humán szérum forrása	HT-1080 33. klón:	
Antitest-koncentráció	hIgG1 izotípus kontroll	L_AH_C
A 50 $\mu\text{g/ml}$	5	4
A 10 $\mu\text{g/ml}$	5	3
B 50 $\mu\text{g/ml}$	7	5
B 10 $\mu\text{g/ml}$	6	5
0 $\mu\text{g/ml}$	0	0

Inkubáció: 2 óra 37°C-on, komplement forrásként 25% szérumot alkalmazva A vagy B humán önkéntestől.

15.a táblázat: HT-1080FAP, 33. klón, tumorsejtek specifikus komplement lízise (%-ban kifejezve) L_AH_C -jelű humán anti-FAP monoklonális antitesttel mediálva

Humán szérum forrása: antitest koncentrációja	HT1080 33. klón	
	hIgG1	L_AH_C
A 10,00 $\mu\text{g/ml}$	2	1
A 2,50 $\mu\text{g/ml}$	2	2
A 0,60 $\mu\text{g/ml}$	1	1
A 0,15 $\mu\text{g/ml}$	1	2
A 0,00 $\mu\text{g/ml}$	2	2
B 10,00 $\mu\text{g/ml}$	2	2
B 2,50 $\mu\text{g/ml}$	2	2
B 0,60 $\mu\text{g/ml}$	2	2
B 0,15 $\mu\text{g/ml}$	2	2
B 0,00 $\mu\text{g/ml}$	2	2
C 10,00 $\mu\text{g/ml}$	2	2
C 2,50 $\mu\text{g/ml}$	1	1
C 0,60 $\mu\text{g/ml}$	1	1
C 0,15 $\mu\text{g/ml}$	2	1
C 0,00 $\mu\text{g/ml}$	3	3

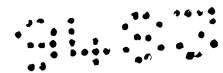
Inkubáció: 2 óra 37°C-on, komplement forrásként 25% szérumot alkalmazva A, B vagy C humán önkéntestől.



15.b táblázat: MCF-7 tumorsejtek specifikus komplement lízise (%-ban kifejezve) 3S193, rágcsálóból származó, anti-Lewis^y monoklonális antitesttel mediálva

Humán szérum forrása: antitest koncentrációja	MCF-7:	
	mIgG	3S193
A 10,00 µg/ml	0	21
A 2,50 µg/ml	1	21
A 0,60 µg/ml	0	21
A 0,15 µg/ml	1	18
A 0,00 µg/ml	0	0
B 10,00 µg/ml	1	13
B 2,50 µg/ml	0	17
B 0,60 µg/ml	1	18
B 0,15 µg/ml	1	15
B 0,00 µg/ml	0	0
C 10,00 µg/ml	1	22
C 2,50 µg/ml	0	23
C 0,60 µg/ml	1	26
C 0,15 µg/ml	1	20
C 0,00 µg/ml	1	1

Inkubáció: 2 óra 37°C-on, komplement forrásként 25% szérumot alkalmazva A vagy B humán önkéntestől.



16. táblázat: HT-1080FAP, 33. klón sejtjeinek ADCC-je (antitest-függő celluláris toxicitása) (specifikus lízise %-ban kifejezve) humán MNC (perifériás vérből származó mononukleáris sejtek) által, L_AH_C-vel mediálva

HT-1080FAP, 33. klón:

Antitest koncentrációja µg/ml-ben	HT1080FAP 33. klón	
	hIgG1	L _A H _C
10,00	2	2
2,50	2	2
0,60	2	2
0,15	3	3
0,00	3	3

Inkubáció: 5 óra 37°C-on, 10⁴ célsejt, és effektor:célsejt arány 50:1.

17. táblázat: HT-1080FAP, 33. klón sejtjeinek ADCC-je (antitest-függő celluláris toxicitása) (specifikus lízise %-ban kifejezve) humán LAK-sejtek (limfokin-aktivált killer sejtek) által, L_AH_C-vel mediálva

Antitest koncentrációja µg/ml-ben	HT1080FAP 33. klón	
	hIgG1	L _A H _C
10,00	12	14
2,50	14	17
0,60	14	21
0,15	15	21
0,00	14	14

Inkubáció: 5 óra 37°C-on, 10⁴ célsejt, és effektor:célsejt arány 50:1.



8. példa

Normál és neopláziás humán szövetekhez kötődött L_AH_C monoklonális antitest immunohisztokémiai analízise

Ezt a kísérletet humanizált L_AH_C-mAb normál és neopláziás humán szövetekhez való kötődési tulajdonságainak meghatározása céljából végeztük.

Az alábbi antitesteket alkalmaztuk: L_AH_C, cF19 és negatív kontrollként hIgG1 közvetlenül volt biotinilálva szakember által ismert módszerek alkalmazásával, amelyben 2,5-0,25 mg/ml-es koncentrációkat alkalmaztunk 2% BSA/PBS-ben (marhaszérum-albumin foszfát-pufferolt sóoldatban). Rágcsálóból származó F19 mAb-t F19-hibridóma szövettenyészet-felülszójában alkalmaztuk, 1:5 és 1:10 közötti hígításban, 2% BSA/PBS-ben.

Az alábbi reagenseket alkalmaztuk az immunokémiai vizsgálati eljárásokban: sztreptavidin-peroxidáz-komplex (Vector Labs, Burlingame, CA, USA), avidin-biotin-peroxidáz-komplex (Vector Labs.), biotinilált, lóban termeltetett, anti-egér (Vector Labs.), DAB (diamino-benzidin, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), Harris-féle hematoxylin.

Az alábbi frissen fagyasztott szövetmintákat vizsgáltuk: normál vastagbél, mell, tüdő, gyomor, hasnyálmirigy, bőr, gége, húgyhólyag, sima- és vázizom. A tesztelt tumorok: mell, vastagbél, tüdő, nyelőcső, méh, hasnyálmirigy, gyomor és fej és nyak.

Indirekt immunperoxidáz-eljárást végeztünk szakember által ismert módszer szerint [Garin-Chesa P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 7235-7239 (1990)] öt mikrométer vastagságú frissen fagyasztott metszeteken. Szubsztrátként DAB-ot alkalmaztunk az

utolsó reakcióban. A metszeteket Harris-féle hematoxilinnal utánszíneztük és antigénexpresszióra vizsgáltuk.

L_AH_C-expresszió normál humán szövetekben

A tesztelt normál szövetek negatívak voltak L_AH_C-expresszióra, kivéve a normál hasnyálmirigyet, amelyben a Langerhans-szigetekben (A-sejtek) pozitív endokrin sejtek alkészletét L_AH_C-, cF19- és F19-vel azonosítottuk (18. táblázat). Nem figyeltünk meg immunreaktivitást a negatív kontrollként alkalmazott hIgG1-el (humán immunoglobulin IgG1-alosztály).

L_AH_C-expresszió tumorokban

A tumormintákban L_AH_C, cF19 és F19 megkülönböztethetetlen expressziós mintázatot mutatott a tumoros stroma-fibroblasztokban. Erős és homogén expressziót találtunk a vizsgált esetek többségében, különösen mell, vastagbél, tüdő, hasnyálmirigy rákos mintáiban, és a tesztelt fejből és nyakból származó pikkelysejtes karcinómákban (SQCC) (19. táblázat). Nem figyeltünk meg immunreaktivitást a negatív kontrollként alkalmazott hIgG1-ben.

L_AH_C, cF19 és F19 immunreaktivitást mutatott tumoros stroma-fibroblasztokkal a tesztelt epitel rákos mintákban. L_AH_C vagy F19 nem mutatott immunreaktivitást normál szervből származó mesenchymájának fibrocitáival, sem normál kifejlett szerv parenchymalis sejtjeivel. Anti-FAP-immunreaktivitást csak hasnyálmirigyszigetekben lévő endokrin sejtek alkészletében figyeltünk meg, feltételezhetően glükagont termelő A-sejtekben és a kilenc vizsgált méh-mintából négyben, amelyek stroma-fibroblasztoknak felelnek meg ezekben a szövetekben.



L_AH_C immunhisztokémiai analízise normál humán szövetekben és FAP-t expresszáló humán karcinómákban L_AH_C , cF19 és rágcsálóból származó F19-mAb megkülönböztethetetlen kötési mintázatot mutatott.

18. táblázat: L_AH_C , cF19 és F19 mAb-k immunreaktivitása normál humán szövetekben

Szövet típusa	No.	BIBH 1	cF19	F19
Mell	4			
- Epitél sejtekhez tartozó ductus/acini		-	-	-
- Mioepitél sejtek		-	-	-
- Kötőszövet		-	-	-
- Véredények		-	-	-
Vastagbél	6			
- Lieberkühn-crypta		-	-	-
- Kötőszövet		-	-	-
- Nyirokszövet		-	-	-
- Simaizom		-	-	-
- Véredények		-	-	-
- Myentericys plexus		-	-	-
Tüdő	4			
Hörgő:				
- Bronchiális epitélium		-	-	-
- Hialin-porc		-	-	-
- Kötőszövet		-	-	-
- Nyálmirigyek		-	-	-
Alveolus:		-	-	-
- Pneumociták (I/II-típus)		-	-	-



- Alveoláris fagociták	-	-	-
- Alveoláris kapillárisok	-	-	-
Gyomor	3		
- Felszíni epitélium	-	-	-
- Gyomormirigyek:	-	-	-
-Chief-sejtek	-	-	-
- Parietalis (oxintikus) sejtek	-	-	-
- Mucosus sejtek	-	-	-
- Neuroendokrin sejtek	-	-	-
- Kötőszövet	-	-	-
- Véredények			
- Simaizom			
Nyelőcső	1		
- Felszíni epitélium	-	-	-
- Kötőszövet	-	-	-
Vékonybél	1		
- Villi&crypts epitélium	-	-	-
- Kötőszövet	-	-	-
- Simaizom	-	-	-
- Véredények	-	-	-
- Nyirokszövet	-	-	-
Húgyhólyag	2		
- Urotélium	-	-	-
- Kötőszövet	-	-	-
- Simaizom	-	-	-
- Véredények	-	-	-
Hasnyálmirigy	3		



- Epitél ductus	-	-	-
- Epitél acinus	-	-	-
- Langerhans-szigetek	-	-	-
B-sejtek	-	-	-
A-sejtek	+	+	+
D-sejtek	-	-	-
- Kötőszövet	-	-	-
- Véredények	-	-	-
- Idegek	-	-	-

Gége

1

- Pikkelyes epitélium	-	-	-
- Nyálmirigyek	-	-	-
- Kötőszövet	-	-	-
- Hialin-porc	-	-	-
- Véredények	-	-	-
- Vázizomzat	-	-	-

Nyirokcsomó

1

- Limfoid sejtek	-	-	-
- Nyirok sinusok	-	-	-
- Kötőszövet	-	-	-
- Véredények	-	-	-

Lép

1

- Vörös&fehér pulpa	-	-	-
- Sinusok	-	-	-
- Kötőszövet	-	-	-

Máj

1

- Hepatociták	-	-	-
- Epevezetékek	-	-	-



- Portalis triád		-	-	-
Csecsemőmirigy	2			
- Follikuláris epitélium		-	-	-
- Parafollikuláris epitélium		-	-	-
- Kötőszövet		-	-	-
Prosztatamirigy	1			
- Glanduláris epitélium		-	-	-
- Stroma		-	-	-
Herék	1			
- Seminiferus tubulusok		-	-	-
- Stroma		-	-	-
Petefészek	3			
- Tüszők		-	-	-
- Stroma		-	-	-
Méhnyak	1			
- Epitélium		-	-	-
- Stroma		-	-	-
Méh	9			
- Endometrium				
mirigyek		-	-	-
stroma		+#	+#	+#
véredények		-	-	-
Miometrium		-	-	-
Agykéreg	1			
- Neuronok		-	-	-
- Neuroglialis sejtek		-	-	-
- Véredények		-	-	-
Kisagy	1			



- Molekuláris réteg	-	-	-
- Granuláris sejtréteg	-	-	-
- Purkinje-sejtek	-	-	-
- Véredények	-	-	-
Bőr	3		
- Pikkelyes epitélium	-	-	-
- Melanociták	-	-	-
- Bőrfüggelék	-	-	-
- Kötőszövet	-	-	-
- Véredények	-	-	-

Acetonnal fixált, fagyasztott metszeteket avidin-biotin-komplex és immunoperoxidáz alkalmazásával teszteltük.

No.: Különböző tesztelt egyénekből származó szövetminták száma.

* A-sejtek azonosítása, morfológiára és a szigeteken belüli helyzetre alapozva.

Pozitív immunreaktivitás a stromában, 9 tesztelt mintából 4-ben. A pozitív minták a proliferatív endometrium korai (x2) és átmeneti (x2) fázisát jelentik.

9. példa

L_AH_C-kötődés fajspecifitása szövetmetszetekben

A kísérletet abból a célból végeztük, hogy meghatározzuk az L_AH_C reaktivitását egérből, patkányból, nyúlból és cynomolgus majmokból származó szövetekkel, immunohisztokémiai módszerek alkalmazásával.

Ezekben a tesztekben cF19-et és humán IgG1-et (hIgG1) is alkalmaztunk negatív kontrollként. Immunohisztokémiára alkalmazott



reagensek az alábbiak voltak: sztreptavidin-peroxidáz-komplex (Vector Labs., Burlingame, CA, USA), DAB (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) és Harris-féle hematoxin.

Az alábbi frissen fagyasztott, egérből, patkányból, nyúlból és cynomolgus majomból származó szövetmintákat teszteltük: agy, máj, tüdő, vese, gyomor, hasnyálmirigy, bél, csecsemőmirigy, bőr, izom, szív, lép, petefészek, méh és herék. Pozitív kontrollként normál humán hasnyálmirigyből és mellkarcinóma-mintákból származó metszeteket tartalmaztak az egyes vizsgálati eljárások.

Immunohisztokémia

Szakember által ismert, közvetett immunoperoxidáz-módszert végeztünk, leírt eljárás szerint [Garin-Chesa P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 7235-7239 (1990)], öt mikrométer vastagságú frissen fagyasztott metszeteken. Szubsztrátként DAB-ot alkalmaztunk az utolsó reakcióban. A metszeteket Harris-féle hematoxilinnal utánszíneztük és antigénexpresszióra vizsgáltuk.

A tesztelt normál szövetek nem reagáltak L_AH_c -vel vagy cF19-el a kísérletekben (1. táblázat).

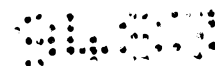
A pozitív kontrollként alkalmazott normál humán hasnyálmirigy mutatott L_AH_c - és cF19-kötést Langerhans-szigetekben lévő endokrin sejtek alkészletében, a fentebb F19-re leírtak szerint. Továbbá L_AH_c - és cF19-kötés látható volt mellkarcinóma-mintában lévő tumoros stroma-fibroblasztokban.

Egérből, patkányból, nyúlból és cynomolgus majomból származó normális szövetek immunohisztokémiai analízisében nem detektáltunk L_AH_c - vagy cF19-kötődést, az elvégzett kísérletekben.

20. táblázat: L_AH_c -kötődése nem-humán fajokból származó szövet-metszetekhez, immunohisztokémiai módszerekkel meghatározva

Szerv/szövet-típus	Egér	Patkány	Nyúl	Cynomolgus
Agy - agykéreg	-	-	-	-
- kisagy	-	-	-	-
Máj - hepatociták	-	-	-	-
- portális triád	-	-	-	-
Tüdő - hörgők	-	-	-	-
- alveolusok	-	-	-	-
Vese - glomerulusok	-	-	-	-
- tubuláris epitélium	-	-	-	-
Gyomor				
-glanduláris epitélium	-	-	-	-
-simaizom	-	-	-	-
Hasnyálmirigy				
- exokrin acini	-	-	-	-
- endokrin szigetek	-	-	-	-
Belek				
- glanduláris epitélium	-	-	-	-
- simaizom	-	-	-	-
Csecsemőmirigy				
- limfociták	-	-	-	-
Bőr - keratinociták	-	-	-	-
- izzadságmirigyek	-	-	-	-
Vázizom	-	-	-	-
Szív	-	-	-	-
Lép - limfociták	-	-	-	-
Petefészek				
- folliuláris epitélium	-	-	-	-
- stroma	-	-	-	-
Méh - miometrium	-	-	-	-
- méhnyak	-	-	-	-
Herék				
- tubuláris epitélium	nt	nt	nt	-
Kötőszövet	-	-	-	-

nt: nem tesztelt



10. példa

Kiméra és átalakított anti-FAP monoklonális antitesteket termelő sejtvonalak előállítása

A kísérlet célja annak bemutatása, hogy a találmány szerinti, stabil sejtvonalak L_AH_C -t, L_AH_A -t, L_RH_E -t, L_BH_D -t és cF19-et expresszálnak CHO-DG44-sejtekben. Előállítottunk humanizált vagy kiméra F19-antitestekkel stabilan transzfektált sejtvonalakat, és a nehéz és könnyű lánc variábilis régióinak PCR-amplifikációjával azonosítottuk azokat, templátként az egyes transzfektánsokból származó, genomi DNS-eket alkalmaztuk.

CHO-DG44-sejteket szérumentes körülmények között tartottuk, SFM-II-tápközegben. Lipofektint és SFM-II-jelű, szérumentes tápközeget a Gibco/BRL cégtől szereztünk be. Geneticint és az összes restriktációs enzimet a Boehringer Mannheim cégtől szereztük be. Pfu-polimerázt a Stratagene cégtől szereztünk be.

Transzfekcióra szánt DNS-t *E. coli* sejtekből tisztítottunk, „QiaFilter Maxi Cartridges” (Qiagen) alkalmazásával, a gyártó utasításai szerint. Valamennyi DNS-preparátumot megvizsgáltunk restriktációs enzimessal. Az L_AH_C variábilis régiók szekvenciáit, megfelelő vektoraikban, ABI PRISM 310 szekvenátor (Perkin-Elmer) alkalmazásával igazoltunk.

Az alkalmazott vektorokra és DNS-szekvenciákra vonatkozó további információk rendelkezésre állnak az előző példákban.

CHO-DG44-sejtek transzfekciója

Logaritmikusan növekedési fázisban lévő sejteket 1-1 ml, friss SFM-II-tápközegbe tartalmazó, 6 tenyésztőhelyes tálcákra szélesztettünk. Humanizált vagy kiméra, F19-verziók nehéz és könnyű



láncaikat kódoló plazmidokat kotranszfectáltunk CHO-DG44-sejtekbe, liposzómális transzfectációt alkalmazva. A liposzómákat 6 μ l lipofektin-reagens és 0,5 μ g vektor alkalmazásával preparáltuk (az egyik a kívánt nehéz láncot, a másik a könnyű láncot kódolja), LipofectAMINE-transzfectációkra leírtak szerint, kivéve azt, hogy SFM-II-tápközeget alkalmaztunk valamennyi reagens hígítására. 24 óra múlva a sejteket 1:10 arányban hígítottuk 300 μ g/ml geneticiint tartalmazó, SFM-II-tápközegbe. A sejtpusztulás kezdeti fázisa után (10-14 nap múlva), a Geneticin koncentrációját lecsökkentettük 200 mg/ml-re és hozzáadtunk metotrexátot 5 nM végkoncentrációban. A metotrexát-koncentrációkat 10-14 nap múlva megnöveltük 20 nM végkoncentrációra.

A transzfectált DNS PCR-amplifikációja

Lecentrifugáltunk 10^7 CHO-DG44-sejtet Eppendorf-mikrocentrifugában, rövid ideig, teljes sebességgel, egyszer mostuk PBS-el, és újra lecentrifugáltuk. A sejttöledék SDS-lízise és proteináz-K-kezelése után genomi DNS-t preparáltunk etanolos kicsapással.

A nehéz vagy könnyű lánc variábilis régiójának amplifikálására alkalmazott reakciókeverék tartalmazott az alábbiak közül egy primer-párt, dNTP-eket, puffereket és Pfu-polimerázt, templátként genomi DNS-t alkalmaztunk. Az így kapott PCR-termékeket megfelelő restrikciós enzimmel emésztettük és agaróz-gélelektroforézissel analizáltuk azonosságuk megerősítése céljából.

A könnyű láncnak megfelelő primer-készlet:

5' -GAG ACA TTG TGA CCC AAT CTC C-3' PKN 1690

5' -GAC AGT CAT AAA CTG CCA CAT CTT C-3' PKN.1930.R

A nehéz láncnak megfelelő primer-készlet:



5' -TTG ACA CGC GTC TCG GGA AGC TT-3'

PG 5863

5' -GGC GCA GAG GAT CCA CTC ACC T-3'

PG 6332.R

A emésztetlen, nehéz láncnak megfelelő termék várható mérete 469 bp volt, míg a könnyű lánc PCR-termékének várható mérete 286 bp. Az azonosságot BstEII- (nehéz lánc) vagy NlaIV-jelű (könnyű lánc) restriktációs enzimes emésztéssel igazoltuk.

CHO-sejtvonalakat transzfektáltunk L_AH_C -, L_AH_A -, L_BH_B -, L_BH_D - valamint cF19-el. Geneticin-rezisztens törzsekhez jutottunk, és ezeket a sejteket tovább szelektáltuk metotrexát-rezisztenciára. A könnyű és nehéz láncnak megfelelő DNS PCR-amplifikációjával, azt követően restriktációs enzimes hasításával azonosítottuk L_AH_C -, L_AH_A -, L_BH_B -, L_BH_D -transzfektánsokat.

A fentebb leírtak szerinti sejteket mindig szérumentes körülmények között tartottuk, és nem kezeltük állati eredetű termékekkel, például tripszinnel.

Előállítottunk termelő, transzfektált sejtvonalakat, amelyek monoklonális L_AH_C -, L_AH_A -, L_BH_B -, L_BH_D - és cF19-antitesteket expresszáltak. A könnyű és nehéz lánc variábilis régiójának megfelelő PCR-termékek PCR-amplifikációjával és restriktációs enzimes hasításával azonosítottuk azokat.

11. példa

Antitest-fehérjék expresszálása kínai hörcsög petefészkéből származó, DG44-sejtekben, és tisztításuk

A kísérlet célja L_AH_C -, L_AH_A -, L_BH_B -, L_BH_D -mAb-k expresszálása és tisztítása, amely lehetővé teszi jellemzésüket. Céljaink között volt olyan kvantitatív ELISA kifejlesztése, amely lehetővé



teszi antitest-koncentrációk mérését nyers tápközeg-mintákban, valamint tisztított Ig-mintákban, és különböző humanizált F19-konstrukciók által elérhető, viszonylagos expresszió mértékének meghatározását a vizsgálati eljárás alkalmazásával.

Szérummentes CHO-DG44-sejteket és USP-minőségű metotrexátot a Biotechnical Production Unit-től szereztünk be (Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach, Németország); mindkét termék rendelkezésre áll a kereskedelemben is. A sejteket minden esetben szérummentes körülmények között tartottuk. SFM-II szérummentes tápközeget Gibco/BRL-cégtől szereztünk be. Protein-A-agarózt a Pierce Chemical cégtől (Indianapolis, IN, USA) szereztünk be. Humán IgG1-standardeket (kat.sz.: I 3889), p-nitrofenil-foszfát-tablettákat (N 2640), marhaszérum-albumin (BSA) (A 7906) és kecskében termeltetett, anti-humán kappa-lánc-specifikus, alkalikus foszfátázzal konjugált antitestet (A 3813) a Sigam Chemical cégtől (St. Louis, MO, USA) szereztünk be. Kecskében termeltetett, anti-humán, gamma-lánc-specifikus, alkalikus foszfátázzal konjugált antitestet a Jackson ImmunoResearch Laboratories cégtől (Strattech Scientificen keresztül) szereztünk be. Tris-pufferolt sóoldat (TBS) összetétele: 150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7,5.

Sejttenyésztés körülményei antitest expresszáására

A sejteket T-175-edényekben, SFM-II, szérummentes tápközegben tenyésztettük és tartottuk fenn kevertetés nélkül. A tápközeg 200 l/ml geneticint és 20 nM metotrexátot tartalmazott, antibiotikumok nélkül. A sejteket hígítással passzáltuk, nem tapadtak le, és kis klaszterekben növekedtek. Amikor a sejtek elérték a stacionárius fá-



zist, a tápközeget elkülönítettük, és centrifugáltuk a sejtek eltávolítása céljából, és -20 C-ra lefagyasztottuk.

L_AH_c tisztítása

Valamennyi tisztítási lépést 4°C-on végeztünk. C10/C10-oszlopot (Pharmacia Fine Chemicals) megtöltöttünk Protein-A-agarózzal (3 ml ágytérfogat). Az oszlopot TBS-el mostuk és előzetesen egyszer eluáltuk 0,1 M nátrium-citrát, pH 3,0-al, hogy biztosítsuk, hogy nem maradt kötött anyag az oszlopon. Az oszlopot közvetlenül ezután újra ekvilibráltuk TBS-el, és 4°C-on tároltuk. A tenyészetek kimerült felülúszóit felolvasztottuk, és 10.000 g-n centrifugáltuk 30 percig Protein-A-kromatográfia előtt, a sejttörmelékek eltávolítása céljából, majd azonos térfogatú TBS-el hígítottuk. Ezt az anyagot felvittük Protein-A-oszlopra, 0,5 ml/perc sebességgel, P-1 perisztaltikus pumpa (Pharmacia) alkalmazásával, és TBS-el mostuk, amíg 280 nm-es abszorbancia detektálható volt. Az antitest elúcióját 0,1 M nátrium-citráttal (pH 3,0) végeztük, körülbelül 0,2 ml/perc sebességgel. Az elúciót 280 nm-en követtük, és az elúcióból 1 ml-es frakciókat szedtünk olyan csövekbe, amelyekben elegendő mennyiségű Tris-bázis (pH 9,0) volt a citrát-puffer semlegesítése céljából. A fehérjetartalmú frakciókat összetöltöttük, és Amicon ultraszűrő berendezéssel töményítettük, YM-30-szűrő alkalmazásával, és PBS-el szemben dializáltuk. Az oszlopot azonnal regeneráltuk TBS-el. A fehérje-festékkötési vizsgálati eljárásokat a BioRad cégtől (Hercules, California) beszerzett, fehérjemeghatározási reagenskészlet alkalmazásával végeztük, a gyártó utasításai szerint, standardként marhaszérum-albumint alkalmaztunk.

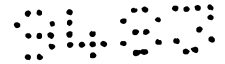


Humán IgG (gamma immunoglobulin) ELISA

ELISA-tálcákat egy éjszakán át burkoltunk 100 µl kecskében termeltetett, anti-humán gamma-lánc-specifikus, alkalikus foszfátazzal konjugált antitesttel, 0,4 mg/ml-es koncentrációban, burkoló pufferben, 4°C-on. A burkoló antitestet eltávolítottuk, és a tálcákat PBS-ben oldott, 2% BSA-val blokkoltuk egy óra hosszáig. Az összes további lépést 37°C-on végeztük. A blokkoló puffert kicseréltük antitest-mintákra vagy humán IgG1-standardekre, melyekből hígító pufferben hígítási sort készítettünk 200 µl térfogatban, és egy óra hosszáig inkubáltuk. Negatív kontrollok voltak: hígító puffer és/vagy nem-transzfectált sejtek tenyésztő tápközege. A mérőhelyeket mostuk, és hozzáadtunk 100 µl kecskében termeltetett, tormából származó peroxidázzal (HRP) konjugált, kappa láncra specifikus, anti-humán antitestet, 1:5000 hígításban, hígító pufferben, és további egy óra hosszáig inkubáltuk. A mérőhelyeket mostuk, és hozzáadtunk 100 µl reakciópuffert, és 30 percig inkubáltuk. A reakciót 1 M NaOH-val állítottuk le, és az abszorbanciát 405 nm-en leolvastuk ELISA-tálca leolvasóban. Az eredményeket négyparaméteres, iteratív görbeillesztéssel analizáltuk.

Az aminosav-analízist szakember által ismert módszerek alkalmazásával végeztük.

L_AH_C-jelű monoklonális antitestet termeltettünk és homogenitásig tisztítottuk Protein-A-affinitáskromatográfia alkalmazásával. Standardként humán IgG1-et alkalmazva, ELISA vizsgálati eljárások azt mutatták, hogy az L_AH_C-kitermelés meghaladta a 70%-ot. Az anyag tisztaságát SDS-poliakrilamid-gélelektroforézissel



90%-nál nagyobbak becsültük. Reprezentatív expressziós adatokat és tipikus tisztítási hozamokat bemutatunk a 21. táblázatban.

21. TÁBLÁZAT: FAP-antitest-fehérjék expressziós adatai és tisztítási hozamuk CHO-sejtekben

Antitest	Expresszió mértéke nyers tápközeg- mintákban (ELISA)	Tisztított antitest hozama (mg/l)	Hozam javulása (tisztított antitest)
L _A H _C	7 - 10 mg/l	kb. 5-7	500-700
L _A H _A	5 - 7 mg/l	kb. 3-4	300-400
L _B H _B	0,5 - 1 mg/l	kb. 0,2-0,5	20-50
L _B H _D	0,8 - 1,5 mg/l	kb. 0,3-0,8	30-60
Kiméra F19	kb. 0,02 mg/l	< 0,01 mg/l	1

Reprezentatív adatokat mutatunk be az egyes, termelt anti-FAP-antitestekre. A Protein-A-agaróz kromatográfia utáni hozamok a tisztított Ig fehérje-festékkötő méréseire alapultak, standardként BSA-t alkalmaztunk.

12. példa

L_AH_C-jelű monoklonális antitest kötődése izolált, rekombináns, humán FAP-hez

A kísérlet célja annak jellemzése, hogy a L_AH_C-jelű monoklonális antitest milyen mértékben képes kötődni izolált, rekombináns, humán FAP-hez.

CD8-FAP ELISA

ELISA-tálcákat egy éjszakán át burkoltunk 100 µl egérben termeltetett, anti-patkány antitesttel (Sigma Chemical R 0761), 1:2000 hígításban, burkoló pufferben, 4°C-on. A burkoló antites-

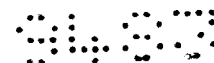


tet eltávolítottuk, és a tálcákat PBS-ben oldott, 2% BSA-val blokkoltuk egy óra hosszáig. Az összes további lépést szobahőmérsékleten végeztük. A blokkoló puffert kicseréltük 100 μ l, 1 μ g/ml patkányban termeltetett, anti-CD8-antitestre (Pharmingen 01041 D), és egy óra hosszáig inkubáltuk. A tálcákat mostuk, és hozzáadtunk 100 μ l CD8-FAP-tenyészet-felülúszót (lásd 14. példát) (1:2 PBS-ben), és hagytuk kötődni egy óra hosszáig. A tálcákat mostuk, és hozzáadtuk az antitest-mintákat (felező hígítási sor) 100 μ l-ben, és egy óra hosszáig inkubáltuk. Negatív kontrollok voltak: humán IgG és/vagy nem-transzfectált sejtek tenyésztő tápközege. A mérőhelyeket mostuk, és hozzáadtunk 100 μ l egérben termeltetett, tormából származó peroxidázzal (HRP) konjugált, anti-humán IgG1-antitestet (Zymed 05-3320), 1:5000 hígításban, hígító pufferben, és további egy óra hosszáig inkubáltuk. A mérőhelyeket mostuk, és hozzáadtunk 100 μ l HRP-szubsztrátot [azino-bisz-(3-etil-benzthiazolin-6-szulfon)-savat, Sigma Chemical A 9941], és 60 percig inkubáltuk. A reakciót 1 M NaOH-val állítottuk le, és az abszorbanciát 405/490 nm-en leolvastuk ELISA-tálca leolvasóban. Az eredményeket négyparaméteres, iteratív görbeillesztéssel analizáltuk.

Más módszer szerint, a tálcákat közvetlenül cF19-el burkoltuk. FAP-ot (rekombináns humán FAP, lásd 13. példát) a fentebb leírtak szerint hagytuk kötődni ezekhez a tálcákhoz, és azután hozzáadtunk biotinilált L_AH_C -t (körülbelül 1 μ g/ml-ben). Az antitest kötődését HRP-sztreptavidin-konjugátummal detektáltuk.

Membránkötött humán FAP szolubilizálása

FAP-ot expresszáló 293FAP I/2-sejteket vagy kontroll 293-sejteket mostunk PBS-el, és 1% Triton X-114-el lizáltuk Tris-



pufferolt sóoldatban. A sejtmagvakat és sejttörmelékeket 10.000 g-n való centrifugálással eltávolítottuk. A felülúszót fázisok szerint szétválasztjuk [Estreicher, A. et al., J. Biol. Chem. 264, 1180-1189 (1989)] a membránfehérjék dúsítása céljából. A detergens-fázist elkülönítjük, és 1% Empigen BB-t (Calbiochem) tartalmazó pufferben meghígítjuk, a Tritox X-114 ismételt aggregációjának megakadályozása céljából. Ezt az anyagot Concanavalin-A-agaróz kromatográfiának vetjük alá [Retting, W.J. et al., Cancer Res. 53, 3327-3345 (1993)].

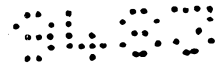
L_AH_C biotinilálása

L_AH_C-t (1-2 mg) dializáltunk 50 mM bikarbonát-pufferrel szemben, és tízszeres moláris feleslegű szulfoszukcinimidil-6-biotinamido-hexanoáttal (NHS-LC-biotin, Pierce Chemical, Rockford, Illinois, USA) biotiniláltuk 2 óra hosszáig, szobahőmérsékleten. A nem-reagált terméket ismételt mikrodialízissel, mikrokoncentrátorban eltávolítottuk.

Tranziens transzfekciók

COS-7-sejteket (American Type Culture Collection, ref.No. CRL 1651) kotranszfectáltunk elektroporációval, L_AH_C nehéz és könnyű láncot kódoló vektorokkal.

Anti-CD8 monoklonális antitestet immobilizáltunk mikrotiter-tálcákra. CD8-FAP-baculovírussal fertőzött rovarsejtek tápközegéből származó CD8-FAP-ot hagytunk kötődni ezekre a tálcákra. Két külön, L_AH_C-t kódoló vektorral tranziensen transzfectált COS-7-sejttenyészetből származó, kimerült felülúszókat hígítási sorban lehígítottunk, és hozzáadtuk az immobilizált CD8-FAP-ot tartalmazó tenyésztőhelyekhez. Az L_AH_C kötődött az izolált,



immobilizált CD8-FAP-fehérjéhez (35. ábra). Áltranzfektált COS-7-sejtekből származó felülúszókkal végzett kísérletekben nem tapasztaltunk kötődést.

293FAP I/2-sejtekből detergenssel készített extraktumokból vagy kontroll-extraktumokból származó, rekombináns membránkötött FAP-ot hígítási sorban lehígítottunk és immobilizáltunk mikrotiter-tálcákra kötött, kiméra F19 monoklonális antitesten keresztül. Biotinilált L_AH_C koncentrációfüggő módon képes volt kötni cF19-el immobilizált, rekombináns humán FAP-ot (36. ábra).

L_AH_C képes volt felismerni izolált, immobilizált, rekombináns, humán FAP-t, amely rágcsálóeredetű F19-epitópot hordozott. L_AH_C képes volt kötődni rovarsejtekben termelődött CD8-FAP-hez, valamint 293FAP I/2-sejtekben termelődött FAP-fehérjéhez egyaránt.

L_AH_C nehéz és könnyű láncot kódoló vektorokkal vagy DNS nélkül (kontroll) transzfektált COS7-sejtekből származó tenyészet felülúszóit elkülönítettük a fertőzés után három nappal. CD8-FAP-ot immobilizáltunk anti-CD8-antitesten keresztül, a szövegben leírtak szerint. COS7-felülúszókból készített hígítási sorokat hagytunk kötődni az immobilizált CD8-FAP-hoz, és azt követően HRP-konjugált anti-humán IgG1-antitest alkalmazásával detektáltuk.

FAP-ot expresszáló, 293FAP I/2-sejtekből detergenssel készített extraktumait vagy kontroll 293-sejtek extraktumait hígítási sorban lehígítottunk és hozzáadtunk cF19-el burkolt mikrotiter-tálcákra. Hozzáadtunk biotinilált L_AH_C -t, és biotinilált L_AH_C kötődését HRP-konjugált sztreptavidinnel detektáltuk.



13. példa

Humán FAP-ot kódoló, HT-1080-jelű fibroszarkóma sejtek és humán embrionális veséből származó, 293-sejtek jellemzése

A fibroblaszt aktivációs fehérje (FAP) egy sejtfelszíni, membránkötött fehérje, amely az F19-epitópot hordozza, és tumoros stroma-fibroblasztokon expresszálódik. Előállítottunk rekombináns FAP-fehérjét expresszáló sejtvonalakat és ezeknek megfelelő, FAP-nélküli kontrollokat anti-FAP monoklonális antitestek jellemzésére.

Az alkalmazott sejtek az alábbiak voltak: HT-1080-sejteket (nyilvántartási száma: CCl 121) és humán, embrionális, veséből származó 293-sejteket (nyilvántartási száma: CRL 1573) az American Type Culture Collection-ből (Maryland, USA) szereztünk be. „Transfectam”-ot a Promega cégtől (Madison, WI) szereztünk be. Geneticint és valamennyi restrikciós enzimet a Boehringer Mannheim cégtől szereztük be. Transzfekcióra alkalmazott DNS-t E. coliból tisztítottuk, QiaFilter Maxi Cartridges (Qiagen) alkalmazásával, a gyártó utasításai szerint. Valamennyi DNS-preparátumot restrikciós enzimes emésztéssel vizsgáltunk. A vektorok szekvenciáit ABI PRISM 310 szekvenátorral igazoltuk.

Az alkalmazott vektorokra és DNS-szekvenciákra vonatkozó további információkat leírták [Scanlan, M.J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10832-10836 (1992)]. Az FAP-cDNS-szekvenciát a Genbank-ban deponálták (nyilvántartási száma: HS09287).

Sejttenyészet és immunológiai vizsgálati eljárások

HT-1080-sejteket transzfektáltunk 1 mg DNS-el „Transfectam” alkalmazásával, a gyártó utasításai szerint. Humán, embrionális,



veséből származó 293-sejteket kalcium-foszfátos transzfekcióval transzfektáltunk [Brann, M.R. et al., Mol. Pharmacol. 32, 450-455 (1987)]. Huszonnégy óra múlva, a sejteket 1:10-szer hígítottuk 200 mg/ml geneticint tartalmazó, friss tápközegbe. A kolóniákat felvettük és immunfluoreszcenciával vizsgáltuk FAP-expresszióra, Retting, W.J. és munkatársai által leírtak szerint [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 3110-3114 (1988)].

Immunprecipitációkat cF19-el metabolikusan jelölt sejtekkel végeztünk, Retting W.J. és munkatársai által leírtak szerint [Cancer Res. 53, 3327-3335 (1993)].

HT-1080- és 293-sejteket FAP-antigén expressziójára immunfluoreszcens vizsgálati eljárásokkal teszteltünk, anti-FAP-antitestek alkalmazásával, és antigén-negatívnak találtuk. Ezen sejtek FAP.38-vektorral való transzfekciója geneticin-rezisztens kolóniák kialakulását eredményezte. Izolált kolóniákat felvettünk, és immunfluoreszcenciával analizáltuk FAP-expresszióra. Két sejtkolóniát azonosítottunk, melyeket HT-1080FAP 33. klónnak és 293FAP I/2-nek jelöltünk, amelyek sejtfelszínen kötött FAP-fehérjét expresszálnak, cF19-antitesttel felismerve. Nem-permeabilizált HT-1080FAP 33. klónjának sejtjeit és 293FAP I/2 sejteket cF19-antitesttel megfestve igazoltuk, hogy az FAP-fehérje a sejtfelszínen lokalizálódik.

Radioaktívan jelölt FAP-fehérje immunprecipitációja ³⁵S-metioninnal jelölt, HT-1080FAP 33. klón sejtjeinek vagy 293-FAP I/2-sejtek extraktumaiból származó cF19-el egy 93 kilodalton méretű csík megjelenését eredményezte autoradiográfia után. Ez a csík nem detektálható szülői HT-1080- vagy 293-sejtek extraktumainak



immunprecipitátumaiban.

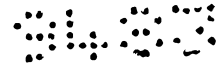
Két stabilan transzfektált sejtvonal, HT-1080FAP 33. klónja és 293-FAP I/2 expresszál a sejtfelszínen FAP-ot, immunológiai vizsgálati eljárásban, anti-FAP-mAb-vel meghatározva. Sem a szülői HT-1080-sejtek, sem a szülői 293-sejtek nem expresszálnak detektálható mértékben FAP-t.

14. példa

CD8-FAP fúziós fehérje előállítása és jellemzése

Humán FAP (fibroblaszt aktivációs fehérje) szolubilis formáját CD8-FAP fúziós fehérje formájában termeltettük rovarsejtekben, anti-FAP-mAb-kötőhelyet tartalmazó L_AH_C jellemzése céljából. Rágcsálóból származó CD8-at azért választottuk, hogy lehetővé tegye a fehérje szekrécióját, és további epitóp-toldalékokat biztosítson.

A rágcsálóeredetű CD8 α (Genbank M12825) első 189 aminosavából álló, CD8 extracelluláris doménjét kódoló cDNS-t az FAP extracelluláris doménjéhez (27-760. aminosavak) kapcsoltuk, Lane és munkatársai által leírtak szerint [Lane et al., J. Exp. Med. 177, 1209-1213 (1993)], standard PCR-eljárást alkalmazva. Valamennyi klón azonosságát DNS-szekvenálással igazoltuk. Az eredményül kapott DNS-t pVL1393-vektorba (Invitrogen) inszertáltuk, és Sf9-sejteket (Invitrogen) transzfektáltunk ezzel a vektorral, és az eredményül kapott rekombináns baculovírust amplifikáltuk, leírt eljárás szerint [“Baculovirus Expression Vectors. A Laboratory Manual”, szerk. O'Reilly D.R., Oxford University Press: New York (1994)]. High FiveTM sejteket (Invitrogen)



rekombináns CD8-FAP-baculovírussal fertőztük, négy nap múlva a kimerült tápközeget elkülönítettük, és ultracentrifugálással tisztítottuk.

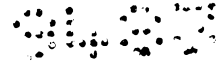
A CD8-FAP-ELISA-t (enzimkapcsolt immunszorbens vizsgálati eljárást) fentebb leírtuk (12. példa).

CD8-FAP-vírussal fertőzött rovarsejt-tenyészetek olyan fúziós fehérjét szekretáltak a tápközegebe, amely F19-epitópot hordoz, és anti-FAP-antitesttel felismerhető (1. ábra). Sem a sejttenyészet tápközege egyedül, sem CD8-CD40L fúziós fehérjével fertőzött rovarsejtek tápközege nem kötött anti-FAP-antitestet.

Fertőzött rovarsejt-tenyészetek F19-epitópot hordozó, szolubilis CD8-FAP-fehérjét szekretáltak a tápközegebe. Kontroll-konstrukcióval fertőzött sejtek tenyészetének felülúszója nem tartalmazott F19-epitópot hordozó antigént.

Rovarsejtekben FAP szolubilis formáját, CD8-FAP-t termeltetünk, és kimutattuk, hogy a CD8-FAP cF19 által felismerhető epitópot hordoz.

CD8-FAP-ot vagy CD8-CD40L fúziós fehérjét kódoló rekombináns baculovírussal fertőzött rovarsejtek felülúszóit elkülönítettük négy nappal a fertőzés után. Sejttenyészet tápközeget sejtek nélkül alkalmaztunk egy további kontrollként (tápközege). Ezen anyagokból készített hígítási sort adtunk anti-CD8-antitesttel burkolt mikrotiter-tálcákba, és hagytuk kötődni. Azután hozzáadtunk cF19-et (1 mg/ml), és hagytuk kötődni. A kötődött cF19-et tormából származó peroxidázzal konjugált anti-humán antitesttel detektáltuk.



(SZEKVENCIÁK JEGYZÉKE)
SEQUENCE LISTING

<110> Boehringer Ingelheim International GmbH

<120> FAP alpha-specific antibody with improved producibility

<130> 12-196-PCT

<140> PCT/EP99/02711

<141> 1999-04-22

<150> EP 98107925.4

<151> 1998-04-30

<160> 101

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 339

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gacattgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc 60
atcaactgca agtccagtca gagcctttta tattctagaa atcaaaagaa ctacttggcc 120
tggtatcagc agaaaccagg acagccaccc aaactcctca tcttttgggc tagcactagg 180
gaatctgggg tacctgatag gttcagtggc agtggggttg ggacagactt caccctcacc 240
attagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttttagctat 300
ccgctcacgt tcggacaagg gaccaagggtg gaaataaaa 339

```

<210> 2

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1               5               10               15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
      20               25               30

Arg Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
      35               40               45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Phe Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
      50               55               60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
      65               70               75               80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
      85               90               95

```



Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 3
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 gacattgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagtca gagcctttta tattctagaa atcaaaagaa ctacttggcc 120
 tggttccagc agaaaccagg acagccaccc aaactcctca tcttttgggc tagcactagg 180
 gaatctgggg tacctgatag gttcagtggc agtgggtttg ggacagactt caccctcacc 240
 attagcagcc tgcaggetga agatgtggca gtttatgact gtcaacaata ttttagctat 300
 ccgctcacgt tcggacaagg gaccaaggtg gaaataaaa 339

<210> 4
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Arg Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Phe Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Asp Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 5
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens



```
<400> 5
gacattgtga tgacccaatc tccagactct ttggtgtgtg ctctagggga gagggccacc 60
atcaactgca agtccagtca gagcctttta tattctagaa atcaaaagaa ctacttggcc 120
tggtatcagc agaaaccagg acagccaccc aaactcctca tctattgggc tagcactagg 180
gaatctgggg tacctgatag gttcagtggc agtggggttg ggacagactt caccctcacc 240
attagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttttagctat 300
ccgctcacgt tcggacaagg gaccaaggtg gaaataaaaa 339
```

```
<210> 6
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

```
<400> 6
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1              5              10              15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
          20              25              30

Arg Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
      35              40              45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50              55              60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65              70              75              80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
      85              90              95

Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
    100              105              110
```

Lys

```
<210> 7
<211> 372
<212> DNA
<213> Homo sapiens
```

```
<400> 7
caggtgcaac tagtgcaatc cggcgccgaa gtgaagaaac ccggtgcttc cgtgaaagtc 60
agctgtaaaa ctagtagata caccttcact gaatacacca tacactgggt tagacaggcc 120
cctggccaaa ggctggagtg gataggaggt attaatccta acaatgggtat tcctaactac 180
aaccagaagt tcaagggccg ggccaccttg accgtaggca agtctgccag caccgcctac 240
atggaactgt ccagcctgcg ctccgaggac actgcagtct actactgcgc cagaagaaga 300
atcgcttatg gttacgacga gggccatgct atggactact ggggtcaagg aacccttgct 360
accgtctcct ca 372
```

```
<210> 8
<211> 124
<212> PRT
```



<213> Homo sapiens

<400> 8

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1           5           10           15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Arg Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
          20           25           30

Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
          35           40           45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Ile Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50           55           60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Gly Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65           70           75           80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85           90           95

Ala Arg Arg Arg Ile Ala Tyr Gly Tyr Asp Glu Gly His Ala Met Asp
          100          105          110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 9

<211> 372

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

```

cagggtgcaac tagtgcagtc cggcgccgaa gtgaagaaac ccggtgcttc cgtgaaagtc 60
agctgtaaaa ctagtagata caccttcact gaatacacca tacactgggt tagacaggcc 120
cctggccaaa ggctggagtg gataggaggt attaatecta acaatgggtat tcttaactac 180
aaccagaagt tcaagggccg ggccaccttg accgtaggca agtctgccag caccgcctac 240
atggaactgt ccagcctgcg ctccgaggac actgcagtct acttctgcgc cagaagaaga 300
atcgctatg gttacgacga gggccatgct atggactact ggggtcaagg aacccttgct 360
accgtctcct ca                                     372

```

<210> 10

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1           5           10           15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Arg Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
          20           25           30

```



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

<210> 11
 <211> 372
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 caggtgcaac tagtgcagtc cggcgccgaa gtgaagaaac ccggtgcttc cgtgaaagtc 60
 agctgtaaaa ctagtagata caccttcact gaatacacca tacactgggt tagacaggcc 120
 cctggccaaa ggctggagtg gataggaggt attaatccta acaatgggtat tcctaactac 180
 aaccagaagt tcaagggccg ggtcaccatc accgtagaca cctctgccag caccgcctac 240
 atggaactgt ccagcctgcg ctccgaggac actgcagtct actactgcfg cagaagaaga 300
 atcgccctatg gttacgacga gggccatgct atggactact ggggtcaagg aacccttgct 360
 accgtctcct ca 372

<210> 12
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Arg Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30
 Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Ile Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80



Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Arg Ile Ala Tyr Gly Tyr Asp Glu Gly His Ala Met Asp
100 105 110

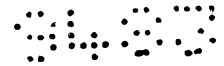
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 13
<211> 372
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 13
caggtgcaac tagtgcagtc cggcgccgaa gtgaagaaac ccggtgcttc cgtgaaagtc 60
agctgtaaaa ctagtagata caccttcact gaatacacca tacactgggt tagacaggcc 120
cctggccaaa ggctggagtg gataggaggt attaataccta acaatgggtat tcctaactac 180
aaccagaagt tcaagggccg ggtcaccatc accgtagaca cctctgccag caccgcctac 240
atggaactgt ccagcctgcg ctccgaggac actgcagtct acttctgcgc cagaagaaga 300
atcgccatag gttacgacga gggccatgct atggactact ggggtcaagg aacccttgct 360
accgtctcct ca 372

<210> 14
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Arg Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30
Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Ile Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Arg Arg Ile Ala Tyr Gly Tyr Asp Glu Gly His Ala Met Asp
100 105 110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120



<210> 15
 <211> 372
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 caggtgcaac tagtgcagtc cggcgccgaa gtgaagaaac ccggtgcttc cgtgaaagtc 60
 agctgtaaaa ctagtggata caccttcact gaatacacca tacactgggt tagacaggcc 120
 cctggccaaa ggctggagtg gataggaggt attaatccta acaatgggtat tcctaactac 180
 aaccagaagt tcaagggccg ggtcaccatc accgtagaca cctctgccag caccgcctac 240
 atggaactgt ccagcctgcg ctccgaggac actgcagtct actactgcgc cagaagaaga 300
 atcgccatag gttacgacga gggccatgct atggactact ggggtcaagg aacccttgct 360
 accgtctcct ca 372

<210> 16
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30
 Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Ile Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Arg Ile Ala Tyr Gly Tyr Asp Glu Gly His Ala Met Asp
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 17
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Chimeric light
 chain variable region

<400> 17



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

<210> 18

<211> 453

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:chimeric heavy
chain variable region

<400> 18

Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser
1					5				10					15	



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



Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 355 360 365
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 19
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 cgtactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
 ggaactgcct ctgttggtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
 tggaaggtgg ataacgcct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
 aaacacaaag tctacgctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
 agcttcaaca ggggagagtg t 321

<210> 20
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

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



Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 21
 <211> 990
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
 ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg 120
 tggaactcag gcgccctgac cagcggcggtg cacaccttcc cggctgtcct acagtccctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300
 aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cactgaact cctgggggga 360
 ccgtcagttc tcctcttccc cccaaaaccc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct 420
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
 agcacgtacc ggggtggtcag cgtcctcacc gtctcgcacc aggactggct gaatggcaag 600
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaggag 720
 atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
 ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gacgaggtgg 900
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 990

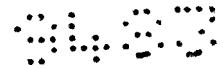
<210> 22
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60



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

<210> 23

<211> 427

<212> DNA

<213> Homo sapiens



<400> 23

```
aagcttgccg ccaccatgga ttcacaggcc caggttctta tgttactgcc gctatgggta 60
tctggtacct gtggggacat tgtgatgtca cagtctccat cctccctagc tgtgtcagtt 120
ggagagaagg ttactatgag ctgcaagtcc agtcagagcc ttttatatag tcgtaatcaa 180
aagaactact tggcctgggt ccagcagaag ccagggcagt ctctaaact gctgattttc 240
tgggcatcca ctagggaatc tggggtcctt gatcgcttca caggcagtggt atttgggacg 300
gatttcaatc tcaccatcag cagtgtgcag gctgaggacc tggcagttta tgactgtcag 360
caatatTTTA gctatccgct cacgttcggt gctgggacca agctggagct gaaacgtgag 420
tggatcc
```

<210> 24

<211> 133

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

```
Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Pro Leu Trp Val Ser
  1                      5                      10                      15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
                20                      25                      30

Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
          35                      40                      45

Leu Leu Tyr Ser Arg Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln
  50                      55                      60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Phe Trp Ala Ser Thr Arg
  65                      70                      75                      80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp
                85                      90                      95

Phe Asn Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
          100                      105                      110

Asp Cys Gln Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
  115                      120                      125

Lys Leu Glu Leu Lys
  130
```

<210> 25

<211> 457

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

```
aagcttgccg ccaccatggg atggagctgg gtctttctct ttctcctgtc aggaactgca 60
ggtgtcctct ctgaggtcca gctgcaacag tctggacctg agctggtgaa gcctggggct 120
tcagtaaaga tgtcctgcaa gacttctaga tacacattca ctgaatacac catacactgg 180
gtgagacaga gccatggaaa gagccttgag tggattggag gtattaatcc taacaatggt 240
attcctaact acaaccagaa gttcaagggc agggccacat tgactgtagg caagtcctcc 300
```



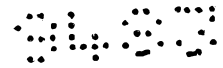
agcaccgcct acatggagct ccgcagcctg acatctgagg attctgcggt ctatttctgt 360
 gcaagaagaa gaatcgcta tggttacgac gagggccatg ctatggacta ctgggggtcaa 420
 ggaacctcag tcaccgtctc ctcagggtgag tggatcc 457

<210> 26
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 Met Gly Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Arg Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Glu Tyr Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Ile Pro Asn Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Gly Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Arg Ile Ala Tyr Gly Tyr Asp Glu Gly His
 115 120 125
 Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 27
 <211> 8068
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 gaattccagc aactggcgcg ccgttactag ttattaatag taatcaatta cgggggcatt 60
 agttcatagc ccataatatg agttccgcgt tacataactt acggtaaagt gcccgccctgg 120
 ctgaccgccc aacgaccccc gccattgac gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac 180
 gccaataggg actttccatt gacgtcaatg ggtggagtat ttacggtaaa ctgcccactt 240
 ggcagtacat caagtgtatc atatgccaag tacgccccct attgacgtca atgacggtaa 300
 atggccccgc tggcattatg cccagtacat gaccttatgg gactttccta cttggcagta 360
 catctacgta ttagtcatcg ctattacat ggtgatgcgg ttttggcagt acatcaatgg 420
 gcgtggatag cggtttgact cacggggatt tccaagtctc caccgccattg acgtcaatgg 480
 gagtttgatt tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaaa tgctcgtaaca actccgcccc 540
 attgacgcaa atgggcggta ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca gagctcgttt 600
 agtgaacctg cagatcgccct ggagacgcca tccacgtctg tttgacctcc atagaagaca 660



ccgggaccga	tccagcctcc	gcggccggga	acgggtgcatt	ggaacgcgga	ttccccgtgc	720
caagagtgc	gtaagtaccg	cctatagagt	ctataggccc	accccccttg	cttcttatgc	780
atgctatact	gtttttggct	tgggggtctat	acacccccgc	ttcctcatgt	tataggtgat	840
ggtatagctt	agcctatagg	tgtgggttat	tgaccattat	tgaccactcc	cctattgggtg	900
acgatacttt	ccattactaa	tccataacat	ggctctttgc	cacaactctc	tttattggct	960
atatgccaat	acactgtcct	tcagagactg	acacggactc	tgtattttta	caggatgggg	1020
tctcatttat	tatttacaaa	ttcacatata	caacaccacc	gtccccagtg	cccgcagttt	1080
ttattaaaca	taacgtggga	tctccacgcg	aatctcgggt	acgtgttccg	gacatgggct	1140
cttctccggg	agcggcggag	cttctacatc	cgagccctgc	tcccatgcct	ccagcgactc	1200
atggtcgctc	ggcagctcct	tgtcctaac	agtggaggcc	agacttaggc	acagcacgat	1260
gcccaccacc	accagtgtgc	cgcacaaggc	cgtggcggta	gggtatgtgt	ctgaaaatga	1320
gctcggggag	cgggcttgca	ccgctgacgc	atltggaaga	cttaaggcag	cggcagaaga	1380
agatgcaggc	agctgagttg	ttgtgttctg	ataagagtca	gaggtaactc	ccgttgcggt	1440
gctgttaacg	gtggagggca	gtgtagtctg	agcagtaactc	gttgetgccg	cgcgcgccac	1500
cagacataat	agctgacaga	ctaacagact	gttccctttcc	atgggtcttt	tctgcagtca	1560
ccgtccctga	cacgcgtctc	gggaagcttg	ccgccaccat	ggattcacag	gcccaggttc	1620
ttatgttact	gccgctatgg	gtatctggta	cctgtgggga	cattgtgatg	tcacagtctc	1680
catcctccct	agctgtgtca	gttggagaga	aggttactat	gagctgcaag	tccagtcaga	1740
gccttttata	ttctagaaat	caaaagaact	acttggcctg	gttccagcag	aagccagggc	1800
agtctcctaa	actgctgatt	ttctgggcat	ccactaggga	atctgggggc	cctgatcgct	1860
tcacaggcag	tggatttggtg	acggatttca	atctcaccat	cagcagtgtg	caggctgagg	1920
acctggcagt	ttatgactgt	cagcaatatt	ttagctatcc	gctcacgttc	ggtgctggga	1980
ccaagctgga	gctgaaacgt	gagtggatcc	atctgggata	agcatgctgt	tttctgtctg	2040
tcctaacat	gccctgtgat	tatgcgcaaa	caacacaccc	aagggcagaa	ctttgttact	2100
taaacaccat	cctgtttgct	tctttctca	ggaactgtgg	ctgcaccatc	tgtcttcac	2160
ttcccgccat	ctgatgagca	gttgaaatct	ggaactgcct	ctgttgtgtg	cctgctgaat	2220
aacttctatc	ccagagaggc	caaagtacag	tggaaagtgg	ataacgccct	ccaatcggt	2280
aactcccagg	agagtgtcac	agagcaggac	agcaaggaca	gcacctacag	cctcagcagc	2340
acctgacgc	tgagcaaagc	agactacgag	aaacacaaaag	tctacgcctg	cgaagtcacc	2400
catcagggcc	tgagctcgcc	cgtcacaaaag	agcttcaaca	ggggagagtg	ttagagggag	2460
aagtgcctcc	acctgctcct	cagttccagc	ctgacccctc	cccatccttt	ggcctctgac	2520
cctttttcca	caggggacct	acccctattg	cggtcctcca	gctcatcttt	cacctcacc	2580
ccctcctcct	ccttggtctt	aattatgcta	atgttgagg	agaatgaata	aataaagtga	2640
atctttgcac	ctgtggtgga	tctaataaaa	gatatttatt	ttcattagat	atgtgtgttg	2700
gttttttgtg	tgcagtgcct	ctatctggag	gccaggtagg	gctggccttg	ggggaggggg	2760
aggccagaat	gactccaaga	gctacaggaa	ggcaggtcag	agacccctc	ggacaaacag	2820
tggctggact	ctgcaccata	acacacaatc	aacaggggag	tgagctggaa	atltgctagc	2880
gaattcttga	agacgaaag	gcctcgtgat	acgcctattt	ttataggtta	atgtcatgat	2940
aataatgggt	tcttagacgt	caggtggcac	tttctgggga	aatgtgcgcg	gaacccctat	3000
ttgtttat	ttctaaatac	attcaaatat	gtatccgctc	atgagacaat	aaccctgata	3060
aatgcttcaa	taatattgaa	aaaggaagag	tatgagtatt	caacatttcc	gtgtcgccct	3120
tattcccttt	tttgcgcat	tttgcttcc	tgtttttgct	caccagaaa	cgctgggtgaa	3180
agtaaaagat	gctgaagatc	agttgggtgc	acgagtgggt	tacatcgaac	tggatctcaa	3240
cagcggtaa	atccttgaga	gttttcgccc	cgaagaacgt	tttccaatga	tgagcacttt	3300
taaagtctctg	ctatgtggcg	cgggtattatc	ccgtgttgac	gccgggcaag	agcaactcgg	3360
tcgccgcata	cactattctc	agaatgactt	ggttgagtac	tcaccagtca	cagaaaagca	3420
tcttacggat	ggcatgacag	taagagaatt	atgcagtgtc	gccataacca	tgagtataaa	3480
cactgcggcc	aacttacttc	tgacaacgat	cggaggaccg	aaggagctaa	ccgctttttt	3540
gcacaacatg	ggggatcatg	taactcgctc	tgatcgttgg	gaaccggagc	tgaatgaagc	3600
cataccaaac	gacgagcgtg	acaccacgat	gcctgcagca	atggcaacaa	cgttgcgcaa	3660
actattaact	ggcgaaactac	ttactctagc	ttcccgcaa	caattaatag	actggatgga	3720
ggcggtataa	gttgacaggac	cacttctgcg	ctcgccctt	ccggtgggt	ggtttattgc	3780
tgataaatct	ggagccgggtg	agcgtgggtc	tcgggtatc	attgcagcac	tggggccaga	3840
tggtaaagccc	tcccgtatcg	tagttatcta	cacgacgggg	agtcaggcaa	ctatggatga	3900
acgaaataga	cagatcgctg	agataggtgc	ctcactgatt	aagcattgggt	aactgtcaga	3960
ccaagtttac	tcatatatac	tttagattga	tttaaaactt	catttttaat	ttaaaaggat	4020



ctaggtgaag	atcctttttt	ataatctcat	gaccaaatac	ccttaacgtg	agttttcggt	4080
ccactgagcg	tcagaccccg	tagaaaagat	caaaggatct	tcttgagatc	ctttttttct	4140
gcgcgtaatc	tgctgcttgc	aaacaaaaaa	accaccgcta	ccagcgggtg	tttgtttgcc	4200
ggatcaagag	ctaccaactc	tttttccgaa	ggtaactggc	ttcagcagag	cgcagatacc	4260
aaatactgtc	cttctagtgt	agccgtagtt	aggccaccac	ttcaagaact	ctgtagcacc	4320
gcctacatac	ctcgtctctg	taatcctggt	accagtggct	gctgccagt	gcgataagtc	4380
gtgtcttacc	gggttggact	caagacgata	gttaccggat	aaggcgcagc	ggtcgggctg	4440
aacggggggg	tcgtgcacac	agcccagctt	ggagcgaacg	acctacaccg	aactgagata	4500
cctacagcgt	gagctatgag	aaagcgcac	gcttcccga	gggagaaaag	cggacaggta	4560
tccggtaagc	ggcagggctg	gaacaggaga	gcgcacgagg	gagcttccag	ggggaaacgc	4620
ctggtatctt	tatagtcctg	tcgggttttc	ccacctctga	cttgagcgtc	gatttttgtg	4680
atgctcgtca	ggggggcgga	gcctatggaa	aaacgccagc	aacgcggcct	ttttacgggt	4740
cctggccttt	tgctggcctt	ttgctcacat	gttctttcct	gcgttatccc	ctgattctgt	4800
ggataaccgt	attaccgcct	ttgagtgage	tgataccgct	cgcgcagacc	gaacgaccga	4860
gcgcagcgag	tcagtgageg	aggaagcgga	agagcgccct	atgcgggtatt	ttctccttac	4920
gcactctgtg	ggtattttcac	accgcataat	gtgcaactct	agtacaatct	gctctgatgc	4980
cgcatagtta	agccagtgata	cactccgcta	tcgctacgtg	actgggtcat	ggctgcgccc	5040
cgacaccgcg	caacaccgcg	tgacgcgccc	tgacgggctt	gtctgctccc	ggcatccgct	5100
tacagacaag	ctgtgaccgt	ctccgggagc	tgcatgtgtc	agagggtttt	accgtcatca	5160
ccgaaacgcg	cgaggcagct	gtggaatgtg	tgctcagttg	gggtgtggaa	gtccccaggc	5220
tccccagcag	gcagaagtat	gcaaagcatg	catctcaatt	agtcagcaac	cagggtcccc	5280
agcaggcaga	agtatgcaaa	gcattgcatt	caattagtca	gcaaccatag	ttccgcccct	5340
aactccgccc	atcccgcccc	taactccgcc	cagttccgcc	cattctccgc	cccatggctg	5400
actaattttt	tttattttat	gagaggccga	ggccgcctcg	gcctctgagc	tattccagaa	5460
gtagtgagga	ggcttttttt	gaggcctagg	cttttgcaaa	aagctagctt	cacgctgccg	5520
caagcactca	gggcgcaagg	gctgctaaag	gaagcggaac	acgtagaaa	ccagtcgcga	5580
gaaacggtgc	tgaccccgga	tgaatgtcag	ctactgggct	atctggacaa	gggaaaacgc	5640
aagcgcgaa	agaaagcagg	tagcttgcag	tgggcttaca	tggcgatagc	tagactgggc	5700
ggtttttatg	acagcaagcg	aaccggaatt	gccagctggg	gcgccctctg	gtaagggttg	5760
gaagccctgc	aaagtaaaact	ggatggcttt	cttgccgcca	aggatctgat	ggcgcagggg	5820
atcaagatct	gatcaagaga	caggatgagg	atcgtttcgc	atgattgaac	aagatggatt	5880
gcacgcaggt	tctccggccg	cttgggtgga	gaggctattc	ggctatgact	gggcacaaca	5940
gacaatcggc	tgctctgatg	ccgcctgtgt	ccggtgttca	gcgcaggggc	gcccgggttct	6000
ttttgtcaag	accgacctgt	ccggtgccct	gaatgaactg	caggacgagg	cagcgcggct	6060
atcgtggctg	gccacgacgg	gcgttccctt	cgcagctgtg	ctcgacgttg	tactgaagc	6120
gggaaggggac	tggctgctat	tgggcgaagt	gccggggcag	gatctcctgt	catctcacct	6180
tgctcctgcc	gagaaagtat	ccatcatggc	tgatgcaatg	cggcggtctg	atacgttgga	6240
tccggctacc	tgccatttcg	accaccaagc	gaaacatcgc	atcgagcgag	caegtactcg	6300
gatggaagcc	ggtcttgtcg	atcaggatga	tctggacgaa	gagcatcagg	ggctcgcgcc	6360
agccgaactg	ttcgccaggc	tcaaggcgcg	catgcccagc	ggcgaggatc	tcgtcgtgac	6420
ccatggcgat	gcctgcttgc	cgaatatcat	ggtggaaaat	ggccgctttt	ctggattcat	6480
cgactgtggc	cggctgggtg	tggcggaccg	ctatcaggac	atagcgttgg	ctaccctgta	6540
tattgtgtaa	gagcttggcg	gcgaatgggc	tgaccgcttc	ctcgtgcttt	acggtatcgc	6600
cgtccccgat	tcgcagcgca	tcgccttcta	tcgccttctt	gacgagttct	tctgagcggg	6660
actctggggg	tcgaaatgac	cgaccaagcg	acgcccaccc	tgccatcacg	agatttcgat	6720
tccaccgccg	ccttctatga	aaggttgggc	ttcggaatcg	ttttccggga	cgcgggctgg	6780
atgatectcc	agcgcgggga	tctcatgctg	gagttcttcg	cccaccccg	gctcgatccc	6840
ctcgcgagtt	ggttcagctg	ctgcctgagg	ctggacgacc	tcgcggagtt	ctaccggcag	6900
tgcaaatccg	tcggcatcca	ggaaaccagc	agcggctatc	cgcgcattcca	tgcccccgaa	6960
ctgcaggagt	ggggaggcac	gatggccgct	ttggtcccgg	atctttgtga	aggaacctta	7020
cttctgtggt	gtgacataat	tggacaaaact	acctacagag	atttaaaagt	ctaaggtaaa	7080
tataaaattt	ttaagtgtat	aatgtgttaa	actactgatt	ctaattgttt	gtgtatttta	7140
gattccaacc	tatggaactg	atgaatggga	gcagtgggtg	aatgccttta	atgaggaaaa	7200
cctgtttttg	tcagaagaaa	tgccatctag	tgatgatgag	gctactgctg	actctcaaca	7260
ttctactcct	ccaaaaaaga	agagaaaagg	agaagacccc	aaggactttc	cttcagaatt	7320
gctaagtttt	ttgagtcatg	ctgtgttttag	taatagaact	cttgcttgct	ttgctattta	7380



```

caccacaaag gaaaaagctg cactgctata caagaaaatt atggaaaaat attctgtaac 7440
ctttataagt aggcataaca gttataatca taacatactg ttttttctta ctccacacag 7500
gcatagagtg tctgctatta ataactatgc tcaaaaaattg tgtaccttta gctttttaat 7560
ttgtaaaggg gttaataagg aatatttgat gtatagtgcc ttgactagag atcataatca 7620
gccataccac atttgtagag gttttacttg ctttaaaaaa cctcccacac ctccccctga 7680
acctgaaaca taaaatgaat gcaattgttg ttgttaactt gtttattgca gcttataatg 7740
gttacaaata aagcaatagc atcaciaaatt tcacaaataa agcatttttt tcaactgcatt 7800
ctagttgtgg tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttatca tgtctggatc taataaaaga 7860
tatttatttt cattagatat gtgtgttggg tttttgtgtg cagtgcctct atctggaggc 7920
caggtagggc tggccttggg ggagggggag gccagaatga ctccaagagc tacaggaagg 7980
caggtcagag accccactgg acaaacagtg gctggactct gcaccataac acacaatcaa 8040
caggggagtg agctggaaat ttgctagc                                     8068

```

<210> 28

<211> 239

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

```

Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Pro Leu Trp Val Ser Gly
  1                               5                               10                               15

```

```

Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val
                20                               25                               30

```

```

Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
        35                               40                               45

```

```

Leu Tyr Ser Arg Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys
    50                               55                               60

```

```

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Phe Trp Ala Ser Thr Arg Glu
   65                               70                               75                               80

```

```

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe
                85                               90                               95

```

```

Asn Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Asp
    100                               105                               110

```

```

Cys Gln Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
    115                               120                               125

```

```

Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
    130                               135                               140

```

```

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
   145                               150                               155                               160

```

```

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
                165                               170                               175

```

```

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
    180                               185                               190

```



Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 29

<211> 7731

<212> DNA

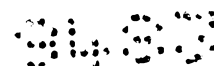
<213> Homo sapiens

<400> 29

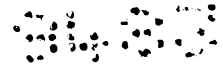
```

ttgaagacga aagggcctcg tgatacgctt atttttatag gttaatgtca tgataataat 60
ggtttcttag acgtcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttgttt 120
attttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct 180
tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc 240
cttttttgcg gcattttgcc ttctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa 300
agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg 360
taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaaagt 420
tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtgt tgacgcgggg caagagcaac tcggtcgccg 480
catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac 540
ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc 600
ggccaactta ctctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgcacaa 660
catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc 720
aaacgacgag cgtgacacca cgatgectgc agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt 780
aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga 840
taaagttgca ggaccacttc tgcgtcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa 900
atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcggcg tatcattgca gcactggggc cagatggtaa 960
gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa 1020
tagacagatc gctgagatag gtgectcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt 1080
ttactcatat aacttttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttataaa ggatctaggt 1140
gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg 1200
agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt 1260
aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca 1320
agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac 1380
tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 1440
atacctcgt ctgctaacc ttgtaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct 1500
taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg 1560
gggttcgtgc acacagccca gcttgagcgg aacgacctac accgaactga gatacctaca 1620
gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccgg 1680
aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 1740
tctttatagt cctgtcgggt ttccgccact ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 1800
gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc 1860
cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tctgctgta tcccctgatt ctgtggataa 1920
ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgcgcg agccgaacga ccgagcgcag 1980
cgagtcagtg agcaggaag cggaagagcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcattc 2040
gtgcgggtatt tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata 2100
gttaagccag tatacactcc gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc gcccgcacac 2160
ccgccaacac ccgtgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga 2220
caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatt tgtcagaggt ttccaccgtc atcacgaaa 2280
cgcgcgaggc agcatgcatc tcaattagtc agcaaccata gtcccgcgcc taactccgcc 2340
catcccgcgc ctaactccgc ccagttccgc ccattctccg ccccatggct gactaatttt 2400

```



ttttatttat	gcagaggccg	aggccgcctc	ggcctctgag	ctattccaga	agtagtgagg	2460
aggctttttt	ggaggcctag	gcttttgcaa	aaagctagct	tacagctcag	ggctgcgatt	2520
tcgcgccaaa	cttgacggca	atcctagcgt	gaaggctggt	aggattttat	ccccgctgcc	2580
atcatgggtc	gaccattgaa	ctgcatcgtc	gccgtgtccc	aaaatatggg	gattggcaag	2640
aacggagacc	taccctggcc	tccgctcagg	aacgagttca	agtacttcca	agaatgacc	2700
acaacctctt	cagtggaagg	taaacagaat	ctggtgatta	tgggtaggaa	aacctgggtc	2760
tccattcctg	agaagaatcg	acctttaaag	gacagaatta	atatagttct	cagtagagaa	2820
ctcaaagaac	caccacgagg	agctcatttt	cttgccaaaa	gtttggatga	tgccttaaga	2880
cttattgaac	aaccggaatt	ggcaagtaaa	gtagacatgg	tttggatagt	cggaggcagt	2940
tctgtttacc	aggaagccat	gaatcaacca	ggccacctca	gactctttgt	gacaaggatc	3000
atgcaggaat	ttgaaagtga	cacgtttttc	ccagaaattg	atltggggaa	atataaactt	3060
ctcccagaat	acccaggcgt	cctctctgag	gtccaggagg	aaaaaggcat	caagtataag	3120
tttgaagtct	acgagaagaa	agactaacag	gaagatgctt	tcaagttctc	tgctcccctc	3180
ctaaagctat	gcattttttat	aagaccatgg	gacttttgct	ggcttttagat	ctttgtgaag	3240
gaaccttact	tctgtggtgt	gacataattg	gacaaactac	ctacagagat	ttaaagctct	3300
aaggtaaata	taaaattttt	aagtgtataa	tgtgttaaac	tactgattct	aattgtttgt	3360
gtattttaga	ttccaacctt	tggaaactgat	gaatgggagc	agtgggtggaa	tgcctttaat	3420
gaggaaaacc	tgttttgctc	agaagaaatg	ccatctagtg	atgatgaggc	tactgctgac	3480
tctcaacatt	ctactcctcc	aaaaaagaag	agaaaggtag	aagaccccaa	ggactttcct	3540
tcagaattgc	taagtttttt	gagtcatgct	gtgttttagta	atagaactct	tgcttgcttt	3600
gctatttaca	ccacaaagga	aaaagctgca	ctgctataca	agaaaattat	ggaaaaatat	3660
tctgtaacct	ttataagtag	gcataacagt	tataatcata	acatactggt	ttttcttact	3720
ccacacaggc	atagagtgtc	tgctattaat	aactatgctc	aaaaattgtg	tacctttagc	3780
tttttaattt	gtaaaggggt	taataaggaa	tatttgatgt	atagtgcctt	gactagagat	3840
cataatcagc	cataccacat	ttgtagaggt	tttacttgct	ttaaaaaacc	tcccacacct	3900
ccccctgaac	ctgaaacata	aatgaatgc	aattgttggt	gttaacttgt	ttattgcagc	3960
ttataatggt	tacaaataaa	gcaatagcat	cacaaatttc	acaaataaag	catttttttc	4020
actgcattct	agttgtgggt	tgtccaaact	catcaatgta	tcttatcatg	tctggatcta	4080
ataaaaagata	tttattttca	ttagatatgt	gtgttggttt	tttgtgtgca	gtgcctctat	4140
ctggaggcca	ggtagggtctg	gccttggggg	agggggaggc	cagaatgact	ccaagagcta	4200
caggaaggca	ggtcagagac	cccactggac	aaacagtggc	tggactctgc	accataacac	4260
acaatcaaca	ggggagttag	ctggaaattt	gctagcgaat	tccagcacac	tggcggccgt	4320
tactagttat	taatagtaat	caattacggg	gtcattagtt	catagcccat	atatggagtt	4380
ccgcgttaca	taacttacgg	taaatggccc	gcctggctga	ccgcccacag	acccccgccc	4440
attgacgtca	ataatgacgt	atgttcccat	agtaacgcca	atagggactt	tccattgacg	4500
tcaatgggtg	gagtattttac	ggtaaactgc	ccacttggca	gtacatcaag	tgtatcataat	4560
gccaagtacg	ccccctattg	acgtcaatga	cggtaaattg	ccgcctggc	attatgcca	4620
gtacatgacc	ttatgggact	ttcctacttg	gcagtacatc	tacgtattag	tcategctat	4680
taccatgggtg	atgcgggttt	ggcagtacat	caatgggcgt	ggatagcggg	ttgactcacg	4740
gggatttcca	agtctccacc	ccattgacgt	caatgggagt	ttgttttggc	acaaaaatca	4800
acgggacttt	ccaaaatgtc	gtaacaactc	cgccccattg	acgcaaattg	gcggtaggcg	4860
tgtacgggtg	gaggtctata	taagcagagc	tcgtttagt	aaccgtcaga	tcgcctggag	4920
acgccatcca	cgtgttttg	acctccatag	aagacaccgg	gaccgatcca	gcctccgcgg	4980
ccgggaacgg	tgcattggaa	cgcggattcc	ccgtgccaa	agtgcgta	gtaccgccta	5040
tagagtctat	aggcccaccc	ccttggtctc	ttatgcatgc	tatactgttt	ttggcttggg	5100
gtctatacac	ccccgcttcc	tcattgttata	ggtgatggta	tagcttagcc	tatagggtgtg	5160
ggttattgac	cattattgac	cactccccta	ttggtgacga	tactttccat	tactaatcca	5220
taacatgggt	ctttgccaca	actctcttta	ttggctatat	gccaatacac	tgtccttcag	5280
agactgacac	ggactctgta	tttttacag	atgggtctc	atttattatt	tacaaattca	5340
catatacaac	accaccgtcc	ccagtgcccg	cagtttttat	taaacataac	gtgggatctc	5400
cacgcgaatc	tcgggtacgt	gttccggaca	tgggtctctc	tccggtagcg	gcggagcttc	5460
tacatccgag	ccctgctccc	atgcctccag	cgactcatgg	tcgctcggca	gtccttgtct	5520
cctaacagt	gaggccagac	ttaggcacag	cacgatgccc	accaccacca	gtgtgccgca	5580
caaggccgtg	gcggtagggg	atgtgtctga	aatgagctc	ggggagcggg	cttgaccgcg	5640
tgacgcattt	ggaagactta	aggcagcggc	agaagaagat	gcaggcagct	gagttgttgt	5700
gttctgataa	gagtcagagg	taactcccgt	tgcgggtgctg	ttaacggtgg	agggcagtgt	5760



```

agtctgagca gtactcgttg ctgccgcgcg cgccaccaga cataatagct gacagactaa 5820
cagactgttc ctttccatgg gtcttttctg cagtcaccgt ccttgacacg cgtctcggga 5880
agcttgccgc caccatggga tggagctggg tctttctctt tctcctgtca ggaactgcag 5940
gtgtcctctc tgagggtccag ctgcaacagt ctggacctga gctgggtgaag cctggggcctt 6000
cagtaaagat gtcctgcaag acttctagat acacattcac tgaatacacc atacactggg 6060
tgagacagag ccatggaaaag agccttgagt ggattggagg tattaatcct aacaatggta 6120
ttcctaacta caaccagaag ttcaagggca gggccacatt gactgtaggc aagtcctcca 6180
gcaccgccta catggagctc cgcagcctga catctgagga ttctgcggtc tatttctgtg 6240
caagaagaag aatcgcttat ggttacgacg agggccatgc tatggactac tgggggtcaag 6300
gaacctcagt caccgtctcc tcaggtgagt ggatcctctg cgcttgggcc cagctctgtc 6360
ccacaccgcg gtcacatggc accacctctc ttgcagcctc caccaagggc ccatcgggtc 6420
tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac agcggccctg ggctgcctgg 6480
tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg 6540
gcgtgcacac cttcccggct gtctacagat cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg 6600
tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc 6660
ccagcaacac caaggtggac aagaaaagtg agcccaaate ttgtgacaaa actcacacat 6720
gcccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc tccccccaa 6780
aaccacaagg caccctcatg atctcccggg cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg 6840
tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata 6900
atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgggtg gtcagcgtcc 6960
tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca 7020
aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac 7080
cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag gtcagcctga 7140
cctgcctggg caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc 7200
agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc 7260
tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct 7320
ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg 7380
gtaaatgagt gcgacggccg gcaagccccg ctccccgggc tctcgcggtc gcacgaggat 7440
gcttggcacg taccctctgt acatacttcc cgggcgcccc gcatggaaat aaagcaccgg 7500
atctaataaa agatatttat tttcattaga tatgtgtgtt ggttttttgt gtgcagtgcc 7560
tctatctgga ggccaggtag ggctggcctt gggggagggg gaggccagaa tgactccaag 7620
agctacagga aggcagggtc gagacccac tggacaaaca gtggctggac tctgcacat 7680
aacacacaat caacagggga gtgagctgga aatttgctag cgaattaatt c 7731

```

<210> 30

<211> 472

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

```

Met Gly Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
  1                      5                      10                      15

```

```

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
          20                      25                      30

```

```

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Arg Tyr Thr Phe
          35                      40                      45

```

```

Thr Glu Tyr Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
  50                      55                      60

```

```

Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Ile Pro Asn Tyr Asn
  65                      70                      75                      80

```



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



Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 385 390 395 400
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 405 410 415
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 420 425 430
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 435 440 445
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 450 455 460
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 31
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 31
 gacattgtga tgacccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagtca gagcctttta tattctagaa atcaaaagaa ctacttggcc 120
 tggatcagc agaaaccagg acagccaccc aaactcctca tcttttgggc tagcactagg 180
 gaatctgggg tacctgatag gttcagtggc agtgggtttg ggacagactt caccctcacc 240
 attagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttttagctat 300
 ccgctcacgt tcggacaagg gaccaaggtg gaaataaaa 339

<210> 32
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 32
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Arg Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Phe Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80



Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 33

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Arg Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Phe Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Asp Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 34

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Arg Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45



Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 35
 <211> 8068
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 35
 gaattccagc acactggcgg ccgttactag ttattaatag taatcaatta cggggtcatt 60
 agttcatagc ccatatatgg agttccgcgt tacataactt acggtaaattg gccgcctgg 120
 ctgaccgccc aacgaccccc gccattgac gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac 180
 gccaataggg actttccatt gacgtcaatg ggtggagtat ttacggtaaa ctgcccactt 240
 ggcagtacat caagtgtatc atatgccaag tacgccccct attgacgtca atgacggtaa 300
 atggcccggc tggcattatg cccagtacat gaccttatgg gactttccta cttggcagta 360
 catctacgta ttagtcatcg ctattaccat ggtgatgcgg ttttggcagt acatcaatgg 420
 gcgtggatag cggtttgact cacggggatt tccaagtctc caccgccattg acgtcaatgg 480
 gagtttgttt tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaaa tgtcgtaaca actccgcccc 540
 attgacgcaa atgggcggta ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca gagctcgttt 600
 agtgaaccgt cagatcgctt ggagacgcca tccacgtgtt tttgacctcc atagaagaca 660
 ccgggaccga tccagcctcc gcggccggga acggtgcatt ggaacgcgga ttccccgtgc 720
 caagagtacg gtaagtaccg cctatagagt ctataggccc acccccttgg cttcttatgc 780
 atgctatact gtttttggct tgggggtctat acacccccgc ttctcatgt tataggtgat 840
 ggtatagctt agcctatagg tgtgggttat tgaccattat tgaccactcc cctattgggtg 900
 acgatacttt ccattactaa tccataacat ggctctttgc cacaactctc tttattggct 960
 atatgccaat acactgtcct tcagagactg acacggactc tgtattttta caggatgggg 1020
 tctcatttat tatttacaaa ttcacatata caacaccacc gtccccagtg cccgcagttt 1080
 ttattaaaca taacgtggga tctccacgcg aatctcgggt acgtgttccg gacatgggct 1140
 cttctccggt agcggcgagg cttctacatc cgagccctgc tcccatgcct ccagcgactc 1200
 atggtcgctc ggcagctcct tgctcctaac agtggaggcc agacttaggc acagcacgat 1260
 gccaccacc accagtgtgc cgcacaaggc cgtggcggtg gggatatgtg ctgaaaatga 1320
 gctcggggag cgggcttgca ccgctgacgc atttgaaga ctaaggcag cggcagaaga 1380
 agatgcaggc agctgagttg ttgtgttctg ataagagtca gaggttaact ccgttgcggt 1440
 gctgttaacg gtggagggca gtgtagtctg agcagtactc gttgctgccg cgcgcgccac 1500
 cagacataat agctgacaga ctaacagact gttcctttcc atgggtcttt tctgcagtca 1560
 ccgtccttga cacgcgtctc gggaagcttg ccgccaccat ggagacagac acactcctgc 1620
 tatgggtgct gctgctctgg gttccagggt cctccggaga cattgtgatg acccaatctc 1680
 cagactcttt ggctgtgtct ctaggggaga gggccaccat caactgcaag tccagtcaga 1740
 gccttttata ttctagaaat caaaagaact acttggcctg gtatcagcag aaaccaggac 1800
 agccacccaa actcctcatc ttttgggcta gcactaggga atctggggta cctgataggt 1860
 tcagtggcag tgggtttggg acagacttca cctcaccat tagcagcctg caggctgaag 1920
 atgtggcagt ttattactgt cagcaatatt ttagctatcc gctcacgttc ggacaaggga 1980
 ccaaggtgga aataaaacgt gagtggatcc atctgggata agcatgctgt tttctgtctg 2040



tccctaacat	gccctgtgat	tatgcgcaaa	caacacaccc	aagggcagaa	ctttgttact	2100
taaacaccat	cctgtttgct	tctttctca	ggaactgtgg	ctgcaccatc	tgtcttcac	2160
ttcccgccat	ctgatgagca	gttgaaatct	ggaactgcct	ctgttggtg	cctgctgaat	2220
aacttctatc	ccagagagggc	caaagtacag	tggaaggtgg	ataacgccct	ccaatcggt	2280
aactcccagg	agagtgtcac	agagcaggac	agcaaggaca	gcacctacag	cctcagcagc	2340
accctgacgc	tgagcaaaagc	agactacgag	aaacacaaag	tctacgcctg	cgaagtcacc	2400
catcagggcc	tgagctcgcc	cgtcacaaag	agcttcaaca	ggggagagt	ttagagggag	2460
aagtgcctcc	acctgctcct	cagttccagc	ctgacccct	cccatccttt	ggcctctgac	2520
cctttttcca	caggggacct	accctattg	cggtcctcca	gctcatcttt	cacctcaccc	2580
ccctcctcct	ccttggtctt	aattatgcta	atgttgagg	agaatgaata	aataaagtga	2640
atctttgcac	ctgtggtgga	tctaataaaa	gatatttatt	ttcattagat	atgtgtgtt	2700
gtttttgtg	tgagtgctc	ctatctggag	gccaggtagg	gctggccttg	ggggagggg	2760
aggccagaat	gactccaaga	gctacaggaa	ggcaggtcag	agacccact	ggacaaacag	2820
tggtcgact	ctgcaccata	acacacaatc	aacaggggag	tgagctggaa	atttgctagc	2880
gaattcttga	agacgaaagg	gcctcgtgat	acgcctat	ttataggtta	atgtcatgat	2940
aataatggtt	tcttagacgt	caggtggcac	tttccgggga	aatgtgcgcg	gaaccctat	3000
ttgtttat	ttctaaatac	attcaaatat	gtatccgctc	atgagacaat	aaccctgata	3060
aatgcttcaa	taataattgaa	aaaggaagag	tatgagtatt	caacatttcc	gtgtcgccct	3120
tattcccttt	tttgcgcat	tttgcccttc	tgttttgtg	caccagaaa	cgctggtgaa	3180
agtaaaagat	gctgaagatc	agttgggtgc	acgagtgggt	tacatcgaac	tgatctcaa	3240
cagcggtgaag	atccttgaga	gttttcgccc	cgaagaacgt	tttccaatga	tgagcacttt	3300
taaagttctg	ctatgtggcg	cggtattatc	ccgtgttgac	gccgggcaag	agcaactcgg	3360
tcgccgcata	cactattctc	agaatgactt	ggttgagtac	tcaccagtca	cagaaaagca	3420
tcttacggat	ggcatgacag	taagagaatt	atgcagtgtc	gccataacca	tgagtataa	3480
cactgcggcc	aacttacttc	tgacaacgat	cggaggaccg	aaggagctaa	ccgctttttt	3540
gcacaacatg	gggatcatg	taactcgcct	tgatcggttg	gaaccggagc	tgaatgaagc	3600
cataccaac	gacgagcgtg	acaccacgat	gcctgcagca	atggcaacaa	cgttgcgcaa	3660
actattaact	ggcgaactac	ttactctagc	ttcccgcaa	caattaatag	actggatgga	3720
ggcgataaaa	gttgaggagc	cacttctgcg	ctcgccctt	ccggctggct	ggtttattgc	3780
tgataaatct	ggagccggtg	agcgtgggtc	tcgcggtatc	attgcagcac	tggggccaga	3840
tggtaaagcc	tcccgatcgc	tagttatcta	cacgacgggg	agtcaggcaa	ctatggatga	3900
acgaaataga	cagatcgctg	agataggtgc	ctcactgatt	aagcattggt	aactgtcaga	3960
ccaagtttac	tcatatatac	tttagattga	tttaaaactt	catttttaat	ttaaaaggat	4020
ctaggtgaag	atcctttttg	ataatctcat	gaccaaatac	ccttaacgtg	agttttcggt	4080
ccactgagcg	tcagaccccg	tagaaaagat	caaaggatct	tcttgagatc	ctttttttct	4140
gcgcgtaatc	tgctgcttgc	aaacaaaaaa	accaccgcta	ccagcgggtg	tttgtttgcc	4200
ggatcaagag	ctaccaactc	tttttccgaa	ggtaactggc	ttcagcagag	cgcagatacc	4260
aaataactgtc	cttctagtgt	agccgtagtt	aggccaccac	ttcaagaact	ctgtagcacc	4320
gcctacatac	ctcgtctctg	taatcctgtt	accagtggct	gctgccagt	gcgataagtc	4380
gtgtcttacc	gggttgact	caagacgata	gttaccggat	aaggcgcagc	ggtcgggctg	4440
aacgggggggt	tcgtgcacac	agcccagctt	ggagcgaacg	acctacaccg	aactgagata	4500
cctacagcgt	gagctatgag	aaagcgccac	gcttcccgaa	gggagaaaag	cggacaggta	4560
tccggtaagc	ggcagggctg	gaacaggaga	gcgcacgagg	gagcttccag	ggggaaacgc	4620
ctggatatctt	tatagtcctg	tcgggtttcg	ccacctctga	cttgagcgtc	gatttttgtg	4680
atgctcgtca	ggggggcgga	gcctatggaa	aaacgccagc	aacgcggcct	ttttacgggt	4740
cctggccttt	tgctggcctt	ttgctcacat	gttctttcct	gcgttatccc	ctgattctgt	4800
ggataaccgt	attaccgctt	ttgagtgagc	tgataccgct	cgccgcagcc	gaacgaccga	4860
gcgcagcgag	tcagtgagcg	aggaagcgga	agagcgctg	atgcgggtatt	ttctccttac	4920
gcactctgtc	ggtattttcac	accgcataatg	gtgcactctc	agtacaatct	gctctgatgc	4980
cgcatagtta	agccagtata	cactccgcta	tcgctacgtg	actgggtcat	ggctgcgcc	5040
cgcacccgc	caacacccgc	tgacgcgcc	tgacgggctt	gtctgctccc	ggcatccgct	5100
tacagacaag	ctgtgaccgt	ctccgggagc	tgcatgtgtc	agaggttttc	accgtcatca	5160
ccgaaacgcg	cgaggcagct	gtggaatgtg	tgctcagttag	ggtgtggaaa	gtccccaggc	5220
tccccagcag	gcagaagtat	gcaaagcatg	catctcaatt	agtcagcaac	caggtcccc	5280
agcaggcaga	agtatgcaaa	gcatgcatct	caattagtca	gcaaccatag	tcccgccct	5340
aactccgccc	atcccgcccc	taactccgcc	cagttccgcc	cattctccgc	cccatggctg	5400



```

actaattttt tttatttatg cagaggccga ggccgcctcg gcctctgagc tattccagaa 5460
gtagttagga ggcttttttg gaggcctagg cttttgcaaa aagctagctt cacgctgccg 5520
caagcactca gggcgcaagg gctgctaaag gaagcggaac acgtagaaag ccagtcgcga 5580
gaaacggtgc tgaccccgga tgaatgtcag ctactgggct atctggacaa gggaaaacgc 5640
aagcgcaaag agaaagcagg tagcttgtag tgggcttaca tggcgatagc tagactgggc 5700
ggtttttatg acagcaagcg aaccggaatt gccagctggg gcgccctctg gtaaggttg 5760
gaagccctgc aaagtaaact ggatggcttt cttgccgcca aggatctgat ggcgcagggg 5820
atcaagatct gatcaagaga caggatgagg atcgtttcgc atgattgaac aagatggatt 5880
gcacgcaggt tctccggccg cttgggtgga gaggtattc ggctatgact gggcacaaca 5940
gacaatcggc tgctctgatg ccgccgtgtt ccggtgtca gcgcaggggc gcccggttct 6000
ttttgtcaag accgacctgt ccggtgccct gaatgaactg caggacgagg cagcgcggt 6060
atcgtagctg gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg ctgcacgttg tactgaagc 6120
gggaaggggc tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt catctcacct 6180
tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg cggcggtgc atacgcttga 6240
tccggctacc tgccattcg accaccaagc gaaacatcgc atcgagcgag cacgtactcg 6300
gatggaagcc ggtcttgctg atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc 6360
agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg catgcccagc ggcgaggatc tcgtcgtgac 6420
ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat ggccgctttt ctggattcat 6480
cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctaccctga 6540
tattgctgaa gagcttgccg gcgaatggc tgaccgcttc ctcggtcttt acggtatcgc 6600
cgctcccgat tcgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct tctgagcggg 6660
actctggggt tcgaaatgac cgaccaagcg acgcccacc tgccatcacg agatttcgat 6720
tccaccgccc ccttctatga aaggttgggc ttcggaatcg tttccggga cgcggctgg 6780
atgatcctcc agcgcgggga tctcatgctg gaggcttctg cccaccgccg gctcgatccc 6840
ctcgcgagtt ggttcagctg ctgcctgagg ctggacgacc tcgcggagtt ctaccggcag 6900
tgcaaatccg tcggcatcca ggaaaccagc agcggctatc cgcgcacca tgccccgaa 6960
ctgcaggagt ggggaggcac gatggccgct ttggtcccgg atctttgtga aggaacctta 7020
cttctgtggt gtgacataat tggacaaact acctacagag atttaaagct ctaaggtaaa 7080
tataaaattt ttaagtgtat aatgtgttaa actactgatt ctaattgttt gtgtatttta 7140
gattccaacc tatggaactg atgaatggga gcagtgtgg aatgccttta atgaggaaaa 7200
cctgttttgc tcagaagaaa tgccatctag tgatgatgag gctactgctg actctcaaca 7260
ttctactcct ccaaaaaaga agagaaaggt agaagacccc aaggactttc cttcagaatt 7320
gctaagtttt ttgagtcatt ctgtgtttag taatagaact cttgcttgct ttgctattta 7380
caccacaaag gaaaaagctg cactgctata caagaaaatt atggaaaaat attctgtaac 7440
ctttataagt aggcataaca gttataatca taacatactg tttttctta ctccacacag 7500
gcatagagtg tctgctatta ataactatgc tcaaaaattg tgtaccttta gctttttaat 7560
ttgtaaaggg gttaataagg aatatttgat gtatagtgcc ttgactagag atcataatca 7620
gccataccac atttgtagag gttttacttg ctttaaaaaa cctcccacac ctccccctga 7680
acctgaaaca taaaatgaat gcaattgttg ttgttaactt gtttattgca gcttataatg 7740
gttacaaata aagcaatagc atcaciaaatt tcacaaataa agcatttttt tactgcatt 7800
ctagtgtggg tttgtccaaa ctcataatg tatcttatca tgtctggatc taataaaaaga 7860
tatttatatt cattagatat gtgtgttggt tttttgtgtg cagtgcctct atctggaggc 7920
caggtagggc tggccttggg ggagggggag gccagaatga ctccaagagc tacaggaagg 7980
caggtcagag accccactgg acaaacagtg gctggactct gcaccataac acacaatcaa 8040
caggggagtg agctggaaat ttgctagc                                     8068

```

<210> 36

<211> 234

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1

5

10

15



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

<210> 37

<211> 372

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 37

caggtgcaac tagtgcagtc cggcgccgaa gtgaagaaac ccggtgcttc cgtgaaagtc 60
 agctgtaaaa ctagtagata caccttcaact gaatacacca tacactgggt tagacaggcc 120
 cctggccaaa ggctggagtg gataggaggt attaatacta acaatgggtat tcctaactac 180
 aaccagaagt tcaagggccg ggccaccttg accgtaggca agtctgccag caccgcctac 240
 atggaactgt ccagcctgcg ctccgaggac actgcagtct actactgcgc cagaagaaga 300
 atcgcttatg gttacgacga gggccatgct atggactact ggggtcaagg aacccttgtc 360
 accgtctcct ca 372



<210> 38
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 38
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Arg Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30
 Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Ile Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Gly Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Arg Ile Ala Tyr Gly Tyr Asp Glu Gly His Ala Met Asp
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 39
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 39
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Arg Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30
 Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Ile Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Gly Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95



Ala Arg Arg Arg Ile Ala Tyr Gly Tyr Asp Glu Gly His Ala Met Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 40
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 40
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Arg Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30

Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Ile Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Arg Ile Ala Tyr Gly Tyr Asp Glu Gly His Ala Met Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 41
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 41
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30

Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Ile Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60



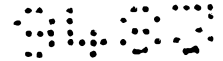
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Arg Ile Ala Tyr Gly Tyr Asp Glu Gly His Ala Met Asp
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 42
 <211> 7731
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 42
 ttgaagacga aagggcctcg tgatacgctt atttttatag gttaatgtca tgataataat 60
 ggtttcttag acgtcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttgttt 120
 atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct 180
 tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc 240
 cttttttgcg gcattttgcc ttctgtttt tgctcaccga gaaacgctgg tgaaagtaaa 300
 agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt ggggtacatc gaactggatc tcaacagcgg 360
 taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgtttttcca atgatgagca cttttaaagt 420
 tctgctatgt ggcgcggtat tatcccggtg tgacgcccgg caagagcaac tcggtcgccg 480
 catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac 540
 ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc 600
 ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgacaaa 660
 catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccataacc 720
 aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgc agcaatggca acaacgttgc gcaactatt 780
 aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcggg 840
 taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctgggtta ttgctgataa 900
 atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcggcg tatcattgca gcaactgggc cagatggtaa 960
 gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa 1020
 tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt 1080
 ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt 1140
 gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg 1200
 agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt 1260
 aactgtgtgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca 1320
 agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac 1380
 tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 1440
 atacctcgt ctgctaattc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct 1500
 taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg 1560
 gggttcgtgc acacagccca gcttgagcgg aacgacctac accgaactga gatacctaca 1620
 gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggg 1680
 aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 1740
 tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 1800
 gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc 1860
 cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa 1920
 ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcggcgc agccgaacga ccgagcgcag 1980
 cgagtcagtg agcagaggaag cggaagagcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcattc 2040
 gtgcggtatt tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgcgcgata 2100
 gttaagccag tatacactcc gctatcgeta cgtgactggg tcatggctgc gcccgcacac 2160
 ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga 2220



caagctgtga	ccgtctccgg	gagctgcatg	tgtcagaggt	tttcaccgctc	atcaccgaaa	2280
cgcgcgaggg	agcatgcatc	tcaattagtc	agcaaccata	gtcccgcgcc	taactccgcc	2340
catcccgcgcc	ctaactccgc	ccagttccgc	ccattctccg	ccccatggct	gactaatttt	2400
ttttatttat	gcagaggccg	aggccgcctc	ggcctctgag	ctattccaga	agtagtgagg	2460
aggctttttt	ggaggcctag	gcttttgcaa	aaagctagct	tacagctcag	ggctgcgatt	2520
tcgcgccaaa	cttgacggca	atcctagcgt	gaaggctggt	aggattttat	ccccgctgcc	2580
atcatggttc	gaccattgaa	ctgcatcgtc	gccgtgtccc	aaaatatggg	gattggcaag	2640
aacggagacc	taccctggcc	tccgctcagg	aacgagttca	agtacttcca	aagaatgacc	2700
acaacctctt	cagtggaagg	taaacagaat	ctggtgatta	tgggtaggaa	aacctgggtc	2760
tccattcctg	agaagaatcg	acctttaaag	gacagaatta	atatagttct	cagtagagaa	2820
ctcaaagaac	caccacgagg	agctcatttt	cttgccaaaa	gtttggatga	tgctttaaga	2880
cttattgaac	aaccggaatt	ggcaagtaaa	gtagacatgg	tttggatagt	cggaggcagt	2940
tctgtttacc	aggaagccat	gaatcaacca	ggccacctca	gactctttgt	gacaaggatc	3000
atgcaggaat	ttgaaagtga	cacgtttttc	ccagaaattg	atltggggaa	atataaactt	3060
ctcccagaat	acccaggcgt	cctctctgag	gtccaggagg	aaaaaggcat	caagtataag	3120
tttgaagtct	acgagaagaa	agactaacag	gaagatgctt	tcaagttctc	tgctcccctc	3180
ctaaagctat	gcattttttat	aagaccatgg	gactttttgt	ggcttttagat	ctttgtgaag	3240
gaaccttact	tctgtggtgt	gacataattg	gacaaactac	ctacagagat	ttaaagctct	3300
aaggtaaata	taaaattttt	aagtgtataa	tgtgttaaac	tactgattct	aattgtttgt	3360
gtattttaga	ttccaacctt	tggaaactgat	gaatgggagc	agtgggtggaa	tgcttttaaat	3420
gaggaaaacc	tgttttgctc	agaagaaatg	ccatctagtg	atgatgaggc	tactgctgac	3480
tctcaacatt	ctactcctcc	aaaaaagaag	agaaaggtag	aagaccccaa	ggactttcct	3540
tcagaattgc	taagtttttt	gagtcatgct	gtgttttagta	atagaactct	tgcttgcttt	3600
gctatttaca	ccacaaagga	aaaagctgca	ctgctataca	agaaaattat	ggaaaaatat	3660
tctgtaacct	ttataagtag	gcataacagt	tataatcata	acatactgtt	ttttcttact	3720
ccacacaggc	atagagtgtc	tgctattaat	aactatgctc	aaaaattgtg	tacctttagc	3780
tttttaattt	gtaaaggggt	taataaggaa	tatttgatgt	atagtgcctt	gactagagat	3840
cataatcagc	cataccacat	ttgtagaggt	tttacttget	ttaaaaaacc	ttccacacct	3900
ccccctgaac	ctgaaacata	aatgaatgc	aattgttggt	gttaacttgt	ttattgcagc	3960
ttataatggt	tacaaataaa	gcaatagcat	cacaaatttc	acaaataaag	catttttttc	4020
actgcattct	agttgtggtt	tgtccaaact	catcaatgta	tcttatcatg	tctggatcta	4080
ataaaaagata	tttattttca	ttagatatgt	gtgttggttt	tttgtgtgca	gtgctcttat	4140
ctggaggcca	ggtagggctg	gccttggggg	agggggaggc	cagaatgact	ccaagagcta	4200
cagggaaggca	ggtcagagac	cccactggac	aaacagtggc	tggactctgc	accataacac	4260
acaatcaaca	ggggagttag	ctggaaattt	gctagcgaat	tccagcacac	tggcggccgt	4320
tactagttaa	taatagtaat	caattacggg	gtcattagtt	catagcccat	atatggagtt	4380
ccgcgttaca	taacttacgg	taaatggccc	gcctggctga	ccgcccaacg	acccccgccc	4440
attgacgtca	ataatgacgt	atgttcccat	agtaacgcca	atagggactt	tccattgacg	4500
tcaatgggtg	gagtattttac	ggtaaactgc	ccacttggca	gtacatcaag	tgtatcataat	4560
gccaagtacg	ccccctattg	acgtcaatga	cggtaaattg	ccgcctggc	attatgccca	4620
gtacatgacc	ttatgggact	ttcctacttg	gcagtacatc	tacgtattag	tcatcgctat	4680
taccatgggt	atgcggtttt	ggcagtacat	caatgggctg	ggatagcggg	ttgactcacg	4740
gggatttcca	agtctccacc	ccattgacgt	caatgggagt	ttgttttggc	acaaaaatca	4800
acgggacttt	ccaaaatgtc	gtaacaactc	cgccccattg	acgcaaattg	gcggtaggcg	4860
tgtacggtgg	gagggtctata	taagcagagc	tcgttttagtg	aaccgtcaga	tcgcctggag	4920
acgccatcca	cgtgtttttg	acctccatag	aagacaccgg	gaccgatcca	gcctccgcgg	4980
ccgggaacgg	tgcaattggaa	cgcggattcc	ccgtgccaaag	agtgcagtaa	gtaccgccta	5040
tagagtctat	aggcccaccc	ccttggtctt	ttatgcatgc	tatactgttt	ttggcttggg	5100
gtctatacac	ccccgtcttc	tcatgttata	ggtgatggta	tagcttagcc	tataggtgtg	5160
ggttattgac	cattattgac	cactccccta	ttggtgacga	tactttccat	tactaatcca	5220
taacatgget	ctttgccaca	actctcttta	ttggctatat	gccaatcac	tgctcttcag	5280
agactgacac	ggactctgta	tttttacagg	atggggtctc	atttattatt	tacaaattca	5340
catatacaac	accaccgtcc	ccagtgcccg	cagtttttat	taaacataac	gtgggatctc	5400
cacgcgaatc	tcgggtacgt	gttcgggaca	tgggctcttc	tccggtagcg	gcggagcttc	5460
tacatccgag	ccctgctccc	atgcctccag	cgactcatgg	tcgctcggca	gtccttgct	5520
cctaacagtg	gaggccagac	ttaggcacag	cacgatgcc	accaccacca	gtgtgccgca	5580



```

caagggcgtg gcggtagggg atgtgtctga aaatgagctc ggggagcggg cttgcaccgc 5640
tgacgcattt ggaagactta aggcagcggc agaagaagat gcaggcagct gagttgttgt 5700
gttctgataa gagtcaagg taactcccgt tgcggtgctg ttaacggtgg agggcagtgt 5760
agtctgagca gtactcgttg ctgccgcgcg cgccaccaga cataatagct gacagactaa 5820
cagactgttc ctttccatgg gtcttttctg cagtcaccgt ccttgacacg cgtctcggga 5880
agcttgccgc caccatggac tggacctggc gcgtgttttg cctgctcgcc gtggctcctg 5940
gggcccacag ccaggtgcaa ctggtgcagt ccggcgccga agtgaagaaa cccggtgctt 6000
ccgtgaaagt cagctgtaaa actagtagat acaccttcac tgaatacacc atacactggg 6060
ttagacaggc ccctggccaa aggctggagt ggataggagg tattaatcct aacaatggta 6120
ttcctaacta caaccagaag ttcaagggcc gggccacctt gaccgtaggc aagtctgcca 6180
gcaccgccta catggaactg tccagcctgc gctccgagga cactgcagtc tactactgcg 6240
ccagaagaag aatcgccat gggtacgacg agggccatgc tatggactac tggggtcaag 6300
gaacccttgt caccgtctcc tcaggtgagt ggatcctctg cgcttgggcc cagctctgtc 6360
ccacaccgcg gtcacatggc accacctctc ttgcagcctc caccaagggc ccatcggtct 6420
tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcgggccctg ggctgcctgg 6480
tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgctgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg 6540
gcgtgcacac cttcccggtt gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg 6600
tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc 6660
ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaate ttgtgacaaa actcacacat 6720
gcccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc ttcccccaa 6780
aaccacaagg caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg gtgggtggacg 6840
tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcggtg gaggtgcata 6900
atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgggtg gtcagcgtcc 6960
tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca 7020
aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac 7080
cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag gtcagcctga 7140
cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc 7200
agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc 7260
tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct 7320
ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg 7380
gtaaattgagt gcgacggccg gcaagccccg ctccccgggc tctcgcggtc gcacgaggat 7440
gcttggcacg tacccctgt acatacttcc cgggcgccc gcatggaaat aaagcaccgg 7500
atctaataaa agatatttat ttctattaga tatgtgtgtt ggttttttgt gtgcagtgcc 7560
tctatctgga ggccaggtag ggctggcctt gggggagggg gaggccagaa tgactccaag 7620
agctacagga aggcagggtc gagacccac tggacaaaca gtggctggac tctgcaccat 7680
aacacacaat caacagggga gtgagctgga aatttgctag cgaattaatt c 7731

```

<210> 43

<211> 472

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
1 5 10 15

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Arg Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Glu Tyr Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
50 55 60

71.217/BE



Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr
	370					375					380				
Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser
385					390					395					400
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr
				405					410					415	
Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr
			420					425					430		
Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe
		435					440					445			
Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys
	450					455					460				
Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys								
465					470										

<210> 44
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 44
 accgtctcct caggtgagtg gatcc 25

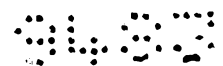
<210> 45
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 45
 cctctcttgc agcc 14

<210> 46
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 46
 cctctcttgc agcc 14

<210> 47
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens



<400> 47
Thr Val Ser Ser
1

<210> 48
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48
Ser Thr Lys Gly
1

<210> 49
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 49
accgtctcct cagcctccac caagggc

27

<210> 50
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50
Thr Val Ser Ser Ser Thr Lys Gly
1 5

<210> 51
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 51
accgtctcct cagcctccac caagggc

27

<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
1 5

<210> 53
<211> 22
<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 53

gaaataaaaac gtgagtggat cc

22

<210> 54

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 54

cttcttttcct caggaactgt ggctgca

27

<210> 55

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Thr Val Ala Ala

1

<210> 56

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 56

gaaataaaaac gaactgtggc tgca

24

<210> 57

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Glu Ile Lys Thr Val Ala Ala

1

5

<210> 58

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 58

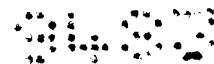
gaaataaaaac gaactgtggc tgca

24

<210> 59

<211> 8

<212> PRT



<213> Homo sapiens

<400> 59

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
1 5

<210> 60

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly
20

<210> 61

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Met Gly Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val Leu Ser

<210> 62

<211> 9

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 62

gccgccacc

9

<210> 63

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PRIMER

<400> 63

cagaaagctt gccgccacca tggattcaca ggcccag

37

<210> 64

<211> 6



<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64
Met Asp Ser Gln Ala Gln
1 5

<210> 65
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 65
ccgaggatcc actcacgttt cagctccagc ttggt 35

<210> 66
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 66
cagaaagctt gccgccacca tgggatggag ctgggtc 37

<210> 67
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67
Met Gly Trp Ser Trp Val
1 5

<210> 68
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 68
ccgaggatcc actcacctga ggagacgggtg actga 35

<210> 69
<211> 36



<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 69
gtcatcacao tgtctccgga ggaacctgga acccag 36

<210> 70
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 70
ctccggagac attgtgatga cccaatctc 29

<210> 71
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 71
gaatataaaa ggctctgact ggacttgcag ttgatggtgg ccctc 45

<210> 72
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 72
cagtcagagc cttttatatt ctagaatca aaagaactac ttggcctggt atcagcagaa 60
accaggacag cc 72

<210> 73
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer



<400> 73
 accccagatt ccctagtgt agcccaaaag atgaggagtt tggg 44

<210> 74
 <211> 67
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 74
 tagcactagg gaatctgggg tacctgatag gttcagtggc agtggggttg ggacagactt 60
 caccctc 67

<210> 75
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 75
 gtccttgtc cgaacgtgag cggatagcta aaatattgct gacagtaata aac 53

<210> 76
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 76
 gctcacgttc ggacaaggga ccaaggtgga aat 33

<210> 77
 <211> 72
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 77
 cagtcagagc cttttatatt ctagaatca aaagaactac ttggcctggt tccagcagaa 60
 accaggacag cc 72

<210> 78
 <211> 57



<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

 <400> 78
 gtcccttgct cgaacgtgag cggatagcta aaatattgct gacagtcata aactgcc 57

 <210> 79
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

 <400> 79
 cccaaactcc tcattctattg ggctagcact aggg 34

 <210> 80
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

 <400> 80
 ccctagtgtc agcccaatag atgaggagtt tggg 34

 <210> 81
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

 <400> 81
 tacgcaaacc gcctctc 17

 <210> 82
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

 <400> 82
 gagtgcacca tatgcggt 18
 71.217/BE



<210> 83
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 83

aacagctatg accatg

16

<210> 84
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 84

gttttcccag tcacgac

17

<210> 85
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 85

gtgtattcag tgaagggtgta tctactagtt ttacagctga ctttcac

47

<210> 86
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 86

tagtagatac accttcactg aatacaccat aactggggtt agacaggccc ctg

53

<210> 87
 <211> 71
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer



<400> 87
 cccttgaact tctggttgta gtttaggaata ccattggttag gattaatacc tcctatccac 60
 tccagccttt g 71

<210> 88
 <211> 71
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 88
 taactacaac cagaagttca agggccgggc caccttgacc gtaggcaagt ctgccagcac 60
 cgcctacatg g 71

<210> 89
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 89
 gcatggcct cgtcgtaacc ataggcgatt cttcttctgg cgagtagta gactgcagtg 60
 tcc 63

<210> 90
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

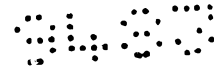
<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 90
 ctatggttac gacgagggcc atgctatgga ctactggggt caaggaac 48

<210> 91
 <211> 71
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 91
 taactacaac cagaagttca agggccgggt caccatcacc gtagacacct ctgccagcac 60
 cgcctacatg g 71



<210> 92
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 92
 ggacactgca gtctacttct gcgccag 27

<210> 93
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 93
 tacgcaaacc gcctctc 17

<210> 94
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 94
 gagtgcacca tatgcggt 18

<210> 95
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 95
 cctttggcca ggggcctgtc taaccacgtg tatggtgtat tcagtgaagg tgtatccact 60
 agtttccact agttt 75

<210> 96
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>



<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 96

gtcaccgtcc ttgacacgcg tctcggga

28

<210> 97

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 97

ttggaggagg gtgccag

17

<210> 98

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 98

gagacattgt gacccaatct cc

22

<210> 99

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 99

gacagtcata aactgccaca tcttc

25

<210> 100

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

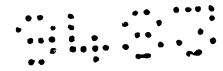
<400> 100

ttgacacgcg tctcgggaag ct

23

<210> 101

<211> 22



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

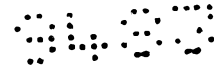
<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 101

ggcgcagagg atccactcac ct

22



SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Antitest-fehérje, amely az F19-jelű monoklonális antitest (ATCC nyilvántartási száma: HB 8269) komplementaritást meghatározó régióival rendelkezik, amely antitest-fehérje specifikusan képes kötődni fibroblaszt aktiváló fehérjéhez, amely antitest vázrégió-módosításokkal rendelkezik, amely javított termelhetőséget eredményez gazdasejtekben, olyan kiméra antitesthez viszonyítva, amely F19 variábilis régiókkal és idegen konstans régiókkal rendelkezik.

2. Antitest-fehérje, amely 1. igénypont szerinti könnyű láncból származó variábilis régióval és nehéz láncból származó variábilis régióval rendelkezik, mindkettő humán konstans régióhoz kapcsolva.

3. A 2. igénypont szerinti antitest-fehérje, amely könnyű láncban lévő humán konstans régióként humán kappa konstans régiót tartalmaz.

4. A 2. igénypont szerinti antitest-fehérje, amely nehéz láncban lévő humán konstans régióként humán gamma-1 konstans régiót tartalmaz.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti antitest-fehérje, amely azzal jellemezhető, hogy expressziójának mértéke nyers tápközegből vett mintákban, ELISA-val meghatározva és/vagy tisztított antitest hozama meghaladja vázrégió-módosítások nélküli kiméra antitest expressziójának mértékét és/vagy tisztítási hozamát, legalább 10-szeres faktorral.

6. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti antitest-fehérje,



amely azzal jellemezhető, hogy expressziójának mértéke nyers tápközegből vett mintákban, ELISA-val meghatározva és/vagy tisztított antitest hozama meghaladja vázrégió-módosítások nélküli kiméra antitest expressziójának mértékét és/vagy tisztítási hozamát, legalább 20-szeres faktorral.

7. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti antitest-fehérje, amely azzal jellemezhető, hogy expressziójának mértéke nyers tápközegből vett mintákban, ELISA-val meghatározva és/vagy tisztított antitest hozama meghaladja vázrégió-módosítások nélküli kiméra antitest expressziójának mértékét és/vagy tisztítási hozamát, legalább 100-szoros faktorral.

8. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti antitest-fehérje, amely javított termelhetőséget mutat eukarióta sejtekben.

9. A 8. igénypont szerinti antitest-fehérje, amely eukarióta sejt-ként kínai hörcsög petefészkéből származó sejtekben (CHO-sejtek) mutat javított termelhetőséget.

10. Az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti antitest-fehérje, amely a könnyű lánc régió 87. Kabat-helyzetében nem aszparagint tartalmaz.

11. A 10. igénypont szerinti antitest-fehérje, amely a könnyű lánc régió 87. Kabat-helyzetében aromás vagy alifás aminosavakat tartalmaz.

12. A 11. igénypont szerinti antitest-fehérje, amely a könnyű lánc régió 87. Kabat-helyzetében tirozint vagy fenilalanint tartalmaz.

13. Az 1-12. igénypontok bármelyike szerinti antitest-fehérje, amely a könnyű lánc régió 36. Kabat-helyzetében aromás



aminosavakat tartalmaz.

14. Az 1-13. igénypontok bármelyike szerinti antitest-fehérje, amely a könnyű lánc variábilis régiójában a 2. számú szekvenciát tartalmazza.

15. A 14. igénypont szerinti antitest-fehérje, amelyben a könnyű lánc variábilis régióját az 1. számú nukleotid-szekvencia kódolja.

16. Az 1-13. igénypontok bármelyike szerinti antitest-fehérje, amely a könnyű lánc variábilis régiójában a 6. számú szekvenciát tartalmazza.

17. A 16. igénypont szerinti antitest-fehérje, amelyben a könnyű lánc variábilis régióját az 5. számú nukleotid-szekvencia kódolja.

18. Az 1-17. igénypontok bármelyike szerinti antitest-fehérje, amely a nehéz lánc variábilis régiójában a 8., 10., 12. vagy 14. számú szekvencia bármelyikét tartalmazza.

19. A 18. igénypont szerinti antitest-fehérje, amelyben a nehéz lánc variábilis régióját a 7., 9., 11. vagy 13. számú nukleotid-szekvencia bármelyike kódolja.

20. Az 1-14. igénypontok bármelyike szerinti antitest-fehérje, amely a könnyű lánc variábilis régiójában 2. számú szekvenciát tartalmaz, és a nehéz lánc variábilis régiójában 12. számú szekvenciát tartalmaz.

21. A 20. igénypont szerinti antitest-fehérje, amelyben a könnyű lánc variábilis régióját az 1. számú nukleotid-szekvencia kódolja, és a nehéz lánc variábilis régióját a 11. számú nukleotid-szekvencia kódolja.



22. A 20. vagy 21. igénypontok szerinti antitest-fehérje, amely a könnyű lánc konstans régiójában 20. számú szekvenciát tartalmaz, és a nehéz lánc konstans régiójában 22. számú szekvenciát tartalmaz.

23. Az 1., 13., 18. vagy 19. igénypontok szerinti antitest-fehérje, amely a könnyű lánc variábilis régiójában 2. számú szekvenciát tartalmaz, és a nehéz lánc variábilis régiójában 8. számú szekvenciát tartalmaz.

24. A 23. igénypont szerinti antitest-fehérje, amelyben a könnyű lánc variábilis régióját az 1. számú nukleotid-szekvencia kódolja, és a nehéz lánc variábilis régióját a 7. számú nukleotid-szekvencia kódolja.

25. Nukleotid-szekvencia, amely 1-24. igénypontok bármelyike szerinti antitest-fehérjét kódol.

26. Rekombináns DNS-vektor, amely 25. igénypont szerinti nukleotidszekvenciát tartalmaz.

27. A 26. igénypont szerinti rekombináns DNS-vektor, amely expressziós vektor.

28. Gazdasejt, amely 26. vagy 27. igénypont szerinti vektort tartalmaz.

29. A 28. igénypont szerinti gazdasejt, amely eukarióta sejt.

30. A 29. igénypont szerinti gazdasejt, amely eukarióta sejt-ként emlős sejtet tartalmaz.

31. A 30. igénypont szerinti gazdasejt, amely CHO- vagy COS-sejt.

32. Eljárás 1-24. igénypontok bármelyike szerinti antitest-fehérje előállítására, azzal jellemezve, hogy



(a) 28-31. igénypontok bármelyike szerinti gazdasejtet olyan körülmények között tenyésztünk, amelyben a gazdasejt az antitest-fehérjét expresszálja, és

(b) izoláljuk az antitest-fehérjét.

33. A 32. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy gazdasejtként emlős sejtet, előnyösen CHO- vagy COS-sejtet alkalmazunk.

34. A 32. vagy 33. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a gazdasejtet két plazmiddal kotranszfectáljuk, amelyek könnyű és nehéz láncnak megfelelő expressziós egységeket tartalmaznak, külön-külön.

35. Az 1-24. igénypontok bármelyike szerinti antitest-fehérje, amely terápiás ágenshez van konjugálva.

36. A 35. igénypont szerinti antitest-fehérje, amely terápiás ágensként radioaktív izotópokhoz, toxinokhoz, toxoidokhoz, gyulladást okozó ágensekhez vagy kemoterápiás ágensekhez van konjugálva.

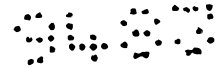
37. A 36. igénypont szerinti antitest-fehérje, amely radioaktív izotópként β -emittáló radioaktív izotóphoz van konjugálva.

38. A 37. igénypont szerinti antitest-fehérje, amely radioaktív izotópként 186 réniumhoz, 188 réniumhoz, 131 jódhoz vagy 90 ittriumhoz van konjugálva.

39. Az 1-24. igénypontok bármelyike szerinti antitest-fehérje, amely jelölve van.

40. A 39. igénypont szerinti antitest-fehérje, amely detektálható markerrel van megjelölve.

41. A 40. igénypont szerinti antitest-fehérje, amely detek-



tálható markerként enzimekkel, festékekkel, radioaktív izotópokkal, digoxigeninnel vagy biotinnal van megjelölve.

42. Az 1-24. igénypontok bármelyike szerinti antitest-fehérje, amely leképezhető ágenshez van konjugálva.

43. A 42. igénypont szerinti antitest-fehérje, amely leképezhető ágensként radioaktív izotóphoz van konjugálva.

44. A 43. igénypont szerinti antitest-fehérje, amely radioaktív izotópként γ -emittáló radioaktív izotóphoz van konjugálva.

45. A 44. igénypont szerinti antitest-fehérje, amely radioaktív izotópként 125 Jódhoz van konjugálva.

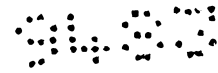
46. Gyógyszerkészítmény, amely 1-24. igénypontok bármelyike szerinti antitest-fehérjét és gyógyászatilag elfogadható hordozót tartalmaz.

47. Gyógyszerkészítmény, amely 35-38. igénypontok bármelyike szerinti antitest-fehérjét és gyógyászatilag elfogadható hordozót tartalmaz.

48. Gyógyszerkészítmény, amely 42-45. igénypontok bármelyike szerinti antitest-fehérjét és gyógyászatilag elfogadható hordozót tartalmaz.

49. A 46-48. igénypontok bármelyike szerinti gyógyszerkészítmény tumorok kezelésére vagy leképezésére szolgáló alkalmazásra, amely tumorok aktivált, stroma-fibroblasztokkal társultak, amely tumorok előnyösen az alábbi rákbetegség-csoportból származnak: vastag- és vékonybélrákok, nem aprósejtes tüdőrákok, mellrákok, fej- és nyakrák, petefészekrákok, tüdőrákok, hólyagrákok, hasnyálmirigy-rákok és az agy metasztázisos rákjai.

50. Az 1-24. igénypontok bármelyike szerinti antitest-fehérje



alkalmazása rák kezelésére.

51. A 35-38. igénypontok bármelyike szerinti antitest-fehérje alkalmazása rák kezelésére.

52. A 42-45. igénypontok bármelyike szerinti antitest-fehérje alkalmazása aktivált, stroma-fibroblasztok leképezésére.

53. A 39-41. igénypontok bármelyike szerinti antitest-fehérje alkalmazása aktivált, stroma-fibroblasztok jelenlétének detektálására egy mintában.

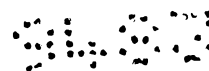
54. Eljárás aktivált, stroma-fibroblasztokkal társult tumorok kezelésére, amely fibroblasztok specifikusan képesek komplexet kialakítani 1-24. vagy 35-38. igénypontok bármelyike szerinti antitest-fehérjékkel, azzal jellemezve, hogy a tumort érintkeztetjük a tumor kezelésére hatékony mennyiségű antitest-fehérjével.

55. Az 54. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az alábbi rákbetegség-csoportból származó ráksejtekkel rendelkező tumorokat kezelünk: vastag- és vékonybélrákok, nem aprósejtes tüdőrákok, mellrákok, fej- és nyakrák, petefészekrákok, tüdőrákok, hólyagrákok, hasnyálmirigy-rákok és az agy metasztázisos rákjai.

56. Az 54. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy in vitro érintkeztetünk.

57. Az 54. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy in vivo érintkeztetünk.

58. Eljárás aktivált, stroma-fibroblasztok jelenlétének detektálására sebgyógyulásban, gyulladásban vagy tumorban, azzal jellemezve, hogy



(a) a feltételezhetően aktivált, stroma-fibroblasztokat tartalmazó mintát érintkeztetjük 1-24. vagy 39-41. igénypontok bármelyike szerinti antitest-fehérjével olyan körülmények között, amely alkalmas az antitest és antigén közötti komplex kialakulására,

(b) detektáljuk a komplex jelenlétét, ezáltal detektáljuk az aktivált, stroma-fibroblasztok jelenlétét sebgyógyulásban, gyulladásban vagy tumorban.

59. Az 58. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az alábbi rákbetegség-csoportból származó ráksejtekkel rendelkező tumorokban detektálunk: vastag- és vékonybélrákok, nem aprósejtes tüdőrákok, mellrákok, fej- és nyakrák, petefészekrákok, tüdőrákok, hólyagrákok, hasnyálmirigy-rákok és az agy metasztatizáló rákjai.

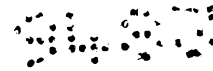
60. Az 58. vagy 59. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy antitest-fehérjeként 39-41. igénypontok bármelyike szerinti fehérjét alkalmazunk.

61. Eljárás aktivált, stroma-fibroblasztok jelenlétének leképezésére sebgyógyulásban, gyulladt bőrben vagy tumorban, egy humán páciensben, azzal jellemezve, hogy

(a) leképező ágenshez konjugált, 1-24. igénypontok bármelyike szerinti antitest-fehérjét beadunk humán páciensnek olyan körülmények között, amely alkalmas az antitest és antigén közötti komplex kialakulására,

(b) leképezzük az így kialakult bármilyen komplexet.

62. A 61. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az alábbi rákbetegség-csoportból származó ráksejtekkel rendelke-



ző tumorokat képezünk le: vastag- és vékonybélrákok, nem apró-sejtes tüdőrákok, mellrákok, fej- és nyakrák, petefészekrákok, tüdőrákok, hólyagrákok, hasnyálmirigy-rákok és az agy metasztatizisos rákjai.

63. Eljárás tumor-stroma detektálására, azzal jellemezve, hogy

(a) egy alkalmas mintát érintkeztetünk 1-24. igénypontok bármelyike szerinti antitest-fehérjével olyan körülmények között, amely alkalmas az antitest és antigén közötti komplex kialakulására,

(b) detektáljuk a így kialakult bármilyen komplex jelenlétét,

(c) a komplex jelenlétét tumor-stroma jelenlétére vonatkoztatjuk.

64. A 62. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy detektálható markerrel jelölt antitestet alkalmazunk.

65. Eljárás tumor-stroma leképezésére egy humán páciensben, azzal jellemezve, hogy

(a) 42-45. igénypontok bármelyike szerinti antitest-fehérjét beadunk a páciensnek olyan körülmények között, amely alkalmas az antitest és antigén közötti komplex kialakulására,

(b) leképezzük az így kialakult bármilyen komplexet, és ezáltal leképezzük a tumor-stroma jelenlétét humán páciensben.

66. Antitest-fehérje, amely 2. számú aminosav-szekvenciát tartalmaz.

67. A 66. igénypont szerinti antitest-fehérje, amely továbbá 12. számú aminosav-szekvenciát tartalmaz.

68. A 66. vagy 67. igénypont szerinti antitest-fehérje, amely



továbbá 20. számú aminosav-szekvenciát és 22. számú aminosav-szekvenciát tartalmaz.

69. DNS-molekula, amely 66-68. igénypontok bármelyike szerinti antitest-fehérjét kódol.

70. Gazdasejt, amely 69. igénypont szerinti DNS-molekulát tartalmaz.

71. Eljárás 66-68. igénypontok bármelyike szerinti antitest-fehérje előállítására, azzal jellemezve, hogy

(a) 70. igénypont szerinti gazdasejtet olyan körülmények között tenyésztünk, amelyben a gazdasejt az antitest-fehérjét expresszálja, és

(b) izoláljuk a fehérjét.

72. A 37. igénypont szerinti antitest-fehérje, amely radioaktív izotópként ^{131}I -hoz, ^{125}I -hoz, ^{186}Re -hoz, ^{188}Re -hoz vagy ^{90}Y -hoz van konjugálva.

73. Gyógyszerkészítmény, amely 66-68. igénypontok bármelyike vagy 72. igénypont szerinti antitest-fehérjét és gyógyászatilag elfogadható hordozót tartalmaz.

14 oldal leírás
43 oldal rajz

184 oldal

TH

A meghatalmazott:

Dr. János László
vezető főorvos
az SZK Ált. Néprőlátó
Szolgálatának ügy-
vezetője
11-062 Budapest, Árkád utca 12.
Telefon: 376-1111, Fax: 376-522

PO 101501

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY⁴³

71217/BE

712

1. ábra

1	11	21	31	41
GACATTGTGA	TGACCCAATC	TCCAGACTCT	TTGGCTGTGT	CTCTAGGGGA
51	61	71	81	91
GAGGGCCACC	ATCAACTGCA	AGTCCAGTCA	GAGCCTTTTA	TATTCTAGAA
101	111	121	131	141
ATCAAAAGAA	CTACTTGGCC	TGGTATCAGC	AGAAACCAGG	ACAGCCACCC
151	161	171	181	191
AAACTCCTCA	TCTTTTGGGC	TAGCACTAGG	GAATCTGGGG	TACCTGATAG
201	211	221	231	241
GTTTCAGTGGC	AGTGGGTTTG	GGACAGACTT	CACCCTCACC	ATTAGCAGCC
251	261	271	281	291
TGCAGGCTGA	AGATGTGGCA	GTTTATTACT	GTCAGCAATA	TTTTCAGCTAT
301	311	321	331	339
CCGCTCACGT	TCGGACAAGG	GACCAAGGTG	GAAATAAAA	

2. ábra

1	11	21	31	41
DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	INCKSSQSLL	YSRNQKNYLA	WYQQKPGQPP
51	61	71	81	91
KLLIFWASTR	ESGVPDRFSG	SGFGTDFTLT	ISSLQAEDVA	VYYCQQYFSY
101	111			
PLTFGQGTKV	EIK			

3. ábra

1	11	21	31	41
GACATTGTGA	TGACCCAATC	TCCAGACTCT	TTGGCTGTGT	CTCTAGGGGA
51	61	71	81	91
GAGGGCCACC	ATCAACTGCA	AGTCCAGTCA	GAGCCTTTTA	TATTCTAGAA
101	111	121	131	141
ATCAAAAGAA	CTACTTGGCC	TGGT <u>T</u> CAGC	AGAAACCAGG	ACAGCCACCC
151	161	171	181	191
AAACTCCTCA	TCTTTTGGGC	TAGCACTAGG	GAATCTGGGG	TACCTGATAG
201	211	221	231	241
GTTTCAGTGGC	AGTGGGTTTG	GGACAGACTT	CACCCTCACC	ATTAGCAGCC
251	261	271	281	291
TGCAGGCTGA	AGATGTGGCA	GTTTAT <u>G</u> ACT	GTCA <u>A</u> CAATA	TTTTCAGCTAT
301	311	321	331	339
CCGCTCACGT	TCGGACAAGG	GACCAAGGTG	GAAATAAAA	

712

4. ábra

1	11	21	31	41
DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	INCKSSQSLL	YSRNQKNYLA	WFQQKPGQPP
51	61	71	81	91
KLLIFWASTR	ESGVPDRFSG	SGFGTDFTLT	ISSLQAEDVA	VYDCQQYFSY
101	111			
PLTFGQGTKV	EIK			

5. ábra

1	11	21	31	41
GACATTGTGA	TGACCCAATC	TCCAGACTCT	TTGGCTGTGT	CTCTAGGGGA
51	61	71	81	91
GAGGGCCACC	ATCAACTGCA	AGTCCAGTCA	GAGCCTTTTA	TATTCTAGAA
101	111	121	131	141
ATCAAAAGAA	CTACTTGGCC	TGGTATCAGC	AGAAACCAGG	ACAGCCACCC
151	161	171	181	191
AAACTCCTCA	TCTATTGGGC	TAGCACTAGG	GAATCTGGGG	TACCTGATAG
201	211	221	231	241
GTTCAGTGGC	AGTGGGTTTG	GGACAGACTT	CACCCTCACC	ATTAGCAGCC
251	261	271	281	291
TGCAGGCTGA	AGATGTGGCA	GTTTATTACT	GTCAGCAATA	TTTTAGCTAT
301	311	321	331 339	
CCGCTCACGT	TCGGACAAGG	GACCAAGGTG	GAAATAAAA	

6. ábra

1	11	21	31	41
DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	INCKSSQSLL	YSRNQKNYLA	WYQQKPGQPP
51	61	71	81	91
KLLIYWASTR	ESGVPDRFSG	SGFGTDFTLT	ISSLQAEDVA	VYYCQQYFSY
101	111			
PLTFGQGTKV	EIK			

7. ábra

1
 CAGGTGCAAC TAGTGCAGTC CGGCGCCGAA GTGAAGAAAC CCGGTGCTTC
 51
 CGTGAAAGTC AGCTGTAAAA CTAGTAGATA CACCTTCACT GAATACACCA
 101
 TACACTGGGT TAGACAGGCC CCTGGCCAAA GGCTGGAGTG GATAGGAGGT
 151
 ATTAATCCTA ACAATGGTAT TCCTAACTAC AACCAGAAGT TCAAGGGCCG
 201
 GGCCACCTTG ACCGTAGGCA AGTCTGCCAG CACCGCCTAC ATGGAAGTGT
 251
 CCAGCCTGCG CTCCGAGGAC ACTGCAGTCT ACTACTGCGC CAGAAGAAGA
 301
 ATCGCCTATG GTTACGACGA GGGCCATGCT ATGGACTACT GGGGTCAAGG
 351 372
 AACCTTGTC ACCGTCTCCT CA

8. ábra

1	11	21	31	41
QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKTSRYTFT	EYTIHWVRQA	PGQRLEWIGG
51	61	71	81	91
INPNNGIPNY	NQKFKGRATL	TVGKSASTAY	MELSSLRSED	TAVYYCARRR
101	111	121-124		
IAYGYDEGHA	MDYWGQGLV	TVSS		

9. ábra

1
 CAGGTGCAAC TAGTGCAGTC CGGCGCCGAA GTGAAGAAAC CCGGTGCTTC
 51
 CGTGAAAGTC AGCTGTAAAA CTAGTAGATA CACCTTCACT GAATACACCA
 101
 TACACTGGGT TAGACAGGCC CCTGGCCAAA GGCTGGAGTG GATAGGAGGT
 151
 ATTAATCCTA ACAATGGTAT TCCTAACTAC AACCAGAAGT TCAAGGGCCG
 201
 GGCCACCTTG ACCGTAGGCA AGTCTGCCAG CACCGCCTAC ATGGAAGTGT
 251
 CCAGCCTGCG CTCCGAGGAC ACTGCAGTCT ACTTCTGCGC CAGAAGAAGA
 301
 ATCGCCTATG GTTACGACGA GGGCCATGCT ATGGACTACT GGGGTCAAGG
 351 372
 AACCTTGTC ACCGTCTCCT CA

10. ábra

1	11	21	31	41
QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKTSRYTFT	EYTIHWVRQA	PGQRLEWIGG
51	61	71	81	91
INPNNGIPNY	NQKFKGRATL	TVGKSASTAY	MELSSLRSED	TAVYFCARRR
101	111	121-124		
IAYGYDEGHA	MDYWGQGTLV	TVSS		

11. ábra

1
CAGGTGCAAC TAGTGCAAGTC CGGCGCCGAA GTGAAGAAAC CCGGTGCTTC
51
CGTGAAAGTC AGCTGTAAAA CTAGTAGATA CACCTTCACT GAATACACCA
101
TACACTGGGT TAGACAGGCC CCTGGCCAAA GGCTGGAGTG GATAGGAGGT
151
ATTAATCCTA ACAATGGTAT TCCTAACTAC AACCAGAAGT TCAAGGGCCG
201
GGTCACCATC ACCGTAGACA CCTCTGCCAG CACCGCCTAC ATGGAACTGT
251
CCAGCCTGCG CTCCGAGGAC ACTGCAGTCT ACTACTGCGC CAGAAGAAGA
301
ATCGCCTATG GTTACGACGA GGGCCATGCT ATGGACTACT GGGGTCAAGG
351 372
AACCCTTGTC ACCGTCTCCT CA

12. ábra

1	11	21	31	41
QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKTSRYTFT	EYTIHWVRQA	PGQRLEWIGG
51	61	71	81	91
INPNNGIPNY	NQKFKGR <u>VTI</u>	TVD <u>TS</u> ASTAY	MELSSLRSED	TAVYYCARRR
101	111	121-124		
IAYGYDEGHA	MDYWGQGTLV	TVSS		

72

13. ábra

1
 CAGGTGCAAC TAGTGCAGTC CGGCGCCGAA GTGAAGAAAC CCGGTGCTTC
 51
 CGTGAAAGTC AGCTGTAAAA CTAGTAGATA CACCTTCACT GAATACACCA
 101
 TAACTGGGT TAGACAGGCC CCTGGCCAAA GGCTGGAGTG GATAGGAGGT
 151
 ATTAATCCTA ACAATGGTAT TCCTAACTAC AACCAGAAAGT TCAAGGGCCG
 201
 GGTCACCATC ACCGTAGACA CCTCTGCCAG CACCGCCTAC ATGGAAGTGT
 251
 CCAGCCTGCG CTCCGAGGAC ACTGCAGTCT ACTTCTGCGC CAGAAGAAGA
 301
 ATCGCCTATG GTTACGACGA GGGCCATGCT ATGGACTACT GGGGTCAAGG
 351 372
 AACCCCTGTC ACCGTCTCCT CA

14. ábra

1	11	21	31	41
QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKTSRYTFT	EYTIHWVRQA	PGQRLEWIGG
51	61	71	81	91
INPNNGIPNY	NQKFKGRV <u>T</u>	TV <u>D</u> TSASTAY	MELSSLRSED	TAVY <u>F</u> CARRR
101	111	121-124		
IAYGYDEGHA	MDYWGQGTLV	TVSS		

15. ábra

1
 CAGGTGCAAC TAGTGCAGTC CGGCGCCGAA GTGAAGAAAC CCGGTGCTTC
 51
 CGTGAAAGTC AGCTGTAAAA CTAGTGGATA CACCTTCACT GAATACACCA
 101
 TAACTGGGT TAGACAGGCC CCTGGCCAAA GGCTGGAGTG GATAGGAGGT
 151
 ATTAATCCTA ACAATGGTAT TCCTAACTAC AACCAGAAAGT TCAAGGGCCG
 201
 GGTCACCATC ACCGTAGACA CCTCTGCCAG CACCGCCTAC ATGGAAGTGT
 251
 CCAGCCTGCG CTCCGAGGAC ACTGCAGTCT ACTACTGCGC CAGAAGAAGA
 301
 ATCGCCTATG GTTACGACGA GGGCCATGCT ATGGACTACT GGGGTCAAGG
 351 372
 AACCCCTGTC ACCGTCTCCT CA

16. ábra

1	11	21	31	41
QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKTSGYTFT	EYTIHWVRQA	PGQRLEWIGG
51	61	71	81	91
INPNNGIPNY	NQKFKGRVTI	TVDTASASTAY	MELSSLRSED	TAVYYCARRR
101	111	121-124		
IAYGYDEGHA	MDYWGQGTLV	TVSS		

17. ábra

1
 DIVMSQSPSS LAVSVGEKVT MSCKSSQSLL YSRNQKNYLA WFQQKPGQSP
 51
 KLLIFWASTR ESGVPDRFTG SGFGTDFNLT ISSVQAEDLA VYDCQQYFSY
 101
 PLTFGAGTKL ELKRTVAAPS VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNNFYPREA
 151
 KVQWKVDNAL QSGNSQESVT EQDSKDSTYS LSSTLTLSKA DYEKHKVYAC
 201
 EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

18. ábra

1
 VQLQQSGPEL VKPGASVKMS CKTSRYTFTE YTIHWVRQSH GKSLEWIGGI
 51
 NPNNGIPNYN QKFKGRATLT VGKSSSTAYM ELRSLTSEDS AVYFCARRRI
 101
 AYGDEGHAM DYWGQGTSVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
 151
 LVKDYPPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
 201
 TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
 251
 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
 301
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
 351
 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
 401
 PPVLDSGGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS
 451
 PGK

19. ábra

340	350	360	370	380
CGTACTGTGG	CTGCACCATC	TGTCTTCATC	TTCCCGCCAT	CTGATGAGCA
390	400	410	420	430
GTTGAAATCT	GGAAGTGCCT	CTGTTGTGTG	CCTGCTGAAT	AACTTCTATC
440	450	460	470	480
CCAGAGAGGC	CAAAGTACAG	TGGAAGGTGG	ATAACGCCCT	CCAATCGGGT
490	500	510	520	530
AACTCCCAGG	AGAGTGTCAC	AGAGCAGGAC	AGCAAGGACA	GCACCTACAG
540	550	560	570	580
CCTCAGCAGC	ACCCTGACGC	TGAGCAAAGC	AGACTACGAG	AAACACAAAG
590	600	610	620	630
TCTACGCCTG	CGAAGTCACC	CATCAGGGCC	TGAGCTCGCC	CGTCACAAAG
640	650	660		
AGCTTCAACA	GGGGAGAGTGT			

20. ábra

114	124	134	144	154
RTVAAPSVFI	FPPSDEQLKS	GTASVVCLLN	NFYPREAKVQ	WKVDNALQSG
164	174	184	194	204
NSQESVTEQD	SKDSTYSLSS	TLTLKADYE	KHKVYACEVT	HQGLSSPVTK
214-220				
SFNRGEC				

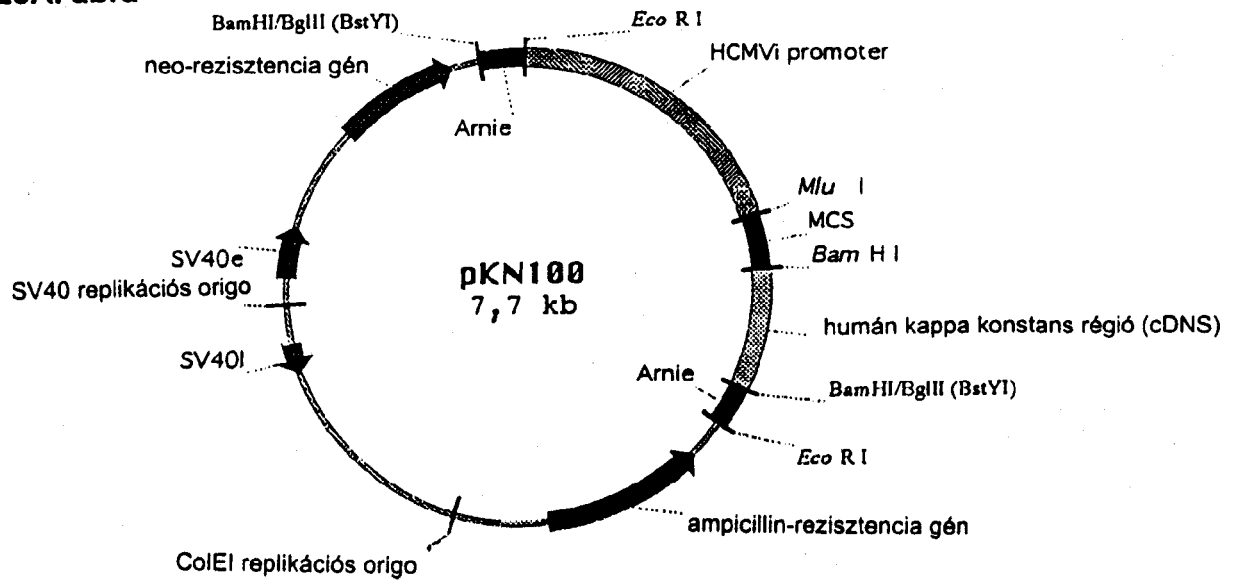
21. ábra

373
GCCTCCACCA AGGGCCCATC GGTCTTCCCC CTGGCACCCCT CCTCCAAGAG
423
CACCTCTGGG GGCACAGCGG CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG GACTACTTCC
473
CCGAACCGGT GACGGTGTCG TGGAATCAG GCGCCCTGAC CAGCGGCGTG
523
CACACCTTCC CGGCTGTCCT ACAGTCCTCA GGACTCTACT CCCTCAGCAG
573
CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG CACCCAGACC TACATCTGCA
623
ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG TGGACAAGAA AGTTGAGCCC
673
AAATCTTGTG ACAA AACTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CACCTGAACT
723
CCTGGGGGGA CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC
773
TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC
823
CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT
873
GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC
923
GGGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG
973
GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA
1023
AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC
1073
TGCCCCCATC CCGGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC
1123
CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA
1173
TGGGCAGCCG GAGAACA ACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG
1223
ACGGCTCCTT CTTCTCTAC AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG
1273
CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA
1323 1362
CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCCGGGTAAA

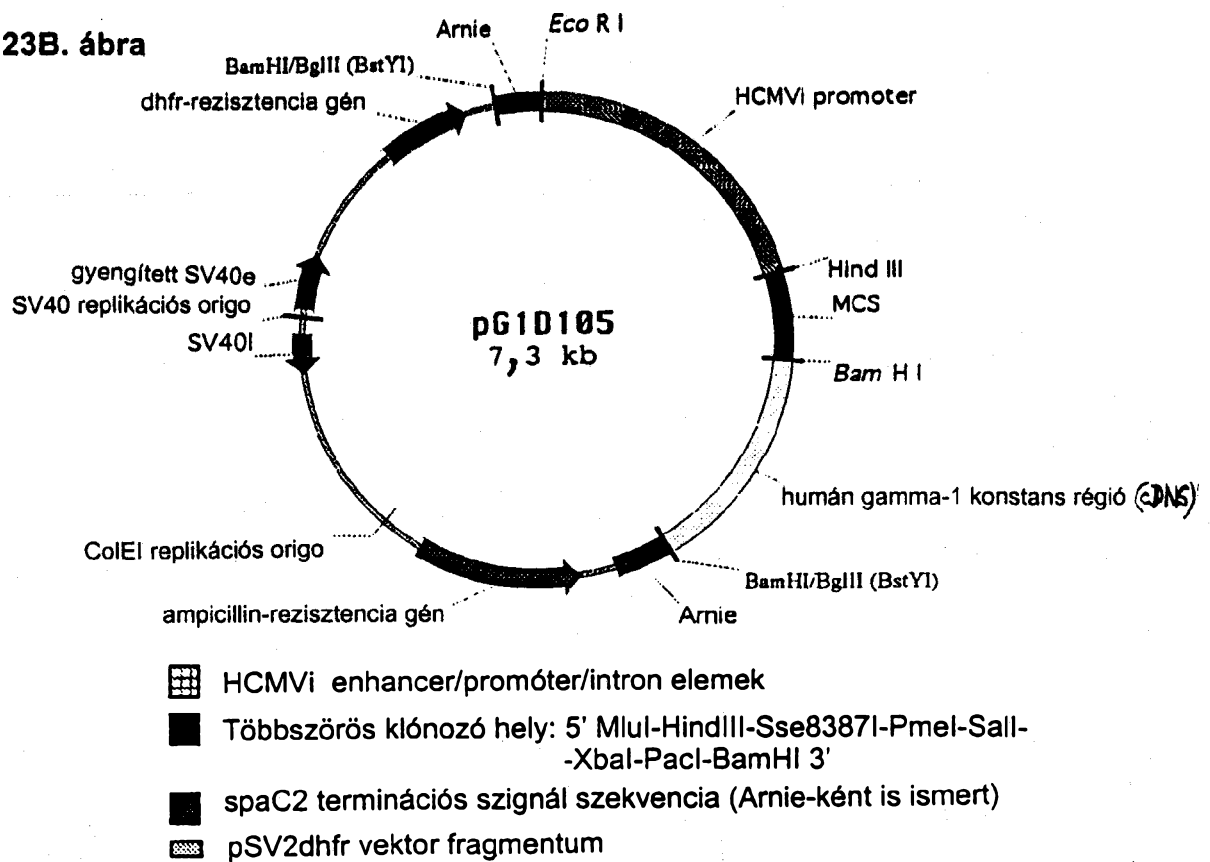
22. ábra

125
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
175
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKKVEP
225
KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
275
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
325
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC
375
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
425 454
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

23A. ábra



23B. ábra



24. ábra

HindIII
aagcttGCCGCCACCatggattcacaggcccagggttcttatgttactgccgctatgggta
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ttcgaaCGGCGGTGGTacctaaagtgtccgggtccaagaatacaatgacggcgatacccat
Kozak szekvencia
M D S Q A Q V L M L L P L W V
tctgggtacctgtggggacattgtgatgtcacagtctccatcctccctagctgtgtcagtt
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
agaccatggacacccctgtaacactacagtgtcagaggtaggagggatcgacacagtcaa
S G T C G D I V M S Q S P S S L A V S V
ggagagaagggttactatgagctgcaagtcagtcagagccttttatatagtcgtaaatcaa
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
cctctcttccaatgatactcgacgttcaggtcagtcctcggaataatatcagcattagtt
G E K V T M S C K S S Q S L L Y S R N Q
CDR 1
aagaactacttggcctgggtccagcagaagccagggcagtcctcctaaactgctgattttc
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ttcttgatgaaccggaccaaggtcgtcttcgggtcccgtcagaggatttgacgactaaaag
K N Y L A W F Q Q K P G Q S P K L L I F
tgggcatccactagggaatctgggggtccctgatcgcttcacaggcagtggtatttgggacg
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
acccgtaggtgatcccttagaccccagggactagcgaagtgtccgtcacctaaacctgc
W A S T R E S G V P D R F T G S G F G T
CDR 2
gatttcaatctcaccatcagcagtggtgcaggctgaggacctggcagtttatgactgtcag
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ctaaagttagagtggtagtcgtcacacgtccgactcctggaccgtcaaatactgacagtc
D F N L T I S S V Q A E D L A V Y D C Q
caatatttttagctatccgctcacgttcgggtgctgggaccaagctggagctgaAACGTGAG
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
gttataaaatcgataggcgagtgcaagccacgaccctggttcgacctcgactTTGCACTG
splice donor hely
Q Y F S Y P L T F G A G T K L E L K
CDR 3
BamHI
Tggatcc
421 ----- 427
Acctagg

25. ábra

HindIII
 AAGCTTGCCGCCACCATGGGATGGAGCTGGGTCTTTCTCTTTCTCCTGTCAGGAACTGCA
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTCGAACGGCGGTGGTACCCTACCTCGACCCAGAAAGAGAAAGAGGACAGTCCTTGACGT
Kozak szekvencia
 M G W S W V F L F L L S G T A

GGTGTCTCTCTGAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCT
 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCACAGGAGAGACTCCAGGTCGACGTTGTCAGACCTGGACTCGACCACTTCGGACCCCGA
 G V L S E V Q L Q Q S G P E L V K P G A

TCAGTAAAGATGTCCTGCAAGACTTCTAGATACACATTCACTGAATACACCATACACTGG
 121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AGTCATTTCTACAGGACGTTCTGAAGATCTATGTGTAAGTGACTTATGTGGTATGTGACC
 S V K M S C K T S R Y T F T E Y T I H W
 CDR 1

GTGAGACAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGGTATTAATCCTAACAATGGT
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CACTCTGTCTCGGTACCTTTCTCGGAACTCACCTAACCTCCATAATTAGGATTGTTACCA
 V R Q S H G K S L E W I G G I N P N N G
 CDR 2

ATTCCTAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGCCACATTGACTGTAGGCAAGTCCTCC
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TAAGGATTGATGTTAGTCTTCAAGTTCCCGTCCCGGTGTAAGTACATCCGTTTCAGGAGG
I P N Y N Q K F K G R A T L T V G K S S

AGCACCGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCGGTCTATTTCTGT
 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TCGTGGCGGATGTACCTCGAGGCGTCGGACTGTAGACTCCTAAGACGCCAGATAAAGACA
 S T A Y M E L R S L T S E D S A V Y F C

GCAAGAAGAAGAATCGCCTATGGTTACGACGAGGGCCATGCTATGGACTACTGGGGTCAA
 361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CGTTCTTCTTCTTAGCGGATACCAATGCTGCTCCCGGTACGATACCTGATGACCCCACTT
A R R R I A Y G Y D E G H A M D Y W G Q
 CDR 3

BamHI
 GGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGGTGAGTGGATCC
 421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 468
 CCTTGGAGTCAGTGGCAGAGGAGTCCACTCACCTAGG
splice donor hely
 G T S V T V S S

Fn

26/1. ábra

1 gaattccagc acactggcgg ccggttACTAG TTATTAATAG TAATCAATTA
 51 CGGGGTCATT AGTTCATAGC CCATATATGG AGTTCCGCGT TACATAACTT
 101 ACGGTAAATG GCCCGCCTGG CTGACCGCCC AACGACCCCC GCCCATTGAC
 151 GTCAATAATG ACGTATGTTC CCATAGTAAC GCCAATAGGG ACTTTCCATT
 201 GACGTCAATG GGTGGAGTAT TTACGGTAAA CTGCCCCTT GGCAGTACAT
 251 CAAGTGTATC ATATGCCAAG TACGCCCCCT ATTGACGTCA ATGACGGTAA
 301 ATGGCCCGCC TGGCATTATG CCCAGTACAT GACCTTATGG GACTTTCCTA
 351 CTTGGCAGTA CATCTTACGTA TTAGTCATCG CTATTACCAT GGTGATGCGG
 401 TTTTGGCAGT ACATCAATGG GCGTGGATAG CGGTTTGACT CACGGGGATT
 451 TCCAAGTCTC CACCCCATTTG ACGTCAATGG GAGTTTGTTT TGGCACCAAA
 501 ATCAACGGGA CTTTCCAAAA TGTCGTAACA ACTCCGCCCC ATTGACGCAA
 551 ATGGGCGGTA GGCGTGTACG GTGGGAGGTC TATATAAGCA GAGCTCGTTT
 601 AGTGAACCGT CAGATCGCCT GGAGACGCCA TCCACGCTGT TTTGACCTCC
 651 ATAGAAGACA CCGGGACCGA TCCAGCCTCC GCGGCCGGGA ACGGTGCATT
 701 GGAACGCGGA TTCCCCGTGC CAAGAGTGAC GTAAGTACCG CCTATAGAGT
 751 CTATAGGCCC ACCCCCTTGG CTTCTTATGC ATGCTATACT GTTTTTGGCT
 801 TGGGGTCTAT ACACCCCCGC TTCCTCATGT TATAGGTGAT GGTATAGCTT
 851 AGCCTATAGG TGTGGGTTAT TGACCATTAT TGACCACTCC CCTATTGGTG
 901 ACGATACTTT CCATTACTAA TCCATAACAT GGCTCTTTGC CACAACCTCTC
 951 TTTATTGGCT ATATGCCAAT AACTGTCCT TCAGAGACTG ACACGGACTC
 1001 TGTATTTTTA CAGGATGGGG TCTCATTTAT TATTTACAAA TTCACATATA
 1051 CAACACCACC GTCCCCAGTG CCCGCAGTTT TTATTAAACA TAACGTGGGA
 1101 TCTCCACGCG AATCTCGGGT ACGTGTTCCG GACATGGGCT CTTCTCCGGT
 1151 AGCGGCGGAG CTTCTACATC CGAGCCCTGC TCCCATGCCT CCAGCGACTC
 1201 ATGGTCGCTC GGCAGCTCCT TGCTCCTAAC AGTGGAGGCC AGACTTAGGC
 1251 ACAGCACGAT GCCCACCACC ACCAGTGTGC CGCACAAGGC CGTGGCGGTA

TA

14/43

26/2. ábra

1301 GGGTATGTGT CTGAAAATGA GCTCgggggag cgggcttgca ccgctgacgc
Afl II

1351 atttggaaga cttaaggcag cggcagaaga agatgcaggc agctgagttg

1401 ttgtgttctg ataagagtca gaggtaactc ccgttgcggt gctgttaacg

1451 gtggaggggca gtgtagtctg agcagtactc gttgctgccg cgcgcgccac

1501 cagacataat agctgacaga ctaacagact gttcctttcc atgggtcttt
Mlu I Hind III

1551 tctgcagtca ccgtccttga cacgcgtctc gggaagcttG CCGCCACCAT
M

1601 GGATTCACAG GCCCAGGTC TTATGTTACT GCCGCTATGG GTATCTGGTA
Kpn I
D S Q A Q V L M L L P L W V S G

1651 CCTGTGGGGA CATTGTGATG TCACAGTCTC CATCCTCCCT AGCTGTGTCA
T C G D I V M S Q S P S S L A V S

1701 GTTGGAGAGA AGGTTACTAT GAGCTGCAAG TCCAGTCAGA GCCTTTTATA
V G E K V T M S C K S S Q S L L Y
XbaI CDR 1

1751 TTCTAGAAAT CAAAAGAACT ACTTGGCCTG GTTCCAGCAG AAGCCAGGGC
S R N Q K N Y L A W F Q Q K P G

1801 AGTCTCCTAA ACTGCTGATT TTCTGGGCAT CCACTAGGGA ATCTGGGGTC
Q S P K L L I F W A S T R E S G V
CDR 2

1851 CCTGATCGCT TCACAGGCAG TGGATTTGGG ACGGATTTC AATCTCACCAT
P D R F T G S G F G T D F N L T I

1901 CAGCAGTGTG CAGGCTGAGG ACCTGGCAGT TTATGACTGT CAGCAATATT
S S V Q A E D L A V Y D C Q Q Y

1951 TTAGCTATCC GCTCACGTTT GGTGCTGGGA CCAAGCTGGA GCTGAAACGT
F S Y P L T F G A G T K L E L K R
CDR 3

BamH I

2001 GAGTggatcc ATCTGGGATA AGCATGCTGT TTTCTGTCTG TCCCTAACAT

2051 GCCCTGTGAT TATGCGCAAA CAACACACCC AAGGGCAGAA CTTTGTACT

2101 TAAACACCAT CCTGTTTGCT TCTTTCCTCA GGAACTGTGG CTGCACCATC
T V A A P S

2151 TGTCTTCATC TTCCCGCCAT CTGATGAGCA GTTGAAATCT GGAAGTGCCT
V F I F P P S D E Q L K S G T A

2201 CTGTTGTGTG CCTGCTGAAT AACTTCTATC CCAGAGAGGC CAAAGTACAG
S V V C L L N N F Y P R E A K V Q

2251 TGGAAGGTGG ATAACGCCCT CCAATCGGGT AACTCCCAGG AGAGTGTAC
W K V D N A L Q S G N S Q E S V T

2301 AGAGCAGGAC AGCAAGGACA GCACCTACAG CCTCAGCAGC ACCCTGACGC
E Q D S K D S T Y S L S S T L T

FN

26/3. ábra

2351 TGAGCAAAGC AGACTACGAG AAACACAAAG TCTACGCCTG CGAAGTCACC
 L S K A D Y E K H K V Y A C E V T
 2401 CATCAGGGCC TGAGCTCGCC CGTCACAAAG AGCTTCAACA GGGGAGAGTG
 H Q G L S S P V T K S F N R G E C
 2451 TTAGAGGGAG AAGTGCCCCC ACCTGCTCCT CAGTTCCAGC CTGACCCCCT
 *
 2501 CCCATCCTTT GGCCTCTGAC CCTTTTTTCCA CAGGGGACCT ACCCCTATTG
 2551 CGGTCCTCCA GCTCATCTTT CACCTCACCC CCCTCCTCCT CCTTGGCTTT
 2601 AATTATGCTA ATGTTGGAGG AGAATGAATA AATAAAGTGA ATCTTTGCAC
 2651 CTGTGGTGGA TCTAATAAAA GATATTTATT TTCATTAGAT ATGTGTGTTG
 2701 GTTTTTTTGTG TGCAGTGCCT CTATCTGGAG GCCAGGTAGG GCTGGCCTTG
 2751 GGGGAGGGGG AGGCCAGAAT GACTCCAAGA GCTACAGGAA GGCAGGTCAG
 2801 AGACCCCACT GGACAAACAG TGGCTGGACT CTGCACCATA ACACACAATC
 2851 AACAGGGGAG TGAGCTGGAA ATTTGCTAGC GAATTCTTGA AGACGAAAGG
 2901 GCCTCGTGAT ACGCCTATTT TTATAGGTTA ATGTCATGAT AATAATGGTT
 2951 TCTTAGACGT CAGGTGGCAC TTTTCGGGGA AATGTGCGCG GAACCCCTAT
 3001 TTGTTTATTT TTCTAAATAC ATTCAAATAT GTATCCGCTC ATGAGACAAT
 3051 AACCCTGATA AATGCTTCAA TAATATTGAA AAAGGAAGAG TATGAGTATT
 3101 CAACATTTCC GTGTCGCCCT TATTCCCTTT TTTGCGGCAT TTTGCCTTCC
 3151 TGTTTTTTGCT CACCCAGAAA CGCTGGTGAA AGTAAAAGAT GCTGAAGATC
 3201 AGTTGGGTGC ACGAGTGGGT TACATCGAAC TGGATCTCAA CAGCGGTAAG
 3251 ATCCTTGAGA GTTTTCGCCC CGAAGAACGT TTTCCAATGA TGAGCACTTT
 3301 TAAAGTTCTG CTATGTGGCG CGGTATTATC CCGTGTTGAC GCCGGGCAAG
 3351 AGCAACTCGG TCGCCGCATA CACTATTCTC AGAATGACTT GGTTGAGTAC
 3401 TCACCACTCA CAGAAAAGCA TCTTACGGAT GGCATGACAG TAAGAGAATT
 3451 ATGCAGTGCT GCCATAACCA TGAGTGATAA CACTGCGGCC AACTTACTTC
 Pvu I
 3501 TGACAACGAT CGGAGGACCG AAGGAGCTAA CCGCTTTTTT GCACAACATG
 3551 GGGGATCATG TAACTCGCCT TGATCGTTGG GAACCGGAGC TGAATGAAGC
 3601 CATACCAAAC GACGAGCGTG ACACCACGAT GCCTGCAGCA ATGGCAACAA

26/4. ábra

3651 CGTTGCGCAA ACTATTAAC T GCGAACTAC TTACTCTAGC TTCCCGGCAA
3701 CAATTAATAG ACTGGATGGA GCGGATAAA GTTGCAGGAC CACTTCTGCG
3751 CTCGGCCCTT CCGGCTGGCT GGT TTTATTGC TGATAAATCT GGAGCCGGTG
3801 AGCGTGGGTC TCGCGGTATC ATTGCAGCAC TGGGGCCAGA TGGTAAGCCC
3851 TCCCGTATCG TAGTTATCTA CACGACGGGG AGTCAGGCAA CTATGGATGA
3901 ACGAAATAGA CAGATCGCTG AGATAGGTGC CTCACTGATT AAGCATTGGT
3951 AACTGTCAGA CCAAGTTTAC TCATATATAC TTTAGATTGA TTTAAAACTT
4001 CATTTTTAAT TTAAAAGGAT CTAGGTGAAG ATCCTTTTTG ATAATCTCAT
4051 GACCAAATC CCTTAACGTG AGTTTTTCGTT CCACTGAGCG TCAGACCCCG
4101 TAGAAAAGAT CAAAGGATCT TCTTGAGATC CTTTTTTTCT GCGCGTAATC
4151 TGCTGCTTGC AAACAAAAA ACCACCGCTA CCAGCGGTGG TTTGTTTGCC
4201 GGATCAAGAG CTACCAACTC TTTTCCGAA GGTAAGTGGC TTCAGCAGAG
4251 CGCAGATACC AAATACTGTC CTTCTAGTGT AGCCGTAGTT AGGCCACCAC
4301 TTCAAGAACT CTGTAGCACC GCCTACATAC CTCGCTCTGC TAATCCTGTT
4351 ACCAGTGGCT GCTGCCAGTG GCGATAAGTC GTGTCTTACC GGGTTGGACT
4401 CAAGACGATA GTTACCGGAT AAGGCGCAGC GGTCGGGCTG AACGGGGGGT
4451 TCGTGACAC AGCCCAGCTT GGAGCGAACG ACCTACACCG AACTGAGATA
4501 CCTACAGCGT GAGCTATGAG AAAGCGCCAC GCTTCCCGAA GGGAGAAAGG
4551 CGGACAGGTA TCCGGTAAGC GGCAGGGTCG GAACAGGAGA GCGCACGAGG
4601 GAGCTTCCAG GGGGAAACGC CTGGTATCTT TATAGTCCTG TCGGGTTTCG
4651 CCACCTCTGA CTTGAGCGTC GATTTTTGTG ATGCTCGTCA GGGGGGCGGA
4701 GCCTATGGAA AAACGCCAGC AACGCGGCCT TTTTACGGTT CCTGGCCTTT
4751 TGCTGGCCTT TTGCTCCACAT GTTCTTTCCT GCGTTATCCC CTGATTCTGT
4801 GGATAACCGT ATTACCGCCT TTGAGTGAGC TGATACCGCT CGCCGCAGCC
4851 GAACGACCGA GCGCAGCGAG TCAGTGAGCG AGGAAGCGGA AGAGCGCCTG
4901 ATGCGGTATT TTCTCCTTAC GCATCTGTGC GGTATTTTAC ACCGCATATG

26/5. ábra

Bst1107I

4951 GTGCACTCTC AGTACAATCT GCTCTGATGC CGCATAGTTA AGCCAGTATA

5001 CACTCCGCTA TCGCTACGTG ACTGGGTCAT GGCTGCGCCC CGACACCCGC

5051 CAACACCCGC TGACGCGCCC TGACGGGCTT GTCTGCTCCC GGCATCCGCT

5101 TACAGACAAG CTGTGACCGT CTCCGGGAGC TGCATGTGTC AGAGGTTTTTC

5151 ACCGTCATCA CCGAAACGCG CGAGGCAGCT GTGGAATGTG TGTCAGTTAG

5201 GGTGTGAAAA GTCCCCAGGC TCCCCAGCAG GCAGAAGTAT GCAAAGCATG

5251 CATCTCAATT AGTCAGCAAC CAGGCTCCCC AGCAGGCAGA AGTATGCAAA

5301 GCATGCATCT CAATTAGTCA GCAACCATAG TCCCGCCCCT AACTCCGCCC

5351 ATCCCGCCCC TAACTCCGCC CAGTTCCGCC CATTCTCCGC CCCATGGCTG

Sfi I

5401 ACTAATTTTT TTTATTTATG CAGAGGCCGA GGCCGCCTCG GCCTCTGAGC

Stu I/Avr II

5451 TATTCCAGAA GTAGTGAGGA GGCTTTTTTG GAGGCCTAGG CTTTTGCAAA

5501 AAGCTAGCTT CACGCTGCCG CAAGCACTCA GGGCGCAAGG GCTGCTAAAG

5551 GAAGCGGAAC ACGTAGAAAG CCAGTCCGCA GAAACGGTGC TGACCCCGGA

5601 TGAATGTCAG CTA CTG GGGCT ATCTGGACAA GGGAAAACGC AAGCGCAAAG

5651 AGAAAGCAGG TAGCTTG CAG TGGGCTTACA TGGCGATAGC TAGACTGGGC

5701 GGTTTTATGG ACAGCAAGCG AACC GGAATT GCCAGCTGGG GCGCCCTCTG

5751 GTAAGGTTGG GAAGCCCTGC AAAGTAACT GGATGGCTTT CTTGCCGCCA

Bgl II/Bcl I

5801 AGGATCTGAT GGC GCAGGGG ATCAAGATCT GATCAAGAGA CAGGATGAGG

5851 ATCGTTTCGC ATGATTGAAC AAGATGGATT GCACGCAGGT TCTCCGGCCG

5901 CTTGGGTGGA GAGGCTATTC GGCTATGACT GGGCACAACA GACAATCGGC

5951 TGCTCTGATG CCGCCGTGTT CCGGCTGTCA GCGCAGGGGC GCCCGGTTCT

6001 TTTTGTCAAG ACCGACCTGT CCGGTGCCCT GAATGAACTG CAGGACGAGG

Msc I

6051 CAGCGCGGCT ATCGTGGCTG GCCACGACGG GCGTTCCTTG CGCAGCTGTG

6101 CTCGACGTTG TCACTGAAGC GGGAAGGGAC TGGCTGCTAT TGGGCGAAGT

6151 GCCGGGGCAG GATCTCCTGT CATCTCACCT TGCTCCTGCC GAGAAAGTAT

6201 CCATCATGGC TGATGCAATG CGGCGGCTGC ATACGCTTGA TCCGGCTACC

26/6. ábra

6251 TGCCCATTCG ACCACCAAGC GAAACATCGC ATCGAGCGAG CACGTACTCG
6301 GATGGAAGCC GGTCTTGTCG ATCAGGATGA TCTGGACGAA GAGCATCAGG
6351 GGCTCGCGCC AGCCGAACTG TTCGCCAGGC TCAAGGCGCG CATGCCCCGAC
6401 GGCGAGGATC TCGTCGTGAC CCATGGCGAT GCCTGCTTGC CGAATATCAT
6451 GGTGGAAAAT GGCCGCTTTT CTGGATTTCAT CGACTGTGGC CGGCTGGGTG
Rsr II
6501 TGGCGGACCG CTATCAGGAC ATAGCGTTGG CTACCCGTGA TATTGCTGAA
6551 GAGCTTGCGC GCGAATGGGC TGACCGCTTC CTCGTGCTTT ACGGTATCGC
6601 CGCTCCCGAT TCGCAGCGCA TCGCCTTCTA TCGCCTTCTT GACGAGTTCT
Nsp V
6651 TCTGAGCGGG ACTCTGGGT TCGAAATGAC CGACCAAGCG ACGCCCAACC
6701 TGCCATCACG AGATTTCGAT TCCACCGCCG CCTTCTATGA AAGGTTGGGC
6751 TTCGGAATCG TTTTCCGGGA CGCCGGCTGG ATGATCCTCC AGCGCGGGGA
Sma I Nru I
6801 TCTCATGCTG GAGTTCTTCG CCCACCCCGG GCTCGATCCC CTCGCGAGTT
6851 GGTTCAGCTG CTGCCTGAGG CTGGACGACC TCGCGGAGTT CTACCGGCAG
6901 TGCAAATCCG TCGGCATCCA GGAAACCAGC AGCGGCTATC CGCGCATCCA
6951 TGCCCCCGAA CTGCAGGAGT GGGGAGGCAC GATGGCCGCT TTGGTCCCGG
7001 ATCTTTGTGA AGGAACCTTA CTTCTGTGGT GTGACATAAT TGGACAAACT
7051 ACCTACAGAG ATTTAAAGCT CTAAGGTAAA TATAAAATTT TTAAGTGTAT
7101 AATGTGTAA ACTACTGATT CTAATTGTTT GTGTATTTTA GATTCCAACC
7151 TATGGAAGCTG ATGAATGGGA GCAGTGGTGG AATGCCTTTA ATGAGGAAAA
7201 CCTGTTTTGC TCAGAAGAAA TGCCATCTAG TGATGATGAG GCTACTGCTG
7251 ACTCTCAACA TTCTACTCCT CCAAAAAAGA AGAGAAAGGT AGAAGACCCC
7301 AAGGACTTTC CTTCAGAATT GCTAAGTTTT TTGAGTCATG CTGTGTTTAG
7351 TAATAGAACT CTTGCTTGCT TTGCTATTTA CACCACAAAG GAAAAAGCTG
7401 CACTGCTATA CAAGAAAATT ATGGAAAAAT ATTCTGTAAC CTTTATAAGT
7451 AGGCATAACA GTTATAATCA TAACATACTG TTTTTTCTTA CTCCACACAG
7501 GCATAGAGTG TCTGCTATTA ATAACATATGC TCAAAAATTG TGTACCTTTA

FR

26/7. ábra

7551 GCTTTTAAAT TTGTAAAGGG GTTAATAAGG AATATTTGAT GTATAGTGCC
 7601 TTGACTAGAG ATCATAATCA GCCATACCAC ATTTGTAGAG GTTTTACTTG
 7651 CTTTAAAAAA CCTCCACAC CTCCCCCTGA ACCTGAAACA TAAAATGAAT
 Mun I
 7701 GCAATTGTTG TTGTAACTT GTTTATTGCA GCTTATAATG GTTACAAATA
 7751 AAGCAATAGC ATCACAAATT TCACAAATAA AGCATTTTTT TCACTGCATT
 7801 CTAGTTGTGG TTTGTCCAAA CTCATCAATG TATCTTATCA TGTCTGGATC
 7851 TAATAAAAGA TATTTATTTT CATTAGATAT GTGTGTTGGT TTTTGTGTG
 7901 CAGTGCCTCT ATCTGGAGGC CAGGTAGGGC TGGCCTGGG GGAGGGGGAG
 7951 GCCAGAATGA CTCCAAGAGC TACAGGAAGG CAGGTCAGAG ACCCCACTGG
 8001 ACAAACAGTG GCTGGACTCT GCACCATAAC ACACAATCAA CAGGGGAGTG
 8051 AGCTGGAAAT TTGCTAGC

27/1. ábra

1 TTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAAT
 61 GGTTCCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTT
 121 ATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCT
 181 TCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCC
 241 CTTTTTTCGGCATTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAA
 301 AGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGG
 361 TAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGT
 421 TCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCG
 481 CATACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTAC
 541 GGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCG
 Pvu I
 601 GGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAA
 661 CATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACC
 Fsp I
 721 AAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATT
 781 AACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGA



20/43

27/2. ábra

841 TAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAA
901 ATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAA
961 GCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAA
1021 TAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGT
1081 TTA CT CAT AT ATA CT TTAG ATT GAT TTT AAA ACT TCA TTT TTTA ATTT AAA AGG ATCT AGGT
1141 GAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTG
1201 AGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGT
1261 AATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCA
1321 AGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAC TGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATAC
1381 TGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTAC
1441 ATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCT
1501 TACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGG
1561 GGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACA
1621 GCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGT
1681 AAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTA
1741 TCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTC
1801 GTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGC
BspLU11I
1861 CTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAA
1921 CCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAG
1981 CGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCT
2041 GTGCGGTATTTACACCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATA
Bst1107 I
2101 GTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTCATGGCTGCGCCCCGACAC
2161 CCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGA
2221 CAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTTACCGTCATCACCAGAA
2281 CGCGCGAGGCAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCCTAACTCCGCC
2341 CATCCCGCCCCCTAACTCCGCCCAGTTCGCCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTT
Sfi I
2401 TTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGG
Stu I/Avr II
2461 AGGCTTTTTTGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTAGCTTACAGCTCAGGGCTGCGATT

TH

27/3. ábra

2521 TCGCGCCAACTTGACGGCAATCCTAGCGTGAAGGCTGGTAGGATTTTATCCCCGCTGCC
2581 ATCATGGTTCGACCATTGAACTGCATCGTCGCCGTGTCCCAAATATGGGGATTGGCAAG
2641 AACGGAGACCTACCCTGGCCTCCGCTCAGGAACGAGTTCAAGTACTTCCAAAGAATGACC
2701 ACAACCTCTTCAGTGAAGGTAAACAGAATCTGGTGATTATGGGTAGGAAAACCTGGTTC
2761 TCCATTCTTGAGAAGAATCGACCTTTAAAGGACAGAATTAATATAGTTCTCAGTAGAGAA
2821 CTCAAAGAACCACCACGAGGAGCTCATTCTTGCCAAAAGTTTGGATGATGCCTTAAGA
2881 CTTATTGAACAACCGGAATTGGCAAGTAAAGTAGACATGGTTTGGATAGTCGGAGGCAGT
2941 TCTGTTTACCAGGAAGCCATGAATCAACCAGGCCACCTCAGACTCTTTGTGACAAGGATC
3001 ATGCAGGAATTTGAAAGTGACACGTTTTTCCAGAAATTGATTGGGGAAATATAAACTT
3061 CTCCCAGAATACCCAGGCGTCTCTCTGAGGTCCAGGAGGAAAAAGGCATCAAGTATAAG
3121 TTTGAAGTCTACGAGAAGAAAGACTAACAGGAAGATGCTTTCAAGTTCTCTGCTCCCCTC
3181 CTAAAGCTATGCATTTTATAAGACCATGGGACTTTTGCTGGCTTTAGATCTTTGTGAAG
3241 GAACCTTACTTCTGTGGTGTGACATAATTGGACAACTACCTACAGAGATTTAAAGCTCT
3301 AAGGTAAATATAAAATTTTAAAGTGTATAATGTGTAACTACTGATTCTAATTGTTTGT
3361 GTATTTTAGATTCCAACCTATGGAAGTATGAATGGGAGCAGTGGTGGAAATGCCTTTAAT
3421 GAGGAAAACCTGTTTTGCTCAGAAGAAATGCCATCTAGTGATGATGAGGCTACTGCTGAC
3481 TCTCAACATTCTACTCCTCCAAAAAGAAGAGAAAGGTAGAAGACCCCAAGGACTTTCCT
3541 TCAGAATTGCTAAGTTTTTTGAGTCATGCTGTGTTTAGTAATAGAACTCTTGCTTGCTTT
3601 GCTATTTACACCACAAAGGAAAAAGCTGCACTGCTATACAAGAAAATTATGGAAAAATAT
3661 TCTGTAACCTTTATAAGTAGGCATAACAGTTATAATCATAACATACTGTTTTTTCTTACT
3721 CCACACAGGCATAGAGTGTCTGCTATTAATAACTATGCTCAAAAATTGTGTACCTTTAGC
3781 TTTTAAATTTGTAAAGGGTTAATAAGGAATATTTGATGTATAGTGCCTTGACTAGAGAT
BsaB I
3841 CATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCT
Mun I
3901 CCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGC
3961 TTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTC
4021 ACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCTA
4081 ATAAAAGATATTTATTTTCATTAGATATGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCAGTGCCTCTAT
4141 CTGGAGGCCAGGTAGGGCTGGCCTTGGGGGAGGGGAGGCCAGAATGACTCCAAGAGCTA
4201 CAGGAAGGCAGGTCAGAGACCCCACTGGACAAACAGTGGCTGGACTCTGCACCATAACAC

F2

22/43

27/4. ábra

EcoR I
 4261 ACAATCAACAGGGGAGTGAGCTGGAAATTTGCTAGCGAATTCcagcacactggcggccgt
 Spe I
 4321 tACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTT
 4381 CCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCC
 4441 ATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACG
 4501 TCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACCTGGCAGTACATCAAGTGTATCATAT
 4561 GCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCCA
 SnaB I
 4621 GTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTAT
 4681 TACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGATAGCGGTTTGACTCAGC
 4741 GGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCA
 4801 ACGGGACTTTCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCG
 4861 TGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAG
 4921 ACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGG
 4981 CCGGGAACGGTGCATTGGAACGCGGATTCCCCGTGCCAAGAGTGACGTAAGTACCGCCTA
 5041 TAGAGTCTATAGGCCACCCCCTTGGCTTCTTATGCATGCTATACTGTTTTTGGCTTGGG
 Bpu1102I
 5101 GTCTATACACCCCGCTTCCTCATGTTATAGGTGATGGTATAGCTTAGCCTATAGGTGTG
 Xcm I
 5161 GGTTATTGACCATTATTGACCCTCCCTATTGGTGACGATACTTTCCATTACTAATCCA
 5221 TAACATGGCTCTTTGCCACAACCTCTCTTTATTGGCTATATGCCAATACACTGTCCTTCAG
 5281 AGACTGACACGGACTCTGTATTTTTACAGGATGGGGTCTCATTTATTATTACAAATTCA
 5341 CATATACAACACCACCGTCCCCAGTGCCCGCAGTTTTTTATTAAACATAACGTGGGATCTC
 BspE I
 5401 CACGCGAATCTCGGGTACGTGTTCCGGACATGGGCTCTTCTCCGGTAGCGGCGGAGCTTC
 5461 TACATCCGAGCCCTGCTCCCATGCCTCCAGCGACTCATGGTCGCTCGGCAGCTCCTTGCT
 5521 CCTAACAGTGGAGGCCAGACTTAGGCACAGCACGATGCCACCACCACCAGTGTGCCGCA
 5581 CAAGGCCGTGGCGGTAGGGTATGTGTCTGAAAATGAGCTCggggagcgggcttgaccgc
 (Pvu II)
 5641 tgacgcatttggaagacttaaggcagcggcagaagaagatgcaggcagctgagttggtgt
 5701 gttctgataagagtcagaggtaactcccggttgcggtgctggttaacggtggagggcagtg
 5761 agtctgagcagtaactcgttgctgccgcgcgcgccaccagacataatagctgacagactaa
 Mlu I
 5821 cagactgttcctttccatgggtcctttctgcagtcaccgtccttgacACGCGTCTCGGGA
 Hind III
 5881 AGCTTGCCGCCACCATGGGATGGAGCTGGGTCTTTCTTTCTCCTGTCAGGAAGTGCAG
 M G W S W V F L F L L S G T A

EFM

27/5. ábra

(Pvu II)

5941 GTGTCCTCTCTGAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTT
 G V L S E V Q L Q Q S G P E L V K P G A
 Xba I Dra III

6001 CAGTAAAGATGTCCTGCAAGACTTCTAGATACACATTCACTGAATACACCATACACTGGG
 S V .K M S C K T S R Y T F T E Y T I H W
 CDR 1

6061 TGAGACAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGGTATTAATCCTAACAATGGTA
 V R Q S H G K S L E W I G G I N P N N G

6121 TTCCTAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGCCACATTGACTGTAGGCAAGTCTCTCA
 I P N Y N Q K F K G R A T L T V G K S S
 CDR 2

6181 GCACCGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGATTCTGCGGTCTATTTCTGTG
 S T A Y M E L R S L T S E D S A V Y F C

6241 CAAGAAGAAGAATCGCCTATGGTTACGACGAGGGCCATGCTATGGACTACTGGGGTCAAG
 A R R R I A Y G Y D E G H A M D Y W G Q
 CDR 3 BamH I

6301 GAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGGTGAGTGGATCCTCTGCGCCTGGGCCCAGCTCTGTC
 G T S V T V S S

6361 CCACACCGCGGTACATGGCACCACCTCTCTTGACGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCT
 S T K G P S V

6421 TCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGG
 F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L
 Age I

6481 TCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCG
 V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S

6541 GCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGG
 G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V
 BstE II

6601 TGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC
 V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K

6661 CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACAT
 P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T

6721 GCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAA
 C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P

6781 AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACC
 K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D

6841 TGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA
 V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H

6901 ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCC
 N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V

6961 TCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACA
 L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N

27/6. ábra

7021 AAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC
K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E

7081 CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGA
P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L

7141 CCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC
T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G

7201 AGCCGGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC
Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F

7261 TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCT
L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C

7321 CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P
 Ngom I

7381 GTAAATGAGTGCGACGGCCGGCAAGCCCCGCTCCCCGGGCTCTCGCGGTCGCACGAGGAT
G K *

7441 GCTTGGCACGTACCCCCTGTACATACTTCCCGGGCGCCAGCATGGAAATAAAGCACCGG

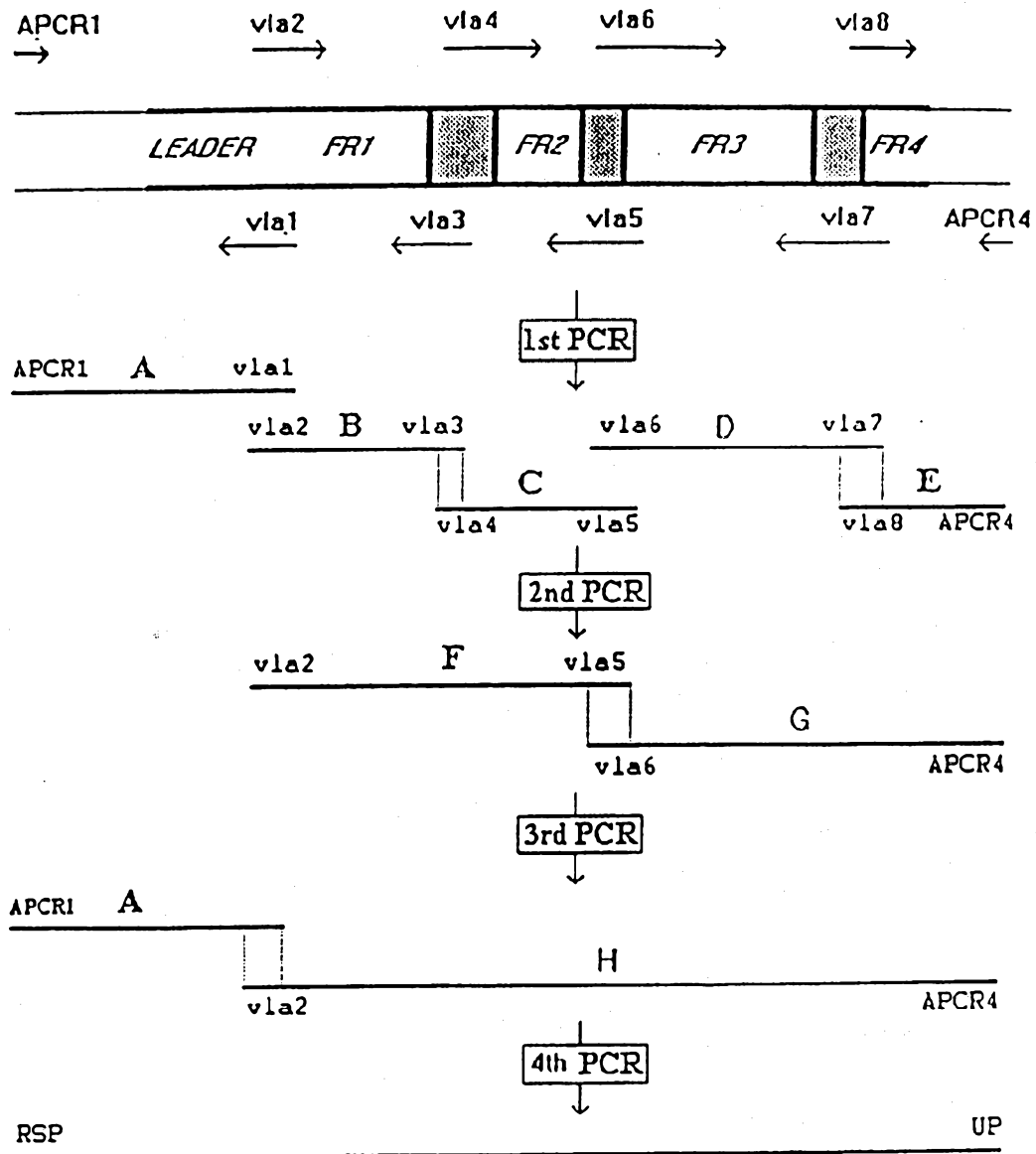
7501 ATCTAATAAAAGATATTTATTTTCATTAGATATGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCAGTGCC

7561 TCTATCTGGAGGCCAGGTAGGGCTGGCCTTGGGGGAGGGGGAGGCCAGAATGACTCCAAG

7621 AGCTACAGGAAGGCAGGTCAGAGACCCCACTGGACAAACAGTGGCTGGACTCTGCACCAT

7681 AACACACAATCAACAGGGGAGTGAGCTGGaaatttgctagcgaattaattc 7731

28. ábra



FR

26/43

29/1. ábra

	1	D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	19
A		GAC	ATT	GTG	ATG	ACC	CAA	TCT	CCA	GAC	TCT	TTG	GCT	GTG	TCT	CTA	GGG	GAG	AGG	GCC
B		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
C		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

	20	T	I	N	C	CDR1	27	A	B	C	D	E	F	28		32				
A		ACC	ATC	AAC	TGC	AAG	TCC	AGT	CAG	AGC	CTT	TTA	TAT	TCT	AGA	AAT	CAA	AAG	AAC	TAC
B		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
C		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

	33	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	F	51	
A		TTG	GCC	TGG	TAT	CAG	CAG	AAA	CCA	GGA	CAG	CCA	CCC	AAA	CTC	CTC	ATC	TTT	TGG	GCT
B		---	---	---	F	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
C		---	---	---	TC	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	Y	---	---

	52	S	T	R	E	S	CDR2	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	F	G	T	70
A		AGC	ACT	AGG	GAA	TCT	GGG	GTA	CCT	GAT	AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	TTT	GGG	ACA	GAC	
B		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
C		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	

	71	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	88
A		TTC	ACC	CTC	ACC	ATT	AGC	AGC	CTG	CAG	GCT	GAA	GAT	GTG	GCA	GTT	TAT	TAC	TGT
B		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	D	---
C		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	G	---

	89	Q	Q	Y	F	S	Y	P	L	T	CDR3	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	107
A		CAG	CAA	TAT	TTT	AGC	TAT	CCG	CTC	ACG	TTC	GGA	CAA	GGG	ACC	AAG	GTG	GAA	ATA	AAA	
B		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
C		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	

Bn

30/1. ábra

Spe I

1 gaattccagc acactggcgg ccggttACTAG TTATTAATAG TAATCAATTA

51 CGGGGTCATT AGTTCATAGC CCATATATGG AGTTCCGCGT TACATAACTT

101 ACGGTAAATG GCCCGCCTGG CTGACCGCCC AACGACCCCC GCCCATTGAC

151 GTCAATAATG ACGTATGTTC CCATAGTAAC GCCAATAGGG ACTTTCCATT

201 GACGTCAATG GGTGGAGTAT TTACGGTAAA CTGCCCCACTT GGCAGTACAT

251 CAAGTGTATC ATATGCCAAG TACGCCCCCT ATTGACGTCA ATGACGGTAA

301 ATGGCCCGCC TGGCATTATG CCCAGTACAT GACCTTATGG GACTTTCCTA

SnaB I

351 CTTGGCAGTA CATCTTACGTA TTAGTCATCG CTATTACCAT GGTGATGCGG

401 TTTTGGCAGT ACATCAATGG GCGTGGATAG CGGTTTGA CT CACGGGGATT

451 TCCAAGTCTC CACCCCATTG ACGTCAATGG GAGTTTGT TTT TGGCACCAAA

501 ATCAACGGGA CTTTCCAAAA TGTCGTAACA ACTCCGCCCC ATTGACGCAA

551 ATGGGCGGTA GGCGTGTACG GTGGGAGGTC TATATAAGCA GAGCTCGTTT

601 AGTGAACCGT CAGATCGCCT GGAGACGCCA TCCACGCTGT TTTGACCTCC

Sac II

651 ATAGAAGACA CCGGGACCGA TCCAGCCTCC GCGGCCGGGA ACGGTGCATT

701 GGAACGCGGA TTCCCCGTGC CAAGAGTGAC GTAAGTACCG CCTATAGAGT

751 CTATAGGCCC ACCCCCTTGG CTTCTTATGC ATGCTATACT GTTTTTGGCT

801 TGGGGTCTAT ACACCCCCGC TTCCTCATGT TATAGGTGAT GGTATAGCTT

851 AGCCTATAGG TGTGGGTAT TGACCATTAT TGACCACTCC CCTATTGGTG

901 ACGATACTTT CCATTACTAA TCCATAACAT GGCTCTTTGC CACAACCTCTC

951 TTTATTGGCT ATATGCCAAT AACTGTCCT TCAGAGACTG ACACGGACTC

1001 TGTATTTTTA CAGGATGGGG TCTCATTTAT TATTTACAAA TTCACATATA

1051 CAACACCACC GTCCCCAGTG CCCGCAGTTT TTATTAAACA TAACGTGGGA

(BspE I)

1101 TCTCCACGCG AATCTCGGGT ACGTGTTTCCG GACATGGGCT CTTCTCCGGT

1151 AGCGGCGGAG CTTCTACATC CGAGCCCTGC TCCCATGCCT CCAGCGACTC

1201 ATGGTCGCTC GGCAGCTCCT TGCTCCTAAC AGTGGAGGCC AGACTTAGGC

30/2. ábra

1251 ACAGCACGAT GCCCACCACC ACCAGTGTGC CGCACAAAGGC CGTGGCGGTA

1301 GGGTATGTGT CTGAAATGA GCTCg999gag c99gcttgca ccgctgacgc
Afl II

1351 atttggaaga cttaaggcag cggcagaaga agatgcaggc agctgagttg

1401 ttgtgttctg ataagagtca gaggttaactc ccgttgcggt gctgttaacg

1451 gtggagggca gtgtagtctg agcagtactc gttgctgccg cgcgcgccac

1501 cagacataat agctgacaga ctaacagact gttcctttcc atgggtcttt
Mlu I Hind III

1551 tctgcagtca ccgtccttga cacgcgtctc gggaagcttg CCGCCACCAT
M

1601 GGAGACAGAC AACTCCTGC TATGGGTGCT GCTGCTCTGG GTTCCAGGTT
E T D T L L L W V L L L W V P G
(BspE I)

1651 CCTCCGGAGA CATTGTGATG ACCCAATCTC CAGACTCTTT GGCTGTGTCT
S S G D I V M T Q S P D S L A V S

1701 CTAGGGGAGA GGGCCACCAT CAACTGCAAG TCCAGTCAGA GCCTTTTATA
L G E R A T I N C K S S Q S L L Y
XbaI CDR 1

1751 TTCTAGAAAT CAAAAGAACT ACTTGGCCTG GTATCAGCAG AAACCAGGAC
S R N Q K N Y L A W Y Q Q K P G
KpnI

1801 AGCCACCCAA ACTCCTCATC TTTTGGGCTA GCACTAGGGA ATCTGGGTA
Q P P K L L I F W A S T R E S G V
CDR 2

1851 CCTGATAGGT TCAGTGGCAG TGGGTTTGGG ACAGACTTCA CCCTCACCAT
P D R F S G S G F G T D F T L T I

1901 TAGCAGCCTG CAGGCTGAAG ATGTGGCAGT TTATTACTGT CAGCAATATT
S S L Q A E D V A V Y Y C Q Q Y

1951 TTAGCTATCC GCTCACGTTT GGACAAGGGA CCAAGGTGGA AATAAAACGT
F S Y P L T F G Q G T K V E I K R
CDR 3

BamH I

2001 GAGTggatcc ATCTGGGATA AGCATGCTGT TTTCTGTCTG TCCCTAACAT

2051 GCCCTGTGAT TATGCGCAAA CAACACACCC AAGGGCAGAA CTTTGTTACT

2101 TAAACACCAT CCTGTTTGCT TCTTTCCTCA GGAACTGTGG CTGCACCATC
T V A A P S

2151 TGTCTTCATC TTCCCGCCAT CTGATGAGCA GTTGAAATCT GGAAGTGCCT
V F I F P P S D E Q L K S G T A

2201 CTGTTGTGTG CCTGCTGAAT AACTTCTATC CCAGGAGGC CAAAGTACAG
S V V C L L N N F Y P R E A K V Q

2251 TGGAAGGTGG ATAACGCCCT CCAATCGGGT AACTCCCAGG AGAGTGTAC
W K V D N A L Q S G N S Q E S V T

2301 AGAGCAGGAC AGCAAGGACA GCACCTACAG CCTCAGCAGC ACCCTGACGC
E Q D S K D S T Y S L S S T L T

五

30/3. ábra

2351 TGAGCAAAGC AGACTACGAG AAACACAAAG TCTACGCCTG CGAAGTCACC
L S K A D Y E K H K V Y A C E V T
2401 CATCAGGGCC TGAGCTCGCC CGTCACAAAG AGCTTCAACA GGGGAGAGTG
H Q G L S S P V T K S F N R G E C
2451 TTAGAGGGAG AAGTGCCCCC ACCTGCTCCT CAGTTCCAGC CTGACCCCCCT
* Psp5 II
2501 CCCATCCTTT GGCCTCTGAC CCTTTTTTCCA CAGGGGACCT ACCCCTATTG
2551 CGGTCCTCCA GCTCATCTTT CACCTCACCC CCCTCCTCCT CCTTGGCTTT
2601 AATTATGCTA ATGTTGGAGG AGAATGAATA AATAAAGTGA ATCTTTGCAC
2651 CTGTGGTGGA TCTAATAAAA GATATTTATT TTCATTAGAT ATGTGTGTTG
2701 GTTTTTTGTG TGCAGTGCCT CTATCTGGAG GCCAGGTAGG GCTGGCCTTG
2751 GGGGAGGGGG AGGCCAGAAT GACTCCAAGA GCTACAGGAA GGCAGGTCAG
2801 AGACCCCACT GGACAAACAG TGGCTGGACT CTGCACCATA ACACACAATC
2851 AACAGGGGAG TGAGCTGGAA ATTTGCTAGC GAATTCTTGA AGACGAAAGG
2901 GCCTCGTGAT ACGCCTATTT TTATAGGTGA ATGTCATGAT AATAATGGTT
2951 TCTTAGACGT CAGGTGGCAC TTTTCGGGGA AATGTGCGCG GAACCCCTAT
3001 TTGTTTATTT TTCTAAATAC ATTCAAATAT GTATCCGCTC ATGAGACAAT
3051 AACCTGATA AATGCTTCAA TAATATTGAA AAAGGAAGAG TATGAGTATT
3101 CAACATTTCC GTGTCGCCCT TATTCCTTTT TTTGCGGCAT TTTGCCTTCC
3151 TGTTTTTGCT CACCCAGAAA CGCTGGTGAA AGTAAAAGAT GCTGAAGATC
3201 AGTTGGGTGC ACGAGTGGGT TACATCGAAC TGGATCTCAA CAGCGGTAAG
3251 ATCCTTGAGA GTTTTCGCCC CGAAGAACGT TTTCCAATGA TGAGCACTTT
3301 TAAAGTTCTG CTATGTGGCG CGGTATTATC CCGTGTGAC GCCGGGCAAG
3351 AGCAACTCGG TCGCCGCATA CACTATTCTC AGAATGACTT GGTGAGTAC
3401 TCACCAGTCA CAGAAAAGCA TCTTACGGAT GGCATGACAG TAAGAGAATT
3451 ATGCAGTGCT GCCATAACCA TGAGTGATAA CACTGCGGCC AACTTACTTC
Pvu I
3501 TGACAACGAT CGGAGGACCG AAGGAGCTAA CCGCTTTTTT GCACAACATG
3551 GGGGATCATG TAACTCGCCT TGATCGTTGG GAACCGGAGC TGAATGAAGC

F21

30/4. ábra

3601 CATACCAAAC GACGAGCGTG ACACCACGAT GCCTGCAGCA ATGGCAACAA
3651 CGTTGCGCAA ACTATTA ACT GGC GA ACTAC TTACTCTAGC TTCCCGGCAA
3701 CAATTAATAG ACTGGATGGA GGCGGATAAA GTTGCAGGAC CACTTCTGCG
3751 CTCGGCCCTT CCGGCTGGCT GGT TTATTGC TGATAAATCT GGAGCCGGTG
3801 AGCGTGGGTC TCGCGGTATC ATTGCAGCAC TGGGGCCAGA TGGTAAGCCC
3851 TCCCGTATCG TAGTTATCTA CACGACGGGG AGTCAGGCAA CTATGGATGA
3901 ACGAAATAGA CAGATCGCTG AGATAGGTGC CTCACTGATT AAGCATTGGT
3951 AACTGTCAGA CCAAGTTTAC TCATATATAC TTTAGATTGA TTTAAACTT
4001 CATTTTAAAT TTAAAAGGAT CTAGGTGAAG ATCCTTTTTG ATAATCTCAT
4051 GACCAAAATC CCTTAACGTG AGTTTTCGTT CCACTGAGCG TCAGACCCCG
4101 TAGAAAAGAT CAAAGGATCT TCTTGAGATC CTTTTTTTCT GCGCGTAATC
4151 TGCTGCTTGC AAACAAAAAA ACCACCGCTA CCAGCGGTGG TTTGTTTGCC
4201 GGATCAAGAG CTACCAACTC TTTTCCGAA GGTAAGTGGC TTCAGCAGAG
4251 CGCAGATACC AAATACTGTC CTTCTAGTGT AGCCGTAGTT AGGCCACCAC
4301 TTCAAGAACT CTGTAGCACC GCCTACATAC CTCGCTCTGC TAATCCTGTT
4351 ACCAGTGGCT GCTGCCAGTG GCGATAAGTC GTGTCTTACC GGGTTGGACT
4401 CAAGACGATA GTTACCGGAT AAGGCGCAGC GGTCGGGCTG AACGGGGGGT
4451 TCGTGACAC AGCCAGCTT GGAGCGAACG ACCTACACCG AACTGAGATA
4501 CCTACAGCGT GAGCTATGAG AAAGCGCCAC GCTTCCCGAA GGGAGAAAGG
4551 CGGACAGGTA TCCGGTAAGC GGCAGGGTCG GAACAGGAGA GCGCACGAGG
4601 GAGCTTCCAG GGGGAAACGC CTGGTATCTT TATAGTCCTG TCGGGTTTCG
4651 CCACCTCTGA CTTGAGCGTC GATTTTGTG ATGCTCGTCA GGGGGGCGGA
4701 GCCTATGGAA AAACGCCAGC AACGCGGCCT TTTTACGGTT CCTGGCCTTT
4751 TGCTGGCCTT TTGCTACAT GTTCTTCCT GCGTTATCCC CTGATTCTGT
4801 GGATAACCGT ATTACCGCCT TTGAGTGAGC TGATAACCGT CGCCGCAGCC

BspLU11I

30/5. ábra

4851 GAACGACCGA GCGCAGCGAG TCAGTGAGCG AGGAAGCGGA AGAGCGCCTG
 4901 ATGCGGTATT TTCTCCTTAC GCATCTGTGC GGTATTTTAC ACCGCATATG
 4951 GTGCACTCTC AGTACAATCT GCTCTGATGC CGCATAGTTA AGCCAGTATA Bst1107I
 5001 CACTCCGCTA TCGCTACGTG ACTGGGTCAT GGCTGCGCCC CGACACCCGC
 5051 CAACACCCGC TGACGCGCCC TGACGGGCTT GTCTGCTCCC GGCATCCGCT
 5101 TACAGACAAG CTGTGACCGT CTCCGGGAGC TGCATGTGTC AGAGGTTTTTC
 5151 ACCGTCATCA CCGAAACGCG CGAGGCAGCT GTGGAATGTG TGTCAGTTAG
 5201 GGTGTGGAAG GTCCCCAGGC TCCCCAGCAG GCAGAAGTAT GCAAAGCATG
 5251 CATCTCAATT AGTCAGCAAC CAGGCTCCCC AGCAGGCAGA AGTATGCAAA
 5301 GCATGCATCT CAATTAGTCA GCAACCATAG TCCCGCCCCT AACTCCGCCC
 5351 ATCCCGCCCC TAACTCCGCC CAGTTCCGCC CATTCTCCGC CCCATGGCTG
 5401 ACTAATTTTT TTTATTTATG CAGAGGCCGA GGCCGCTCG GCCTCTGAGC Sfi I
 5451 TATTCCAGAA GTAGTGAGGA GGCTTTTTTG GAGGCCTAGG CTTTTGCAAA Stu I/Avr II
 5501 AAGCTAGCTT CACGCTGCCG CAAGCACTCA GGGCGCAAGG GCTGCTAAAG
 5551 GAAGCGGAAC ACGTAGAAAG CCAGTCCGCA GAAACGGTGC TGACCCCGGA
 5601 TGAATGTCAG CTAAGGGCT ATCTGGACAA GGGAAAACGC AAGCGCAAAG
 5651 AGAAAGCAGG TAGCTTGAGG TGGGCTTACA TGGCGATAGC TAGACTGGGC
 5701 GGTTTTATGG ACAGCAAGCG AACCGBAATT GCCAGCTGGG GCGCCCTCTG
 5751 GTAAGGTTGG GAAGCCCTGC AAAGTAAACT GGATGGCTTT CTTGCCGCCA Bgl II/Bcl I
 5801 AGGATCTGAT GCGCAGGGG ATCAAGATCT GATCAAGAGA CAGGATGAGG
 5851 ATCGTTTCGC ATGATTGAAC AAGATGGATT GCACGCAGGT TCTCCGGCCG
 5901 CTTGGGTGGA GAGGCTATTC GGCTATGACT GGGCACAACA GACAATCGGC
 5951 TGCTCTGATG CCGCCGTGTT CCGGCTGTCA GCGCAGGGGC GCGCGTTTCT
 6001 TTTTGTCAAG ACCGACCTGT CCGGTGCCCT GAATGAACTG CAGGACGAGG
 6051 CAGCGCGGCT ATCGTGGCTG GCCACGACGG GCGTTCCTTG CGCAGCTGTG Msc I

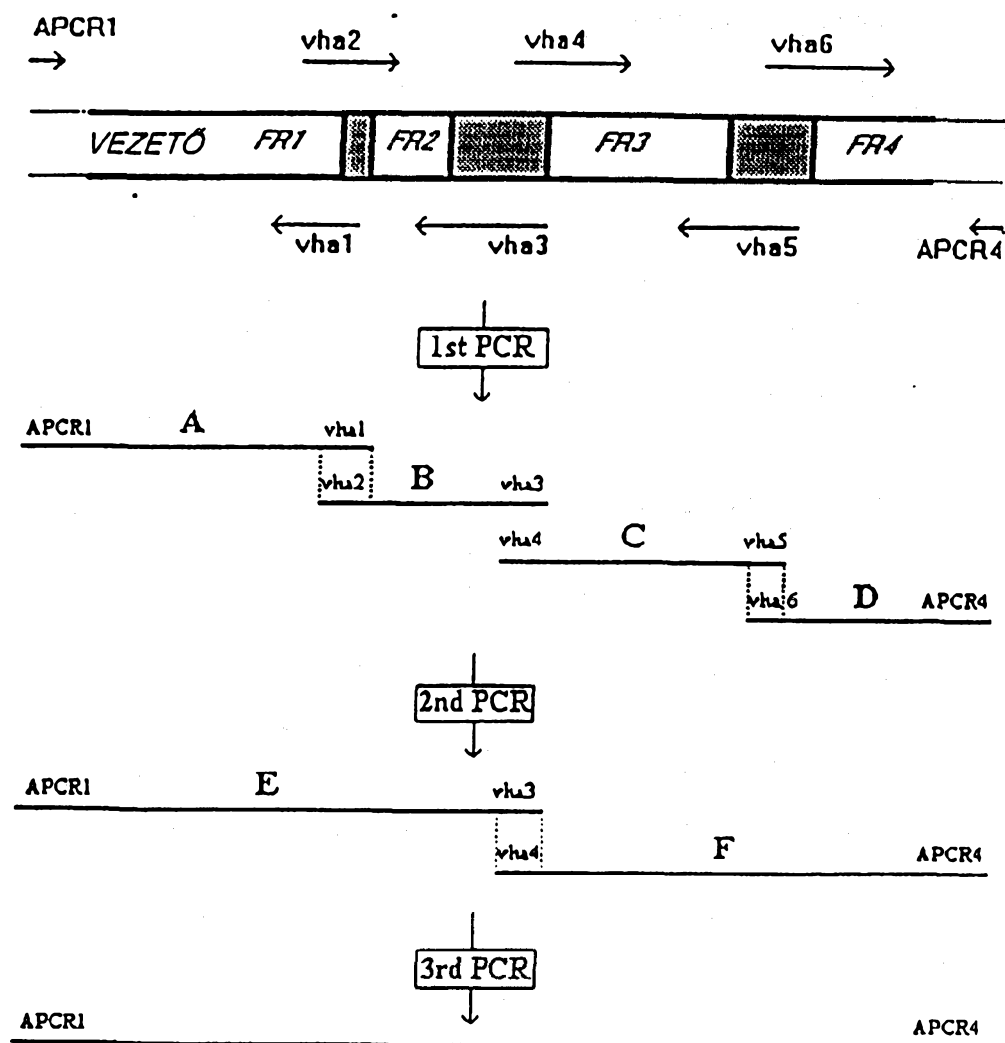
30/6. ábra

6101 CTCGACGTTG TCACTGAAGC GGGAAGGGAC TGGCTGCTAT TGGGCGAAGT
6151 GCCGGGGCAG GATCTCCTGT CATCTCACCT TGCTCCTGCC GAGAAAGTAT
6201 CCATCATGGC TGATGCAATG CGGCGGCTGC ATACGCTTGA TCCGGCTACC
6251 TGCCCATTCG ACCACCAAGC GAAACATCGC ATCGAGCGAG CACGTACTCG
6301 GATGGAAGCC GGTCTTGTCTG ATCAGGATGA TCTGGACGAA GAGCATCAGG
6351 GGCTCGCGCC AGCCGAACTG TTCGCCAGGC TCAAGGCGCG CATGCCCGAC
6401 GGCGAGGATC TCGTCGTGAC CCATGGCGAT GCCTGCTTGC CGAATATCAT
6451 GGTGGAAAAT GGCCGCTTTT CTGGATTCAT CGACTGTGGC CGGCTGGGTG
6501 ^{Rsr II}
TGGCGGACCG CTATCAGGAC ATAGCGTTGG CTACCCGTGA TATTGCTGAA
6551 GAGCTTGCGC GCGAATGGGC TGACCGCTTC CTCGTGCTTT ACGGTATCGC
6601 CGCTCCCGAT TCGCAGCGCA TCGCCTTCTA TCGCCTTCTT GACGAGTTCT
6651 ^{Nsp V}
TCTGAGCGGG ACTCTGGGGT TCGAAATGAC CGACCAAGCG ACGCCCAACC
6701 TGCCATCACG AGATTTTCGAT TCCACCGCCG CCTTCTATGA AAGGTTGGGC
6751 TTCGGAATCG TTTTCCGGGA CGCCGGCTGG ATGATCCTCC AGCGCGGGGA
6801 ^{Sma I} ^{Nru I}
TCTCATGCTG GAGTTCTTCG CCCACCCCCGG GCTCGATCCC CTCGCGAGTT
6851 GGTTCAGCTG CTGCCTGAGG CTGGACGACC TCGCGGAGTT CTACCGGCAG
6901 TGCAAATCCG TCGGCATCCA GGAAACCAGC AGCGGCTATC CGCGCATCCA
6951 TGCCCCCGAA CTGCAGGAGT GGGGAGGCAC GATGGCCGCT TTGGTCCCGG
7001 ATCTTTGTGA AGGAACCTTA CTTCTGTGGT GTGACATAAT TGGACAAACT
7051 ACCTACAGAG ATTTAAAGCT CTAAGGTAAA TATAAAATTT TTAAGTGTAT
7101 AATGTGTTAA ACTACTGATT CTAATTGTTT GTGTATTTTA GATTCCAACC
7151 TATGGAAGCTG ATGAATGGGA GCAGTGGTGG AATGCCTTTA ATGAGGAAAA
7201 CCTGTTTTGC TCAGAAGAAA TGCCATCTAG TGATGATGAG GCTACTGCTG
7251 ACTCTCAACA TTCTACTCCT CCAAAAAAGA AGAGAAAGGT AGAAGACCCC
7301 AAGGACTTTC CTTCAGAATT GCTAAGTTTT TTGAGTCATG CTGTGTTTAG

30/7. ábra

7351 TAATAGAACT CTTGCTTGCT TTGCTATTTA CACCACAAAG GAAAAAGCTG
7401 CACTGCTATA CAAGAAAATT ATGGAAAAAT ATTCTGTAAC CTTTATAAGT
7451 AGGCATAACA GTTATAATCA TAACATACTG TTTTTTCTTA CTCCACACAG
7501 GCATAGAGTG TCTGCTATTA ATAACATATGC TCAAAAATTG TGTACCTTTA
7551 GCTTTTTTAAT TTGTAAAGGG GTTAATAAGG AATATTTGAT GTATAGTGCC
7601 TTGACTAGAG ATCATAATCA GCCATACCAC ATTTGTAGAG GTTTTACTTG
7651 CTTTAAAAAA CCTCCACAC CTCCCCCTGA ACCTGAAACA TAAATGAAT
Mun I
7701 GCAATTGTTG TTGTAACTT GTTTATTGCA GCTTATAATG GTTACAAATA
7751 AAGCAATAGC ATCACAAATT TCACAAATAA AGCATTTTTT TCACTGCATT
7801 CTAGTTGTGG TTTGTCCAAA CTCATCAATG TATCTTATCA TGTCTGGATC
7851 TAATAAAAGA TATTTATTTT CATTAGATAT GTGTGTTGGT TTTTGTGTG
7901 CAGTGCCTCT ATCTGGAGGC CAGGTAGGGC TGGCCTGGG GGAGGGGGAG
7951 GCCAGAATGA CTCCAAGAGC TACAGGAAGG CAGGTCAGAG ACCCCACTGG
8001 ACAAACAGTG GCTGGACTCT GCACCATAAC ACACAATCAA CAGGGGAGTG
8051 AGCTGGAAAT TTGCTAGC

31. ábra



32/1. ábra

	1	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	10	E	V	K	K	P	G	A	S	V	19	K
A		CAG	GTG	CAA	CTA	GTG	CAG	TCC	GGC	GCC	GAA	GTG	AAG	AAA	CCC	GGT	GCT	TCC	GTG	AAA		
B																						
C																						
D																						
E																						
	20	V	S	C	K	T	S	R	Y	T	F	T	30	CDR1							38	
A		GTC	AGC	TGT	AAA	ACT	AGT	AGA	TAC	ACC	TTC	ACT		E	Y	T	I	H	W	V	R	
B														GAA	TAC	ACC	ATA	CAC	TGG	GTT	AGA	
C																						
D																						
E							G															
							G-															
	39	Q	A	P	G	Q	R	L	E	W	I	G	49	52					A	53		56
A		CAG	GCC	CCT	GGC	CAA	AGG	CTG	GAG	TGG	ATA	GGA		G	I	N	P	N	N	Q	I	
B														GGT	ATT	AAT	CCT	AAC	AAT	GGT	ATT	
C																						
D																						
E																						
	57	CDR2												70								75
A		P	N	Y	N	Q	K	F	K	G		R	A	T	L	T	V	G	K	S	A	
B		CCT	AAC	TAC	AAC	CAG	AAG	TTC	AAG	GGC		CGG	GCC	ACC	TTG	ACC	GTA	GGC	AAG	TCT	GCC	
C																						
D													V		I		D	T				
E													-T-		A-C		-A-	-CC				
													V		I		D	T				
													-T-		A-C		-A-	-CC				
													V		I		D	T				
													-T-		A-C		-A-	-CC				
	76	S	T	A	Y	M	E	L	S	S	82	A	B	C	83							91
A		AGC	ACC	GCC	TAC	ATG	GAA	CTG	TCC	AGC	CTG	CGC	TCC	GAG	GAC	ACT	GCA	GTC	TAC	TAC		
B																					F	
C																					-T-	
D																					F	
E																					-T-	

36/43

32/2. ábra

	92			CDR3					100	A	B	C	D	I	J	K	101		103
	C	A	R	R	R	I	A	Y	G	Y	D	E	G	H	A	M	D	Y	W
A	TGC	GCC	AGA	AGA	AGA	ATC	GCC	TAT	GGT	TAC	GAC	GAG	GGC	CAT	GCT	ATG	GAC	TAC	TGG
B	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
D	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

	104									113	
	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	
A	GGT	CAA	GGA	ACC	CTT	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	
B	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
D	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
E	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	

33/1. ábra

1 TTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAAT
 61 GGTTCCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTT
 121 ATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCT
 181 TCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCC
 241 CTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAA
 301 AGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGG
 361 TAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGT
 421 TCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCG
 481 CATACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTAC
 541 GGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGC
 Pvu I
 601 GGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAA
 661 CATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACC
 Fsp I
 721 AAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATT
 781 AACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGA

33/2. ábra

841 TAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAA
 901 ATCTGGAGCCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAA
 961 GCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAA
 1021 TAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGT
 1081 TTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGT
 1141 GAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTG
 1201 AGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGT
 1261 AATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCA
 1321 AGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATAC
 1381 TGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTAC
 1441 ATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCT
 1501 TACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGG
 1561 GGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACA
 1621 GCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGT
 1681 AAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTA
 1741 TCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTC
 1801 GTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGC
 BspLUI11
 1861 CTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAA
 1921 CCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAG
 1981 CGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCT
 2041 GTGCGGTATTTACACCGCATATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATA
 Bst1107 I
 2101 GTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTCATGGCTGCGCCCCGACAC
 2161 CCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGA
 2221 CAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAA
 2281 CGCGCGAGGCAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCCTAACTCCGCC
 2341 CATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTT
 Sfi I
 2401 TTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGG
 Stu I/Avr II
 2461 AGGCTTTTTTGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTAGCTTACAGCTCAGGGCTGCGATT

33/3. ábra

2521 TCGCGCCAAACTTGACGGCAATCCTAGCGTGAAGGCTGGTAGGATTTTATCCCCGCTGCC
2581 ATCATGGTTCGACCATTGAACTGCATCGTCGCCGTGTCCCAAATATGGGGATTGGCAAG
2641 AACGGAGACCTACCCTGGCCTCCGCTCAGGAACGAGTTCAAGTACTTCCAAAGAATGACC
2701 ACAACCTCTTCAGTGGAAGGTAAACAGAATCTGGTGATTATGGGTAGGAAAACCTGGTTC
2761 TCCATTCTTGAGAAGAATCGACCTTTAAAGGACAGAATTAATATAGTTCTCAGTAGAGAA
2821 CTCAAAGAACCACCACGAGGAGCTCATTTTCTTGCCAAAAGTTTGGATGATGCCTTAAGA
2881 CTTATTGAACAACCGGAATTGGCAAGTAAAGTAGACATGGTTTGGATAGTCGGAGGCAGT
2941 TCTGTTTACCAGGAAGCCATGAATCAACCAGGCCACCTCAGACTCTTGTGACAAGGATC
3001 ATGCAGGAATTTGAAAGTGACACGTTTTTCCCAGAAATTGATTGGGGAAATATAAACTT
3061 CTCCCAGAATACCCAGGCGTCCTCTCTGAGGTCCAGGAGGAAAAAGGCATCAAGTATAAG
3121 TTTGAAGTCTACGAGAAGAAAGACTAACAGGAAGATGCTTTCAAGTTCTCTGCTCCCCTC
3181 CTAAAGCTATGCATTTTTTATAAGACCATGGGACTTTTGCTGGCTTTAGATCTTTGTGAAG
3241 GAACCTTACTTCTGTGGTGTGACATAATTGGACAACTACCTACAGAGATTTAAAGCTCT
3301 AAGGTAAATATAAAATTTTTAAGTGTATAATGTGTTAACTACTGATTCTAATTGTTTGT
3361 GTATTTTAGATTCCAACCTATGGAAGTGAATGGGAGCAGTGGTGGAAATGCCTTTAAT
3421 GAGGAAAACCTGTTTTGCTCAGAAGAAATGCCATCTAGTGATGATGAGGCTACTGCTGAC
3481 TCTCAACATTCTACTCCTCCAAAAAGAAGAGAAAGGTAGAAGACCCCAAGGACTTTCCT
3541 TCAGAATTGCTAAGTTTTTTGAGTCATGCTGTGTTTAGTAATAGAACTCTTGCTTGCTTT
3601 GCTATTTACACCACAAAGGAAAAAGCTGCACTGCTATACAAGAAAATTATGGAAAAATAT
3661 TCTGTAACCTTTATAAGTAGGCATAACAGTTATAATCATAACATACTGTTTTTTCTTACT
3721 CCACACAGGCATAGAGTGTCTGCTATTAATAACTATGCTCAAAAATTGTGTACCTTTAGC
3781 TTTTAAATTTGTAAAGGGTTAATAAGGAATATTTGATGTATAGTGCCTTGACTAGAGAT
3841 CATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCACACCT
Mun I
3901 CCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGC
3961 TTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTCACAAATAAAGCATTTTTTTTC
4021 ACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCTA
4081 ATAAAAGATATTTATTTTCATTAGATATGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCAGTGCCTCTAT
4141 CTGGAGGCCAGGTAGGGCTGGCCTTGGGGGAGGGGGAGGCCAGAATGACTCCAAGAGCTA

33/4. ábra

4201 CAGGAAGGCAGGTCAGAGACCCCACTGGACAAACAGTGGCTGGACTCTGCACCATAACAC
EcoR I
4261 ACAATCAACAGGGGAGTGAGCTGGAAATTTGCTAGCGAATTCcagcacactggcgggccgt
(Spe I)
4321 tACTAGTTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTT
4381 CCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCC
4441 ATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACG
4501 TCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATAT
4561 GCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCA
SnaB I
4621 GTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTAT
4681 TACCATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACG
4741 GGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCA
4801 ACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCG
4861 TGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAG
4921 ACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGG
4981 CCGGGAACGGTGCAATTGGAACGCGGATTCCCCGTGCCAAGAGTGACGTAAGTACCGCCTA
5041 TAGAGTCTATAGGCCACCCCTTGGCTTCTTATGCATGCTATACTGTTTTTGGCTTGGG
Bpu1102I
5101 GTCTATACACCCCGCTTCCTCATGTTATAGGTGATGGTATAGGCTTAGCCTATAGGTGTG
Xcm I
5161 GGTATTGACCATTATTGACCACTCCCCIATTGGTGACGATACTTTCCATTACTAATCCA
5221 TAACATGGCTCTTTGCCACAACCTCTCTTTATTGGCTATATGCCAATACACTGTCCTTCAG
5281 AGACTGACACGGACTCTGTATTTTTACAGGATGGGGTCTCATTTATTATTACAAATTCA
5341 CATATACAACACCACCGTCCCCAGTGCCCGCAGTTTTTTATTAAACATAACGTGGGATCTC
BspE I
5401 CACGCGAATCTCGGGTACGTGTTTCCGGACATGGGCTCTTCTCCGGTAGCGGCGGAGCTTC
5461 TACATCCGAGCCCTGCTCCCATGCCTCCAGCGACTCATGGTCGCTCGGCAGCTCCTTGCT
5521 CCTAACAGTGGAGGCCAGACTTAGGCACAGCACGATGCCACCACCACAGTGTGCCGCA
5581 CAAGGCCGTGGCGGTAGGGTATGTGTCTGAAAATGAGCTCggggagcgggcttgaccgc
(Pvu II)
5641 tgacgcatttggaagacttaaggcagcggcagaagaagatgcaggccagctgagttgtgtgt
5701 gttctgataagagtcagaggtaactcccgttgcggtgctgttaacggtggagggcagtg
5761 agtctgagcagtaactcgttgctgcccgcgcgcgccaccagacataatagctgacagactaa
Mlu I
5821 cagactgttcctttccatgggtcttttctgcagtcaccgtccttgacACGCGTCTCGGGA

40/43

33/5. ábra

Hind III

5881 AGCTTGCCGCCACCATGGACTGGACCTGGCGCGTGTGTTTGCCTGCTCGCCGTGGCTCCTG
M D W T W R V F C L L A V A P

5941 GGGCCACAGCCAGGTGCAACTGGTGCAGTCCGGCGCCGAAGTGAAGAAACCCGGTGCTT
G A H S Q V Q L V Q S G A E V K K P G A
(Pvu II) (Spe I)

6001 CCGTGAAAGTCAGCTGTAAACTAGTAGATACACCTTCACTGAATACACCATACTGGG
S V K V S C K T S R Y T F T E Y T I H W
Msc I CDR 1

6061 TTAGACAGGCCCTTGGCCAAAGGCTGGAGTGGATAGGAGGTATTAATCCTAACAATGGTA
V R Q A P G Q R L E W I G G I N P N N G

6121 TTCCTAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCCGGCCACCTTGACCGTAGGCAAGTCTGCCA
I P N Y N Q K F K G R A T L T V G K S A
CDR 2

6181 GCACCGCCTACATGGAAGTGTCCAGCCTGCGCTCCGAGGACACTGCAGTCTACTACTGCG
S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C

6241 CCAGAAGAAGAATCGCCTATGGTTACGACGAGGGCCATGCTATGGACTACTGGGGTCAAG
A R R R I A Y G Y D E G H A M D Y W G Q
CDR 3 BamH I

6301 GAACCCTTGTACCGTCTCCTCAGGTGAGTGGATCCTCTGCGCCTGGGCCCAGCTCTGTC
G T L V T V S S

6361 CCACACGCGGTACATGGCACCACCTCTCTTGCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCT
S T K G P S V

6421 TCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGG
F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L
Age I

6481 TCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCG
V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S

6541 GCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGG
G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V
BstE II

6601 TGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC
V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K

6661 CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACAT
P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T

6721 GCCCACCCTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAA
C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P

6781 AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACG
K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D

6841 TGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA
V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H

6901 ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCC
N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V

FH

33/6. ábra

6961 TCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACA
L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N

7021 AAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC
K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E

7081 CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGA
P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L

7141 CCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC
T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G

7201 AGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC
Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F

7261 TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCT
L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C

7321 CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P
Ngom I

7381 GTAAATGAGTGCAGCGCCCGCAAGCCCCGCTCCCCGGGCTCTCGCGGTGCGACGAGGAT
G K *

7441 GCTTGGCACGTACCCCCTGTACATACTTCCCGGGCGCCCAGCATGGAAATAAAGCACCGG

7501 ATCTAATAAAAGATATTTATTTTCATTAGATATGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGCAGTGCC

7561 TCTATCTGGAGGCCAGGTAGGGCTGGCCTTGGGGGAGGGGAGGCCAGAATGACTCCAAG

7621 AGCTACAGGAAGGCAGGTGAGAGACCCCACTGGACAAACAGTGGCTGGACTCTGCACCAT

7681 AACACACAATCAACAGGGGAGTGAGCTGGaaatttgctagcgaattaattc 7731

34A. ábra

INTRON

3' -vég V gén ----- CH1 5' -vége

ACC GTC TCC TCA G::GTGAGTGGATCC-(N)₄₈-CCTCTCTTGCAG::CC-

T V S S *splice donor hely* BamHI *splice akceptor hely*

-TCC ACC AAG GGC

S T K G

⇓

ACC GTC TCC TCA G:::CC TCC ACC AAG GGC

T V S S S T K G

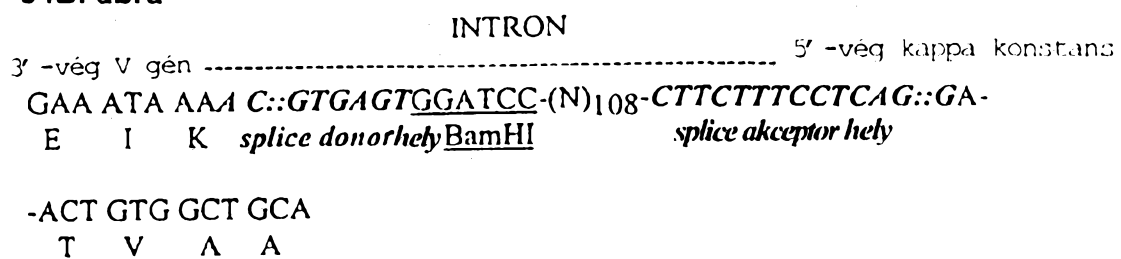
⇓

ACC GTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG GGC

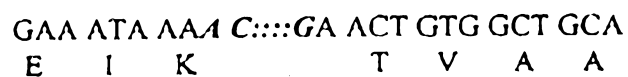
T V S S A S T K G

42/43

34B. ábra



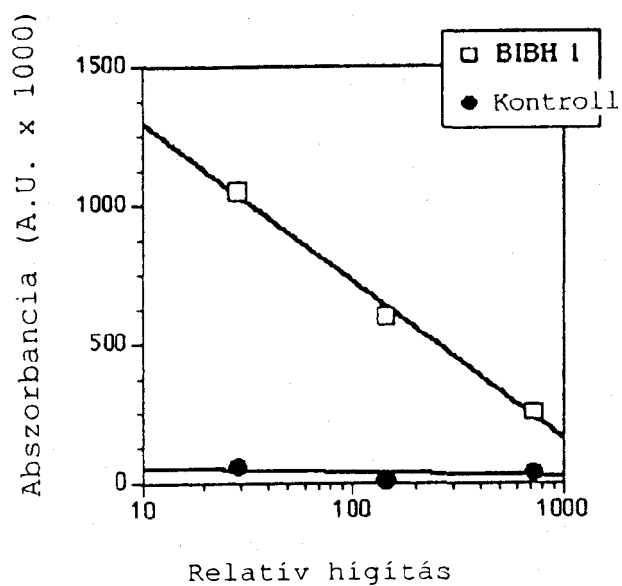
↓



↓

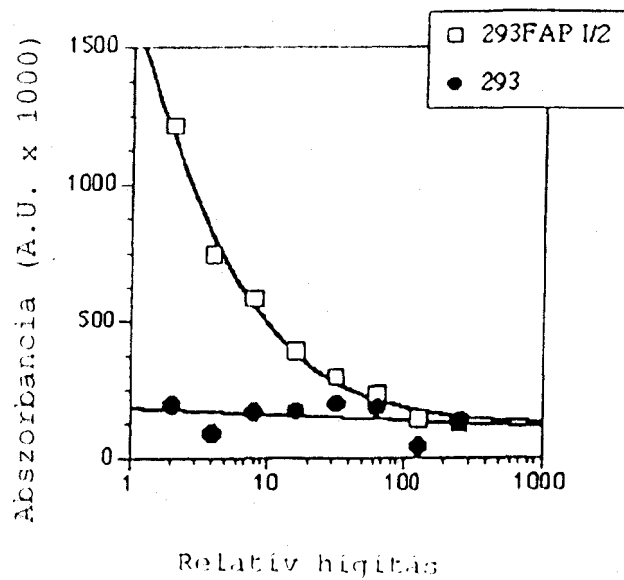


35. ábra



5/1

36. ábra



37. ábra

