



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: **94-01794**

(61) Perfecționare la brevet:
Nr.

(22) Data de depozit: **07.05.1993**

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(30) Prioritate: **08.05.1992 GB 9209993.6;**

(86) Cerere internațională PCT:
Nr. **GB 93 / 00943 07.05.1993**

(41) Data publicării cererii:
BOPI nr.

(87) Publicare internațională:
Nr. **WO 93/23542 25.11.1993**

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
28.06.2002 BOPI nr. **6/2002**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
WO 86/00835; 90/11086

(45) Data eliberării și publicării brevetului:
BOPI nr.

(71) Solicitant: **THE BIOTECHNOLOGY AND BIOLOGICAL SCIENCES-RESEARCH COUNCIL (BBSRC),
BABRAHAM, CAMBRIDGE CB 4T, GB;**

(73) Titular: **THE BIOTECHNOLOGY AND BIOLOGICAL SCIENCES-RESEARCH COUNCIL (BBSRC),
BABRAHAM, CAMBRIDGE CB 4T, GB;**

(72) Inventatori: **GRAHAM MARGARET, LINTON, CAMBRIDGE CB1 6XQ, GB; SMITH TREVOR STANLEY,
LINTON, CAMBRIDGE CB1 6UQ, GB; MUNN EDWARD ALBERT, FULBOURN, CAMBRIDGE CB1
5ES, GB; KNOX DAVID PATRICK, COCKENZIE H32 OJD, GB; OLIVER JOANNA JANE,
EDINBURG EH11 1LG, GB; NEWTON SUSAN ELIZABETH, STRATHMORE, VICTORIA, AU;**

(74) Mandatar: **ROMINVENT S.A., BUCUREȘTI;**

(54) **POLIPEPTIDE SINTETICE AVÂND ACTIVITATE DE ENZIMĂ
AMINOPEPTIDAZICĂ, MOLECULE DE ACID NUCLEIC CE LE CODIFICĂ,
PROCEDEU DE PREPARARE ȘI COMPOZIȚIE DE VACCIN CU ACESTE
POLIPEPTIDE**

(57) **Rezumat:** Invenția se referă la polipeptide sintetice care conțin o secvență de aminoacizi având activitate de enzimă aminopeptidazică sau o porțiune antigenică a acesteia, la molecule de acid nucleic care codifică polipeptidele. la un procedeu de preparare a polipeptidelor sintetice

și la o compoziție de vaccin pentru stimularea răspunsurilor imune împotriva paraziților helminți.

Revendicări: 9
Figuri: 21

RO 117709 B1



Invenția de față se referă la polipeptide sintetice având activitate de enzimă amino-peptidazică, la molecule de acid nucleic ce le codifică, la un procedeu de preparare a acestor polipeptide sintetice și la o compoziție de vaccin cu acestea, destinată stimulării răspunsurilor imune împotriva infestării cu paraziți helmintici și tratării bolilor date de aceștia.

5 Este cunoscut că helminții sunt responsabili pentru o gamă largă de boli și infestări ale animalelor domestice, ducând la pierderi de producție și chiar la mortalitatea animalelor, având astfel o importanță economică considerabilă. Astfel, de exemplu, hematodul *Haemonchus*, care se hrănește cu sânge, infectează mucoasa tractului gastrointestinal al rumegătoarelor, producând anemie și pierdere de greutate, și dacă nu este tratat, duce frec-

10 vent la moarte. Animalele infectate cu hematodul înrudit *Ostertagia*, care nu se hrănește cu sânge, în mod similar, își pierd condiția bună și pot muri dacă nu sunt tratate.

Alte genuri de helminți de importanță economică includ *Trichostrongylus* și *Nematodirus*, care produc enterite la diverse animale și trematodele.

15 De asemenea, cauzează probleme nematodele precum, de exemplu, *Necator*, *Ancylostoma*, *Uncinaria* și *Bunostomum* sp. și gălbezele (de exemplu, *Fasciola*, *Paramphistomum* și *Dicrocoelium*), care pe lângă rumegătoare și câini domestici, infectează oameni, adesea cu rezultate fatale.

Combaterea paraziților helminți în prezent, apelează inițial la utilizarea medicamentelor antihelmintice combinată cu pășunatul dirijat. Astfel de tehnici au totuși numeroase dezavantaje. Administrarea medicamentelor și pășunatul dirijat sunt adesea nepractice și au determinat apariția și răspândirea de helminți rezistenți la medicamente.

20 În acest domeniu există necesitatea unui vaccin antihelmintic eficient, depunându-se numeroase eforturi în acest sens în anii din urmă. Cu toate acestea, încă nu sunt accesibile comercial vaccinuri moleculare sau sub-elemente pentru majoritatea speciilor de helminți în special pentru nematodele gastrointestinale ale rumegătoarelor, precum *Haemonchus* și *Ostertagia*.

Cele mai promițătoare rezultate până în prezent, s-au obținut cu proteine noi, izolate de la *Haemonchus*, care au potențial ca antigeni de protecție nu numai față de *Haemonchus*, ci, de asemenea, împotriva unei game de alți helminți.

30 În particular, proteina dublez H110D, găsită la suprafața lumenului intestinal la *H. contortus*, s-a dovedit a conferi imunitate protectoare contra hemoncozei la oi.

H110D de la *H. contortus* are o greutate moleculară aproximativă de 110 kilodaltoni (kD) în condiții reduse sau nereduse, cum s-a definit prin SDS-PAGE și este descrisă în WO 88/00835 și 90/11086. Termenul "H110D", așa cum s-a folosit aici, se referă la proteina dublet H 11 OD, cum s-a definit în WO 88/00835 și 90/11086.

35 Proteine corespunzătoare au fost recent găsite în alte specii de helminți, de exemplu, *Necator americanus*.

Pentru purificarea de H110D, în WO 88/00835 au fost descrise un număr de metode care pot fi considerate suficiente pentru caracterizarea proteinei și pot fi apreciate ca permi-

40 tând producerea proteinei în cantități utile experimental și comercial. Totuși, există posibilitatea unei îmbunătățiri și a unei surse convenabile de la care să se prepare nu numai H110D ci, de asemenea, proteina antigenică înrudită, în special nevoia pentru un procedeu bazat pe tehnologia ADN recombinant și expresia proteinei în organisme procariote sau eucariote, transferate corespunzător.

45 Polipeptidele sintetice având activitate de enzimă aminopeptidazică sau o porțiune antigenică a acesteia, conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că acestea corespund total sau parțial secvențelor nucleotidice conform fig. 2, 3, 4 sau 5 (Secv. ID Nr. 1 la 15 și respectiv 19 la 21), sau unei variante echivalente funcțional a

RO 117709 B1

acestora, alta decât o polipeptidă sintetică corespunzătoare dubletului proteic H11D, sau unei polipeptide sintetice, aleasă dintre:	50
a) Met Gly Tyr Pro Val Val Lys Val Glu Glu Phe	
b) Met Gly Phe Pro Val Leu Thr Val Glu Ser	
c) Met Gly/Phe Asn Phe Lys Ile Glu/Val Thr/Glu Ala Gly	
d) Met Lys Pro/Glu Thr/Val Lys Asp/Ala Thr/Lys Leu - Ile Thr	
e) Met Leu Ala Leu Asp Tyr His Ser-Phe Val	55
f) Met Leu Ala Glu/Tyr Asp Gln/Ala Glu Asp Val	
g) Met Gly Phe Pro Leu Val Thr Val Glu Ala Phe Tyr	
h) Met Lys Thr Pro Glu Phe Ala Val/Leu Gln Ala Phe/Thr Ala Thr Ser/Gly Phe Pro	
i) Lys His/Tyr Asn/Val Ser Pro Al Ala Glu Asn/Leu Leu Asn/Gly	
j) Lys-Thr Ser Val Ala Glu Ala Phe Asn	60
k) Lys Ala Ala Glu Val Ala Glu Ala Phe Asp - Ile - - Lys Gly	
l) Lys Ala Val Glu Val/Pro Ala Glu Ala Phe Asp Asp Ile Thr Tyr - - Gly Pro Ser	
m) Lys - Glu Glu Thr Glu Ile Phe Asn Met	
n) Lys - - - Pro Phe Asn/Asp Ile Glu Ala Leu	
o) Asp Gln Ala Phe Ser Thr Asp Ala Lys	65
p) Met Gly Tyr Pro Val Val Lys Val Glu Glu Phe - Ala Thr Ala Leu	
q) Met Gly Phe Pro Val Leu Thr Val Glu Ser - Tyr? - Thr	
r) Met Glu/Phe Asn Phe Leu Ile Glu/Val Thr/Glu Ala Gly - Ile Thr	
s) Met Gly Phe Leu Val Thr Val Glu Ala Phe Tyr - Thr Ser	
t) Met Lys Thr Pro Glu Phe Ala Val/Leu Gln Ala Phe/Thr Ala Thr Ser/Gly Phe Pro	70
u) Met Lys Pro/Glu Thr/Val Leu Asp/Ala Thr/Lys Leu - Ile Thr - Gly	
v) Met Leu Ala Leu Asp Tyr His Ser - Phe Val Gly?	
w) Met Leu Ala Glu/Tyr Asp Gln/Ala Glu Asp Val	
x) Lys His/Tyr Asn/Val Ser Pro Ala Ala glu Asn/Leu Leu Asn/Gly	
y) Lys - Thr Ser Val Ala Glu Ala Phe Asn	75
z) Lys Ala Ala Glu Val Ala Glu Ala Phe Asp - Ile - - Lys Gly	
aa) Lys Ala Val Glu Val/Pro Ala Glu Ala Phe Asp Asp Ile Thr? Tyr - - Gly Pro Ser	
bb) Lys - Glu Glu Thr Glu Ile Phe Asn Met	
cc) Lys - - - Pro Phe Asn/Asp Ile Glu Ala Leu	
dd) Asp Gln Ala Phe Ser Thr Asp Ala Lys	80

Moleculele de acid nucleic, conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că acestea cuprind una sau mai multe secvențe nucleotidice, care codifică enzime aminopeptidazice helmintice sau porțiuni antigenice ale acestora, corespunzătoare secvențelor nucleotidice din fig. 2, 3, 4 sau 5 (Secv. ID. Nr. 1 la 15 și 19 la 21, respectiv) sau unei porțiuni a acestora, sau secvențe care codifică enzime aminopeptidazice helmintice care au o identitate de secvențe de 50% sau mai mult, cu acestea, sau care hibridizează cu oricare dintre secvențele menționate, în condiții de $2 \times (0,15\text{M NaCl}, 0,015\text{M citrat de sodiu}, \text{pH } 7,2)$ la temperatura camerei.

Procedeele de preparare a polipeptidelor sintetice, conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că acesta cuprinde:

- clonarea vectorilor care conțin secvențele nucleotidice conform invenției, împreună cu un promotor și/sau amplificator și, eventual, un marker potrivit, cum ar fi o genă care codifică pentru dihidrofolat-reductaza sau glutamin-sintetaza;

- introducerea vectorilor în celule gazdă procariote sau eucariote, preferabil în sisteme de expresie eucariote nematodice sau mamaliene, folosind fosfat de calciu, dextran DEAE, polipren, prin fuziune protoplastică, cu lipozomi, prin microinjectarea directă, țintirea genei sau electroporarea, preferabil prin electroporare;

- cultivarea sistemului procariot sau eucariot astfel obținut, în condiții care permit expresia polipeptidelor;

- recuperarea polipeptidelor astfel produse.

Compoziția de vaccin pentru stimularea răspunsurilor imune împotriva paraziților helmintici, conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că aceasta cuprinde cel puțin o polipeptidă sintetică, ce cuprinde o secvență a aminoacizilor care constituie o enzimă aminopeptidazică sau o porțiune antigenică a acesteia, sau un virus sau o celulă gazdă având inserată o moleculă de acid împreună cu un purtător acceptabil farmaceutic.

Prezenta invenție are următoarele avantaje:

- polipeptidele sintetice care cuprind secvența de aminoacizi ce constituie o enzimă aminopeptidazică sau o porțiune a acesteia reprezintă secvențe antigenice protectoare, prin generarea anticorpilor care sunt capabili să inhibe funcția metabolică a parazitului;

- se asigură o reducere a formei native a epitopilor protectori ai antigenului.

Invenția prezintă încercă să asigure o astfel de procedură, îmbunătățită. S-a realizat determinarea secvenței pentru cADN-urile pentru H110D de la *Haemonchus contortus*, și s-a constatat că secvențele aminoacide prezintă omologie cu o familie de aminopeptidaze de membrană integrală (nume sistematic: aminoacilpeptidhidrolaza (microzomală)).

Aminopeptidazele de membrană integrală sunt localizate la mamifere în câteva țesuturi, de exemplu, pe microvilozitățile marginale ale intestinelor și rinichilor. Rolul lor în rinichi este neclar, dar în intestin, funcția lor este de a cliva peptidele mici, care sunt produse finale ale digestiei (vezi, Kennry & Maroux, 1982; Kenny & Turner, 1987; Noren și colab., 1986; Semenza, 1986).

Într-unul din aspectele invenției de față, se asigură moleculele de acid nucleic care conțin una sau mai multe secvențe nucleotidice care codifică enzime aminopeptidaze helmintice sau porțiuni antigenice ale acestora, corespunzând substanțial secvențelor nucleotidice integrate sau unei porțiuni a lor, așa cum se arată în fig. 2, 3, 4, sau 5 (Secv. ID Nr. 1 la 15), sau secvențele care codifică pentru enzime aminopeptidaze helmintice, care sunt substanțial omoloage cu, sau care hibridizează cu oricare dintre numitele secvențe.

Variații din secvențele nucleotidice care codifică aminopeptidaza se pot întâlni în cadrul unei specii, în diferite stadii ale ciclului de viață al unui helminț (de exemplu, stadiul larvar și de adult), între tulpini similare, de origine geografică diferită, și, de asemenea, în același helminț. Asemenea variații sunt incluse în cuprinsul acestei invenții.

"Substanțial omolog", așa cum s-a folosit aici, include acele secvențe care au o identitate de secvență de aproximativ 50% sau mai mare, de exemplu, 60% sau mai mare și, de asemenea, variante alelice echivalente funcțional și secvențe înrudite, modificate prin substituții, aditii și/sau deleții de o bază sau de multiple baze. Prin "echivalent funcțional" se înțeleg secvențe se acid nucleic care codifică polipeptidele cu activități aminopeptidazice, care sunt imunoreactive în mod similar, respectiv cele care provoacă la gazdă anticorpi de protecție împotriva helminților.

Molecule de acid nucleic, care hibridizează cu secvențele prezentate în fig. 2, 3, 4 sau 5 (compuși ai Secv. ID Nr. 1 la 15), sau oricare altele substanțial omoloage, sau secvențe echivalente funcțional cum s-a definit mai sus, sunt, de asemenea, incluse în cuprinsul invenției.

Termenul "hibridizare", așa cum s-a folosit aici, definește acele secvențe care se leagă în condiții de nonstringență (6 x SSC/50% formamidă, la temperatura camerei) și s-au spălat în condiții de joasă stringență, de exemplu, 2 x SSC, 42°C) sau condiții de înaltă stringență, de exemplu, 2 x SSC, 65°C (unde SSC=0,15M, NaCl, 0,015 M citrat de sodiu, pH 7,2).

Metode pentru producerea de astfel de secvențe derivate înrudite, de exemplu, mutageneza direct în sit, mutageneza aleatorie sau clivaj enzimatic și/sau ligare de acizi nucleici, sunt binecunoscute în domeniu, ca și metodele pentru a determina când acidul nucleic astfel modificat are omologie semnificativă, de exemplu, prin hibridizare. 150

Prevederea unei molecule de acid nucleic, conform invenției, permite astfel să se obțină, în cantități până acum inaccesibile, enzime aminopeptidazice recombinante, sau fragmente imunogene ale acestora, permițând prin urmare dezvoltarea vaccinurilor antihelmint. 155

Într-un alt aspect al invenției de față, se asigură molecule de acid nucleic care conțin una sau mai multe secvențe nucleotidice care codifică una sau mai multe polipeptide capabile să provoace anticorpi de protecție împotriva paraziților helminți, secvențe care încorporează una sau mai multe regiuni care codifică aminopeptidaze, cum sunt cele din fig. 2, 3, 4 sau 5 (compuse la Secv. ID Nr 1 la 15).

Prezenta invenție se extinde, de asemenea, la polipeptide sintetice, care cuprind una sau mai multe secvențe aminoacide, care constituie o enzimă aminopeptidazică sau porțiuni antigenice ale acesteia, substanțial corespunzătoare secvențelor nucleotidice în întregime sau unei porțiuni a secvențelor precum cele arătate în fig. 2, 3, 4 sau 5 (Secv. ID Nr. 1 la 15), sau unei variante funcțional echivalente a acestora, alta decât o polipeptidă corespunzătoare proteinei dublet H 11 OD sau o polipeptidă sintetică, corespunzătoare oricăreia dintre secvențele polipeptidice individuale, descrise în **WO 90/11086**. 160 165

Alternativ, invenția asigură, de asemenea, polipeptide sintetice care conțin o secvență aminoacidică care constituie o enzimă aminopeptidazică sau o porțiune antigenică a acesteia, corespunzătoare, în principal, unor secvențe nucleotidice în totalitate sau unei porțiuni a acestor secvențe, precum cele prezentate în fig. 2, 3, 4 sau 5 (Secv. ID Nr.: 1 la 15) sau unei variante echivalent funcționale a acestora, în principal fără alte componente, de la *Haemonchus contortus*. 170

În plus, invenția se extinde la compoziții de vaccinuri pentru stimularea răspunsurilor imune împotriva paraziților helminți la om sau animal, cuprinzând cel puțin o polipeptidă sintetică cum s-a definit mai sus, împreună cu un purtător farmaceutic acceptabil. 175

Publicația **WO 90/11086** dezvăluie un număr de secvențe polipeptidice obținute prin digestie proteolitică sau clivaj chimic al proteinei dublet H110D, care urmează:

- a) Met Gly Tyr Pro Val Val Lys Val Glu Glu Phe
- b) Met Gly Phe Pro Val Leu Thr Val Glu Ser
- c) Met Gly/Phe Asn, Phe, Lys, Ile, Glu/Val, Thr/Glu Ala Gly 180
- d) Met Lys Pro/Glu Thr/Val Lys Asp/Ala Thr/Lys Leu - Ile Thr
- e) Met Leu Ala Leu Asp Tyr His Ser-Phe Val
- f) Met Leu Ala Glu/Tyr Asp Gln/Ala Glu Asp Val
- g) Met Gly Phe Pro Leu Val Thr Val Glu Ala Phe Tyr
- h) Met Lys Thr Pro Glu Phe Ala Val/Leu Gln Ala Phe/Thr Ala Thr Ser/Gly Phe Pro 185
- i) Lys His/Tyr Asn/Val Ser Pro Ala Ala Glu Asn/Leu Leu Asn/Gly
- j) Lys-Thr Ser Val Ala Glu Ala Phe Asn
- k) Lys Ala Ala Glu Val Ala Glu Ala Phe Asp - Ile - - - Lys Gly
- l) Lys Ala Val Glu Val/Pro Ala Glu Ala Phe Asp Asp Ile Thr? Tyr - - Gly Pro Ser
- m) Lys - Glu Glu Thr Glu Ile Phe Asn Met 190
- n) Lys - - - Pro Phe Asn/Asp Ile Glu Ala Leu
- o) Asp Gln Ala Phe Ser Thr Asp Ala Lys
- p) Met Gly Tyr Pro Val Val Lys Val Glu Glu Phe-Ala Thr Ala Leu
- q) Met Gly Phe Pro Val Leu Thr Val Glu Ser - Tyr? - Thr
- r) Met Glu/Phe Asn Phe Leu Ile Glu/Val Thr/Glu Ala Gly - Ile Thr 195
- s) Met Gly Phe Leu Val Thr Val Glu Ala Phe Tyr - Thr Ser

- t) Met Lys Thr Pro Glu Phe Ala Val/Leu Gln Ala Phe/Thr Ala Thr Ser/Gly Phe Pro
 u) Met Lys Pro/Glu Thr/Val Leu Asp/Ala Thr/Lys Leu - Ile Thr - Gly
 v) Met Leu Ala Leu Asp Tyr His Ser - Phe Gly?
 200 w) Met Leu Ala Glu/Tyr Asp Gln/Ala Glu Asp Val
 x) Lys His/Tyr Asn/Val, Ser Pro Ala Ala Glu Asn/Leu Leu Asn/Gly
 y) Lys - Thr Ser Val Ala Glu Ala Phe Asn
 z) Lys Ala Ala Glu Val Ala Glu Ala Phe Asp - Ile - - - Lys Gly
 aa) Lys Ala Val Glu Val/Pro Ala Glu Ala Phe Asp Asp Ile Thr? Tyr - - Gly Pro Ser
 205 bb) Lys - Glu Gln Thr Glu Ile Phe Asn Met
 cc) Lys - - - Pro Phe Asn/Asp Ile Glu Ala Leu
 dd) Asp Gln Ala Phe Ser Thr Asp Ala Lys

210 Incertitudinile sunt prezentate sub forma Phe/Gly, unde primul cod de trei litere reprezintă cel mai corect aminoacid bazat pe lungimea semnalului, sau printr-un semn de întrebare; un semn "-" semnifică un rest necunoscut.

Secvențele polipeptidice individuale, specifice, care sunt descrise în **WO 90/11086**, nu sunt revendicate.

215 Termenul "polipeptidă", așa cum s-a folosit aici, include atât proteina cu lungime completă, cât și secvențele peptidice mai scurte.

"Echivalentul funcțional", cum s-a folosit mai sus în legătură cu secvențele aminoacide polipeptidice, definește polipeptide înrudite la, sau derivate de la secvențele polipeptidice menționate mai sus, unde secvența aminoacidă a fost modificată prin substituție, adăuție sau deleție a unui singur sau mai multor aminoacizi și, de asemenea, secvențele unde aminoacizii au fost modificați chimic, inclusiv prin glicozilare sau deglicozilare, dar care, cu toate acestea, mențin activitatea antigenică protectoare (imunogenitatea). Asemenea variații echivalente funcțional pot fi întâlnite ca variații biologice naturale sau pot fi preparate folosind tehnici cunoscute, de exemplu, polipeptide recombinante, echivalente funcțional, pot fi preparate prin tehnici cunoscute de mutagenază direct *in situs*, mutageneze aleatorii sau clivaj enzimatic și/sau ligare de aminoacizi.

225 În general, polipeptidele sintetice, conform invenției, reprezintă secvențe antigenice protectoare. Termenul "antigen protector", cum s-a folosit aici, definește acei antigeni capabili să genereze un răspuns imun, de protejare a gazdei (imunogenic), adică un răspuns al gazdei la generarea de molecule producătoare de imunitate, anticorpi sau celule care sterilizează fecunditatea, dăunează, inhibă sau omoară și, ca urmare, "protejează" gazda de boală clinică sau subclinică și inhibă producerea ouălor. Un astfel de răspuns imun se poate manifesta de obicei prin generarea anticorpilor care sunt capabili să inhibe funcția metabolică a parazitului, ducând la împiedicarea producerii de ouă și/sau moarte.

235 Polipeptidele sintetice, conform acestui aspect al invenției, pot fi preparate prin expresie într-o celulă gazdă care conține o moleculă de ADN recombinant care cuprinde o secvență nucleotidică cum a fost descrisă mai sus, legată opțional la o secvență de control al expresiei, sau un vehicul care clonează ADN recombinant sau un vector conținând o astfel de moleculă ADN recombinant.

240 Alternativ, polipeptidele pot fi exprimate prin injectarea directă a moleculei de ADN neacoperit, conform invenției, într-o celulă gazdă.

245 Polipeptida sintetică astfel exprimată poate fi o fuziune polipeptidică cuprinzând o porțiune care prezintă imunogenitatea unei enzime aminopeptidazice în totalitate, sau a unei porțiuni a ei, și o polipeptidă suplimentară, codificată de către ADN-ul moleculei recombinante, fuzionată cu aceasta. De exemplu, este de dorit să se producă o fuziune proteică care să cuprindă o aminopeptidază sintetică sau altă polipeptidă conform invenției, cuplată la o

proteină precum β -galactozidaza, fosfataza, glutation-S-transferaza, ureează corpul central al antigenului hepatitei B (Francis și colab. 1989) și altele asemenea. Majoritatea fuziunilor proteice sunt formate prin expresia unei gene recombinante, în care două secvențe de codare au fost legate împreună cu cadrele de citire în fază. Alternativ, polipeptidele pot fi legate *in vitro*, prin mijloace chimice. Toate aceste fuziuni sau hibrizi derivați ai moleculelor de acid nucleic, care codifică aminopeptidază, și secvențele lor aminoacide respective sunt cuprinse în invenția de față. Astfel, tehnici corespunzătoare expresiei ADN-ului recombinat și polipeptidelor sunt descrise, de exemplu, în Sambrook și colab., 1989. Alternativ, polipeptidele sintetice pot fi produse prin mijloace chimice, precum binecunoscuta procedură de sinteză în fază solidă, Merrifield.

Un aspect în plus al invenției include utilizarea unei compoziții de vaccin pentru stimularea răspunsurilor imune la om sau, de preferință, la un animal mamifer, împotriva infecției cu parazit helmint.

Privind alternativ, invenția asigură, de asemenea, o metodă de stimulare a unui răspuns imun, la un om sau animal, de preferință mamifer, împotriva unei infecții cu parazit helmint, cuprinzând administrarea, la animalul menționat, a compoziției de vaccin care conține una sau mai multe polipeptide codificate de către o secvență nucleotidică, cum s-a definit mai sus.

O compoziție de vaccin poate fi preparată, conform invenției, prin metode bine cunoscute în domeniul producerii vaccinurilor.

Formulări tradiționale de vaccin pot cuprinde una sau mai multe polipeptide sintetice, conform invenției, împreună, când este necesar, cu unul sau mai mulți adjuvanți corespunzători, de exemplu, hidroxid de aluminiu, saponină, QuilA, sau mai multe forme purificate ale acestora, dipeptidă muramil, uleiuri minerale sau Novasomes, în prezența unuia sau a mai multor purtători sau diluanți acceptabili farmaceutic. Purtătorii adecvați includ medii lichide, precum soluție salină corespunzătoare utilizării ca vehicule pentru introducerea peptidelor sau polipeptidelor la un pacient. Pot fi incluși componenți suplimentari, precum conservanți.

O formulare alternativă de vaccin poate cuprinde un virus sau o celulă gazdă, de exemplu, un microorganism (de exemplu, virusul vaccinia, adenovirus, *Salmonella*) având inserată o moleculă de acid nucleic (de exemplu, o moleculă de ADN) conform acestei invenții, pentru stimularea unui răspuns imun orientat împotriva polipeptidelor codificate de către molecula inserată de acid nucleic.

Administrarea compoziției de vaccin se poate face prin oricare din căile convenționale, de exemplu oral sau parenteral, cum ar fi injecție intramusculară, opțional, la intervale, de exemplu, două injecții la un interval de 7...28 zile.

Așa cum s-a menționat mai sus, translarea aminoacizilor secvențelor nucleotidice figurate în fig. 2, 3, 4 sau 5 arată omologie de secvență cu o familie de enzime membranare aminopeptidaze integrate. Aceasta s-a determinat prin cercetarea a diferite baze de date accesibile în *Genetics Computer Groups Sequence analysis software package*, versiunea 7.01 noiembrie 1991 (Devereaux și colab., 1984), folosind translările secvențelor din fig. 2, 3, 4 sau 5. În fig. 6 s-au prezentat două astfel de comparații.

Expresia secvențelor care codifică aminopeptidaza conform invenției, așa cum s-a menționat mai sus, poate fi realizată folosind o gamă de tehnici și sisteme de expresie cunoscute, incluzând expresia în celule procariote ca *E.coli* și celule eucariote, precum drojdii sau sistemul celulă de insectă-baculovirus, sau celule transformate de mamifere și în animale și plante transgenice. Secvențele nucleotidice pot fi exprimate în mod deosebit de avantajos, folosind sistemul nematodei transgenice, cum ar fi sistemul pentru nematodă, *Caenorhabditis* descrise în exemplul în Fire, (1986); Fire și colab., (1989); Spieth și colab., (1988); Han și colab., (1990).

295 Un aspect suplimentar al invenției asigură o metodă pentru prepararea unei polipeptide sintetice, cum s-a definit mai sus, care cuprinde cultivarea unei celule eucariote sau procariote care conține o moleculă de acid nucleic, cum s-a definit mai sus, în condiții în care polipeptida menționată este exprimată, și recuperarea polipeptidei astfel produsă.

300 Aspecte în plus ale invenției includ astfel clonarea și expresia vectorilor care conțin secvențele nucleotidice conform invenției. Astfel de vectori de expresie includ secvențe de control corespunzătoare, precum elemente de control al translației (de exemplu. codoni de start și stop) și transcripției (de exemplu, regiuni promotor-operator, situri ribozomale de legare, secvențe stop de terminare) legate în împerecherea cadrului de citire cu molecule de acid nucleic, ale invenției.

305 Conform invenției, vectorii pot să includă plasmizi și virusuri (atât bacteriofagi, cât și virusuri eucariote) conform tehnicilor binecunoscute și documentate în domeniu, și pot fi exprimați într-o diversitate de diferite sisteme de expresie, de asemenea binecunoscute în domeniu. Vectorii virali corespunzători includ, așa cum s-a menționat mai sus, virusurile bacilovirus și, de asemenea, adenovirusul și virusul *vaccinae*. În domeniu s-au descris

310 numeroși alți vectori virali. Pentru a introduce astfel de vectori în celule pentru expresie, procariote sau eucariote, sau în linii germinate sau celule somatice pentru formarea de animale transgenice, sunt cunoscute și pot fi folosite diverse tehnici. Tehnici adecvate pentru transformare sau transfecție sunt bine descrise în literatură.

315 Celule gazdă eucariote sau procariote, sau organisme transgenice sau transfectate, conțin o moleculă de acid nucleic conform invenției.

Sistemele de expresie, în general, și sistemul de expresie nematod, în particular, au avantajul că prelucrarea post-transcripțională și, în special, glicozilarea, se pot întâlni în cazul sistemului transgenic nematod, o glicozilare corespunzând celei găsite în proteina nativă. Aceasta reprezintă un aspect important al invenției, deoarece, în numeroase cazuri, este necesară prelucrarea posttranscripțională a proteinei recombinante, pentru a exprima

320 optimum de activitate biologică. Sistemele de expresie celulară de mamifere au, de asemenea, un număr de avantaje. Celulele gazdă de mamifere asigură reproducerea bună a formei native a epitopilor protectori ai antigenului, deoarece un sistem de expresie eucariot va provoca, la mai multe copii, glicozilare similară, legare disulfidică și alte modificări post-translaționale decât *E.coli*, care poate produce o proteină insolubilă, necesară de mai multe ori și care are o reproducere săracă a formei native. În plus, glicozilarea la mamifere este puțin probabil să inducă un răspuns imun, care să devieze de la un răspuns de protecție anti-proteină. Pentru protejarea oamenilor și animalelor domestice, este preferabil să se folosească linii celulare umane sau animale fibroblastoide sau mielomice precum *HeLa* - o linie celulară umană; *BHK* celule de rinichi de hamster pui; *VERO* - o linie de celule de rinichi de maimuță; *FR3T3* -fibroblaste Fisher de șobolan; *NIH3T3*, o linie celulară fibroblastică de șoarece; *C1271*, o linie celulară de tumoare mamară de șoarece; *CV-1*, fibroblaste din rinichi de maimuță africană verde; 335 *3T6*, fibroblaste embrionare de șoarece; celule *L*, o linie celulară de șoarece; precum *YB210* și *Y3*.

În domeniu, sunt binecunoscuți vectorii corespunzători pentru diferite clase de linii celulare de mamifere. În general, acestea vor cuprinde un promotor și/sau amplificator conectat operațional la o secvență nucleotidică care codifică antigenul sau fragmentul acestuia. Promotorii adecvați includ promotorul *SV40* timpuriu sau târziu, de exemplu vectorul *PSVL*, promotorul citomegalovirus (*CMV*), promotorul metalotioninei I de șoarece și o repetiție virală lungă, în cazul tumorii mamare, la șoarece. Vectorul include, de preferință, un marker corespunzător, precum o genă pentru dihidrofolat reductaza sau glutaminsistetaza. Vectori ai acestor tipuri sunt descriși în **WO 86/05807; 87/04462; 345 89/01036 și 89/10404.**

Transfecția celulelor gazdă poate fi efectuată folosind tehnici standard, de exemplu, folosind fosfat de calciu, dextran, DEAE, polibren, fuziunea de protoplaști, lipozomi, micro-injectarea directă, țintirea genei sau electroporarea. Se preferă ultima tehnică, metodele de transfecție a liniilor celulare de mamifere care folosesc electroporarea fiind descrise de către Anderson și colab., 1980; în general, ADN-ul liniar este introdus mai ușor decât ADN-ul circular.

350

În cazul proteinei H110D, s-a dovedit a avea un tip de glicozilare unic și neobișnuit, care s-a presupus a contribui la imunoreactivitate, deoarece numeroși anticorpi monoclonali, care s-au obținut în continuare pentru H110D de la *Haemonchus*, recunosc epitopii carbohidrați, care pot fi importanți în dezvoltarea unor vaccinuri utile.

355

S-a demonstrat în special următorul tip de glicozilare pentru H110D de la *Haemonchus*:

i) aproximativ 65% din oligozaharide sunt N-legate, ceea ce rămâne O-legate;
ii) partea principală (aproximativ 48%) din oligozaharidele N-legate este de clasa complexă;

360

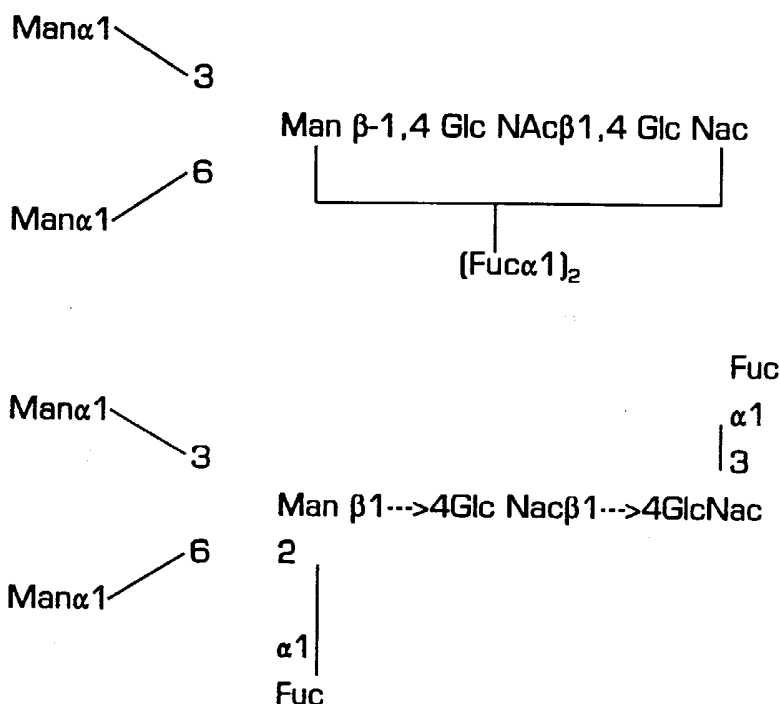
iii) substanțial, toate (peste 95%) dintre oligozaharide sunt fără sarcină;
iv) conținutul molar relativ al monozaharidelor constitutive este N-acetilgalactozamina 0,1, fucoza 3,6, galactoză 4,1, glucoza 4,4, manoză 6,2 și N-acetilglucozamina 5,2;
v) oligozaharidele, altele decât oligozaharida principală (desemnată oligozaharida D), sunt substanțial rezistente la degradare de către o gamă largă de exoglicozidaze (de exemplu, α -D-manozidază, β -D-manozidază, β -Dglucozidază, β -D-galactozidază, α -D-galactozidază, α -D-xiloxidază, β -D-xiloxidază, β -D-N-acetilglucozaminidază).

365

Asemenea oligozaharide și glicoproteinele care le conțin formează încă un aspect al acestei invenții.

Oligozaharida D, a glicoproteinei *Haemonchus H110D*, este tipul N-legată și are o structură nouă, constând din două resturi de fucoză atașate printr-o legătură α -1,3 și una α -1,2 la miezul unei manoze (N-acetilglucozamina)₂.

370



375

380

385

390

în special, când s-a legat la o proteină, de exemplu, o proteină recombinantă, ca o proteină aminopeptidază de helminț sau un fragment antigenic al acesteia, sau când s-a folosit pentru generarea antigenilor anti-idiotipici pentru imunizarea, în special, a animalelor foarte tinere. Glicoproteine animate având, în general, legături fucoză α -1,6 și α -1,3 de oligozaharide, conform prezentei invenții, sunt considerate ca neobișnuite.

395

Această invenție va fi descrisă acum în detaliu, cu referire, în special, la proteina H 11 OD de la *Haemonchus contortus*. S-a observat, totuși, prin diferite tehnici cum ar fi histo-chimia și hibridizare ADN, că echivalenți ai H 11 OD există și în alte specii de paraziți. Se crede că proteina H 11 OD este un complex multigenic și că, în plus, secvențele nucleotidice care o codifică pot prezenta variații de secvență între diferite tulpini și diferite stadii ale ciclului de viață al helmintului. Mai mult, pot exista forme enzimactice multiple (izoenzyme), care pot fi exprimate diferit în diferite stadii, sau în tulpini diferite. În acest studiu, secvențele ADN și altfel, secvențele aminoacide propuse, s-au determinat de la clone cADN și produse PCR obținute din ARN-ul corespondent genelor H110D, prin tehnologia ADN-ului recombinant din surse diferite și în diferite stadii ale ciclului de viață ale parazitului *H. contortus*.

Secvențarea cADN și a produselor PCR a permis să se identifice trei secvențe H110D strâns înrudite, care sunt desemnate aici H11-1, (Secv. ID Nr.: 19), H11-2 (Secv. ID Nr.: 20), și H11-3 (Secv. ID.: 21). H11-1 cuprinde trei secvențe continue și suprapuse, clona cADN, Aust B1 (Secv. ID Nr.: 6), produsul PCR A-648 (Secv. ID.: 9) și terminația 3' a produsului PCR 014-178 (Secv. ID NR. 12); H11-2 conține produsele PCR A-650 și 2,5 kb (Secv. ID.: 10) și respectiv 7); H11-3 conține produsele PCR 3,5 kb și A-649 (Secv. ID. Nr.: 8 și respectiv 11). Relațiile specifice dintre clonele cADN și produsul PCR secvențiat individual și H11-1, -2, -3 sunt prezentate pe scurt în fig. 1 și respectiv detaliat, în fig. 3, 4, 5.

Diferențele și variațiile observate între secvențele obținute de la clonele cADN și produsele PCR pot fi văzute în special în fig. 2, 3, 4 și 5 (compuse din Secv. ID NR.: de la 1 la 15 și de la 19 la 21) și prezentate pe scurt în tabelul 1.

Omologiile secvențelor aminoacide deduse, obținute prin traslarea secvențelor nucleotidice arătate în fig. 2

Tabelul 1

	Similaritate %	Identitate %
H11-1:H11-2	77	63
H11-1:H11-3	79	65
H11-2:H11-3	82	69

Diferențele pot fi atribuite mARN-urilor diferite (ale familiilor multigenice). Suplimentar, se pot datora, cel puțin în parte, variantelor diferite ale secvenței care codifică H 11 OD, sau mARN-ului prezent în diferite stadii ale ciclului de viață sau tulpinilor cu diferite origini geografice.

Omologiile secvențelor aminoacide ale H 11 OD cu aminopeptidaza M de la șobolan (ApM) aminopeptidaza A de la șoarece A (ApA)

Tabelul 2

	Similaritate %	Identitate %
H11-1:ApM	55	32
H11-1:ApM	55	31
H11-2:ApM	52	31
H11-2:ApM	54	31
H11-3:ApM	53	32
H11-3:ApM	52	30

În continuare, se prezintă un exemplu de realizare a invenției, în legătură cu cele 21 de figuri care reprezintă:

- fig. 1: o hartă a clonelor a cADN și produsului PCR al H 11 OD *H. contortus* secvențate, relațiile lor și pozițiile relative de-a lungul mARN H 11 OD;

445

- fig. 2: secvențe nucleotidice H 11 OD desemnate H11-3, (Secv. ID Nr.: 21) derivate de la produsele PCR clonate Secv. ID Nr. 8 și 11 și clona cADN M1AUS, Secv. ID NR.: 5), H11-2 (Secv. ID. Nr.:20, derivate de la produsele PCR clonate Secv. ID NR.: 7 și 10) și H11-1 (Secv. ID. NR.:19, derivate de la produsele PCR clonate, Secv. ID. Nr.:9 și 12 și clona cADN Aust B1, Secv. ID Nr.: 6);

450

- fig. 3: secvența H11-3 (Secv. ID Nr.: 21) (prezentată în fig. 2) cu alinierea clonelor cADN M1 și M1AUS (Secv. ID Nr.:1 și 5);

- fig. 4: secvența H11-2 (Secv. ID Nr.: 20) (prezentată în fig. 2) cu alinierea clonelor cADN B2 (Secv. ID Nr.:4);

455

- fig. 5: secvența H11-1 (Secv. ID Nr.: 19) cu alinierea cADN B1A și B1 (Secv. ID Nr.:2, și respectiv, 6);

- fig. 6: a) secvențele aminoacide presupuse (Secv. ID Nr: 22, 23 și 24) derivate de la secvențele ADN H11-1, H11-2 și H11-3 prezentate în fig. 2;

bi) și ii) arată secvența aminoacidă prezisă a H11-3 comparată cu secvențele aminoacide publicate ale aminopeptidazei microzomale M de la șobolan (Watt și colab., 1989) și respectiv, aminopeptidaza microzomală A de la șoarece (Wu și colab., 1990); identitățile sunt închise în căsuțe, intervalele indică spațiile introduse pentru a maximiza nivelul de omologie dintre secvențele comparate. Pentru aminoacizi s-a folosit convențional o singură literă. Linia orizontală de deasupra secvenței indică poziția regiunii transmembranare și asteriscurile arată poziția motivului legare-zinc. Nivelurile de similaritate sunt prezentate în tabelele 1 și 2.

460

465

- fig.7: alinierea secvențelor aminoacide (desemnate PepA, PepB, PepC, PepD și PepE) obținute de la fragmente CNBr și Lys-CAle H 11 OD cum au fost descrise anterior (Publicația internațională a cererii de brevet **WO 90/11086** și, cum s-au enumerat mai devreme, secvențele polipeptidice (a), (b), (e), (k) și respectiv (aa)) și trei secvențe noi (Secv. ID Nr.: 16, 17 și 18) obținute de la H 11 OD după digestie prin elastază sau termoliză cu translările aa) H11-1, b) H11-2 și c) H11-3.

470

Într-un aspect suplimentar invenția asigură, de asemenea, molecule de acid nucleic care conțin una sau mai multe secvențe nucleotidice, care corespund, în principal, sau care sunt, în principal, complementare uneia sau mai multor secvențe alese de la secvențele clonelor MI, B1A, B1A-3, B2, M1AUS, Aust B1, 014-015 (2,5 PCR), 014-872 (3,5 PCR Clona 2), A-648 (terminația 5' a B1), A-650 (terminația 5' a 2,5 PCR), A-649 (terminația 5' a 3,5 PCR), 014-178 (terminația 3' a Aust B1, clona 2), 014-178 (terminația 3' a Aust B1, clonele 3 & 6), 014-872 (3,5 PCR, clona 10) și 014-872 (3,5 PCR, clona 19), H11-1, H11-2 și H11-3, Secv. ID Nr. la 15 și respectiv, 19 la 21, cum s-a prezentat în fig. 2, 3, 4 și 5, sau secvențe care sunt, în principal, omoloage, cu sau care hibridizează cu oricare dintre secvențele amintite.

475

480

Așa cum s-a menționat mai sus, compararea secvențelor diverselor clone menționate mai sus, față de bazele de date din computer ale secvențelor cunoscute, relevă omologie substanțială cu familia de enzime aminopeptidazice microzomale (E.C.3.4.11-). Activitatea enzimatică a studiilor de inhibitor realizate cu H 11 OD și subfracțiunile acesteia confirmă că proteina este de fapt aminopeptidaza microzomală (α -aminoacilpeptidhidrolaza (microzomală)). Astfel de studii au arătat, în continuare, că sunt prezente ambele activități asemenea -aminopeptidazei M și că fiecare dintre componentele H 11 OD, prezintă, individual, o activitate enzimatică.

485

490

De asemenea, au fost realizate studii de digestie proteolitică a H 11 OD. Folosind enzima elastază, s-a găsit ca H 11 OD poate fi parțial clivată, formând două fracțiuni, o secvența detergent-solubilă (care rămâne cu membrana) și o fracțiune solubilă în apă (care este, de asemenea, H 11 OD). H11S se întâlnește sub forma unei proteine dimere care poate fi redusă la două componente. S-a găsit interesant că numai activitatea asemenea aminopeptidazei-M este asociată cu fracțiunea H11S solubilă în apă, în timp ce activitatea asemenea aminopeptidazei-A este asociată numai cu fracțiunea detergent - solubilă.

Exemplul următor asigură o descriere a studiilor care duc la determinarea secvențelor prezentate în fig. de la 1 la 7, cu referire la următoarele figuri suplimentare, în care:

- fig. 8: prezintă pete Western ale proteinelor membranare integrate prezente în extract în detergent de la adulți *Haemonchus contortus*, testate cu afinitate de anticorpi purificați, eluați de la clonele potențiale H 11 OD;

a) antigeni într-un extract de *Haemonchus* în detergent recunoscuți prin antiserul la extract;

b) anticorpi eluați dintr-un extract precum cel prezentat în a) retestat contra unei pete a extractului în detergent confirmă realizarea cu succes a etapei de elutie;

c) anticorpi ca în b) care se leagă la clona M1 proteina exprimată puternic, care recunoaște o regiune la 110 kb (și o bandă relativ îngustă la aproximativ 205 kd1);

d) nu există nici un anticorp de legare când se folosește pentru adsorbția serului un nou-recombinant;

- fig. 9: arată o pată Northern a m-ARN-ului purificat de la *Haemonchus contortus*, în vârstă de 11, 15 și 23 zile, sondat cu

a) cADN clona M1 (Secv. ID Nr.:1);

b) cADN clona M1AUS (Secv. ID NR.: 5);

c) cADN clona B1A (Secv. ID Nr.:2 și 3);

d) cADN clona Aust B1 (Secv ID NR.: 6);

e) produs PCR clonat 014-872 (3,5-2, Secv. ID Nr.: 8);și

f) produs clonat 014-015 (Secv. ID Nr.:7), Numerele 11, 15 și 23 indică vârsta pentru *Haemonchus* de la care s-a obținut mARN;

- fig.10: pete Southern ale ADN-ului genomic de la *Haemonchus contortus* sondat cu cADN-ul clonelor M1AUS (Secv. ID Nr.: 5), B1A (Secv. ID NR.: 2 și 3) și Aust B1 (Secv. ID Nr.: 6) și produsele PCR 014-872 (3,5-2, Secv. ID. Nr.: 8) și 014-015 (Secv. ID. Nr.: 7);

a) petele s-au spălat la o stringență moderată,

b) petele s-au spălat la stringență ridicată; pentru fiecare sondă, traseul 1 a conținut un digerat HindIII al ADN-ului ca marker sau s-a lăsat ca blank, traseele 2 și 3 au conținut digerate EcoRI și respectiv, HindIII ale ADN-ului genomic de la *Haemonchus*;

- fig. 11: pete Western ale fuziunilor proteice recombinante GST-ML și GST-B1A, sondate cu anticorpi de afinitate purificați la H 11 OD (H 11 OD) purificată prin electroforeză;

- fig. 12: pete Western ale antigenului ConAH110D testat cu antiser ConAH110D și la fuziunile proteice recombinante GTS-M1 și GTS-B1A;

- fig. 13: a) rezultatele analizelor proteinei H110D și activităților enzimei aminopeptidază în funcțiunile obținute prin cromatografia schimbătoare de ioni a ConAH110D, pe o coloană MonoQ;

b) SDS-PAGE a fracțiunilor arătate în fig. 13 a);

- fig. 14: a) valorile pH-ului la care s-au obținut fracțiunile într-un experiment de focalizare izoelectrică în curgere-liberă;

b) SDS-PAGE în condițiile de reducere a fracțiunilor de la 14a) în care banda mai groasă a dubletului H110D s-a găsit în fracțiunea 6 și banda mai înaltă în fracțiunea 16, cu cantități variabile ale fiecăreia dintre fracțiunile care intervin;

c) pete Western ale fracțiunilor prezentate în 14 b), testate cu i) anticorpi monoclonali desemnați TS3/19.7 și ii) anticorpii policlonali anti-M1 purificați prin afinitate; anticorpii de control nu au dat reacție detectabilă;

- fig. 15: a) valorile pH-ului la care s-au obținut fracțiuni în alt experiment de focalizare izoelectrică în curgere liberă;

b) SDS-PAGE în condițiile reducerii fracțiunilor de la 15a) folosite în cercetările enzimei, în care banda mai joasă a dubletului H110D s-a găsit în fracțiunile 4-6 și banda mai înaltă în fracțiunile 16-18, cu cantități variabile ale fiecăreia dintre fracțiunile care intervin;

c) activități specifice aminopeptidazei microzomale a fracțiunilor din 15b);

- fig. 16: protecția oilor prin vaccinare cu benzile separate (U) superioară, (L) joasă, recombinantă (U+L) și dubletul intermediar (D) de la H 11 OD;

a) productivitatea de ou parazit, exprimată ca ou per gram de materii fecale;

b) încărcarea cu viermi, postmortem, relativ la controale;

- fig. 17: protecția oilor prin vaccinare cu un fragment solubil în apă (H 11 OD), obținut de la H110D prin digestie cu elastază și H11A, H110D rezidual, detergent-solubil;

a) productivitatea de ou parazit, exprimată ca ou per gram de materii fecale;

b) încărcarea cu viermi, postmortem, relativ la controale (C);

- fig. 18: exemple ale relației între inhibiția de Ai), Bi) activități asemenea aminopeptidazei M și Aii), Bii) asemenea aminopeptidaze-A ale H 11 OD prin antiser individual de oaie vaccinată cu H 11 OD, cu niveluri de protecție măsurate prin Ai, ii) reducerea % a încărcării cu viermi după moarte și bi, ii) reducerea % a numărului de ouă fecale; anti-H110D, control anti-colferitină;

- fig. 19: localizarea histochimică a activității enzimei aminopeptidază în adult de *Haemonchus contortus*-micrografiile deschise ale crio-secțiunilor de femelă adult de *Haemonchus contortus* arată activitate aminopeptidazică asociată doar cu microvilozitățile (mv) intestinale (I). Nici un alt țesut, de exemplu, cuticula (c), hipodermul (h), tractusul genital (tg) și peretele muscular (wm) nu prezintă activitate. În a) substratul a fost L-leucină 4-metoxi-β-naftilamidă, în b) substratul a fost L-acid α glutamic-(4-metoxi-β-naftilamidă);

- fig. 20: harta produsului 3,5 PCR (clona 2) (Secv. ID NR.: 8) subclonat în vectorul de expresie baculovirus *pB1ueBacII*;

- fig. 21: o pată Western a extractelor de la celule de insectă *Spodoptera frugiperda* (Sf)9 infectate baculovirus, sondate cu anticorpi anti-H 11 OD. Două plăci clonate, P3A și P4A au exprimat H 11 OD de lungime integrală, imunopozitivă, iar controalele nu.

Exemplul 1. Construcția băncii *λ*AGT11

Izolarea mARN-ului

Haemonchus consort, adulți (0,5 g) de origine din Regatul Unit, congelați brusc în lichid, se mojarază în azot lichid, folosind un mojar prerăcit și un pistil. ARN-ul se extrage din mojar cu 10 volume de hidroclozură de guanidină 4M în citrat de sodiu 25 mM conținând 0,5% sarcosil (g/v) și 0,7% 2-mercaptoetanol (g/v), urmat de extracție cu fenol și cloroform folosind metoda lui Chomezynski și Sacchi (1987). Se prepară ARN mesager (mARN) de la acesta prin cromatografie de afinitate pe celuloză oligo dT (de două ori) cum este descris în Manitis et al., (1982) și se testează calitatea prin translație *in vitro*, folosind o trusă de lizat reticulocitar de șoarece și metionând ³⁵S de la Amersham International plc, conform instrucțiunilor fabricantului. S-au detectat polipeptide până la 120 kda.

Prepararea ADN-ului complementar

Primul filament ADN complementar (cADN) se sintetizează de la 1 μg mADN, folosind inițierea la întâmplare a acestuia și transcriptaza inversă aviară, și cel de-al doilea filament se sintetizează folosind o reacție de înlocuire a ADN-ului complementar cu RN-ază H și ADN polimerază I *E.coli*, urmată de repararea proeminențelor 3' folosind ADN polimeraza

T4, conform metodei lui Gubler & Hoffman (1983). Randamentul cADN dublu catenar (ds) este de aproximativ 400 ng de la 1 μ m ARN. mADN (ds) se examinează prin electroforeză într-un gel de agaroză 1%, urmată de autoradiografie. cADN-ul ds este în domeniul de mărime 0,2-9,4 kb, cu majoritatea în domeniul 0,5-2,3 Kb.

Clonarea cADN-ului în λ gt11

cADN-ul neselectat după mărime se folosește pentru a construi o bancă în λ gt11, folosind sistemul de clonare cADN Amrsham (trusa nr. RPN 1280, Amersham International plc) și plierea extractelor *in vitro* (Trusa nr. N334, Amersham International plc), cum este descris în instrucțiunile fabricantului, și oligonucleotidele linker EcoRI (5'GGAATTCC). Banca rezultată se depune pe *E.coli* tulpina Y1090, în prezență de izopropiltio- β -D-galactozidă (IPTG) și 5-brom, 4-clor, 3-indolil β -D-galactozidă (X-gal), în condițiile în care recombinantul λ gt11 apare ca plăci clare (White") și tipul sălbatic λ gt11 nerecombinant, ca plăci albastre. Banca a conținut 90% plăci albe și eficiența clonării se calculează a fi 4×10^7 unități formatoare de plăci (pfu)/ μ g cADN și un titru al bancii de 2×10^6 unități formatoare de placă per ml. Analiza ADN-ului de la 20 recombinanți culeși la întâmplare arată un insert mediu, de mărime 0,51 kb. Totuși, această medie a fost perturbată de o clonă cu un insert de 3,5 Kb. Majoritatea inserțiilor sunt mai mari de 300 baze pereche (bp). Aceasta bancă λ gt11 derivată de la mARN de vierme din Regatul Unit a fost cercetată imunologic.

Prepararea sondelor de anticorp

Antiser pentru proteinele membranare integrate

Se disecă intestine de la adult *Haemonchus contortus* (de origine din Regatul Unit) și se omogenizează în fosfat salin tamponat (PBS) răcit pe gheață, pH 7,4, conținând 1 mM acid etilendiaminotetraacetic (EDTA) și 1 ml florură fenilmetilsulfonică (PMSF). Omogenatul se concentrează timp de 10 min, folosind o microcentrifugă, și peleta se resuspendă în același tampon, care conține 0,1% (v/v). Tween este o marcă comercială. După recentrifugare, peleta se resuspendă în același tampon conținând 2% v/v Triton X-100 și se extrage 2 h la 40°C. Acest extract se centrifughează ca mai sus, pentru a obține un supernatant care conține proteinele membranare integrate (IMP).

Se hiperimunizează o oaie IMP în Adjuvantul Complet al lui Freund (FCA), prin injecție intramusculară a 50, 50, 120 și 130 μ g de IMP dat în săptămânile 0, 7, 11 și 15. La șase săptămâni după injecția finală, se recoltează serul și se desemnează ser EE - 068

Prepararea proteinelor membranare integrate de Haemonchus contortus prin extracție cu detergent

Se prepară un extract, prin omogenizarea viermilor în 5...10 volume de PBS conținând 1 mM EDTA și 1 mM PMSF. Suspensia se centrifughează la 10000 x g timp de 20 min, la 4°C, și peleta se spală în același tampon conținând 0,1% v/v Tween 20, apoi se extrage cu 5 volume 2% v/v Triton-x-100 cum se descrie mai sus. Supernatantul se recentrifughează a 100000 x g timp de 1 h, și supernatantul rezultat, care s-a îmbogățit în H110D, dar a continuat și în alte probe de IMP, se folosește în experimente de pătare Western și pentru prepararea H110D ne-denaturate (vezi mai jos).

Prepararea H110D și Anti-H110D purificat prin afinitate

Extractul îmbogățit în H110D se supune cromatografiei schimbătoare de ioni pe MonoQ (așa cum s-a descris în WO 88/00835 și 90/11086) H110D purificat se reia în FCA și se injectează intramuscular la miei. Se dau trei doze de 100 μ g la trei săptămâni. Serul colectat de la miei de 4 săptămâni, după injecția finală, se purifică prin afinitate, prin absorbție la o coloană conținând H110D purificată, care este cuplată la sefaroza activată bromură de cian (Pharmacia). Cuplarea H110D la sefaroză, legarea de antiser și elutia anticorpilor anti-H110D se fac conform instrucțiunilor furnizate de către Pharmacia. Acești anticorpi purificați prin afinitate se desemnează anti-H110D. "N"-ul deosebește acești anticorpi de cei provocați la H110D denaturată, purificată electroforetic, care sunt desemnați anti-H110D.

Pătarea Western

Pătarea se realizează folosind proceduri standard (Johnstone et al., 1982)

Izolarea și caracterizarea clonelor

Imunocercetarea băncii λ gt11 (origine Regatul Unit)

Metoda folosită pentru cercetarea imunologică a băncii este în esență precum cea descrisă de către Bowtell et al., (1986). Înainte de folosire, serul (EE-068) eliberat de anticorpi anti-*E.coli* prin absorbție cu lizate și celule întregi de *E.coli* Y1090. Banca s-a etalat pe celule *E.coli* Y1090 la o densitate de 10^3 pfu pe placa de 90 mm în diametru. Plăcile se acoperă cu filtre nitrocelulozice impregnate cu IPTG și se incubează peste noapte. Se spală filtrele cu TBST (50 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,05% v/v Tween 20) și apoi se blochează cu 5% v/v ser de cal în TBST timp de 2 h. Se adaugă ser EE-068 diluat 1 la 20 în TBST conținând 5% ser de cal, și filtrele se incubează timp de 4 h, clătindu-se ușor. Filtrele se spală din nou în TBST, apoi se incubează cu peroxidază de hrean (HRP)-conjugată cal anti-oaie IgG diluată 1 la 500 în TBST conținând 5% v/v ser de cal, timp de 2 h. (Anti-ser pentru IgG de oaie se induce unui cal, IgG anti-oaie purificați prin cromatografie de afinitate pe o coloană sefaroză IgG de oaie și anticorpii s-au conjugat la HRP prin metoda Nakane & Kawaoi, 1974). Filtrele se spală suplimentar în TBST, și plăcile pozitive se detectează folosind 0,6 mg/ml 3,3-diaminobenzidină (DAB) și 0,1% v/v apă oxigenată. Se culeg 25 de pozitive prealabile și se recercetează cu anti-H110DN purificată prin afinitate, cum este descris mai sus. După această cercetare secundară, sunt recombinate încă 5 probe, dând, cu clona desemnată M1, cel mai puternic semnal.

Purificarea prin afinitate, a anticorpului pe fag recombinant

Se prepară clone confluențe pe suprafața *E.coli* Y1090 prin întinderea de 10^3 pfu ale fiecărei dintre λ clonele anticorp pozitive sau fagul de control λ gt11 negativ nerecombinant. Suprafețele se incubează timp de 4 h la 42°C, apoi se acoperă cu filtre impregnate cu IPTG și, în continuare, se incubează peste noapte la 37°C. Se îndepărtează filtrele de la plăci și se spală în TBST înainte de a se bloca cu 5% v/v ser de cal, timp de 1 h. Filtrele se incubează apoi cu o diluție 1 la 100 de antiser EE-068 timp de 6 h, înainte fiind limpezite perfect cu TBST. Anticorpii legați se eluează de pe filtre prin două aplicări a 2 ml tampon de eluție (5 mM glicină, 500 mM NaCl, 0,2% Tween 20, pH 2,3) timp de 2 până la 5 min fiecare, neutralizare prin adăugare de 200 μ l de 1M Tris-HCl, pH 7,4, diluat 1 la 200 și se folosesc pentru cercetarea imunologică a unei pete Western a unui extract îmbogățit în H110D.

Secvențierea ADN-ulul clonei M1

Se izolează ADN din clona M1, conform metodelor descrise în Maniatid și colab., (1982). Fragmentul KpnI-SstI de 2,38 kb conținând fragmentul M1 de 300 bp se izolează prin electroforeză în gel, se purifică folosind un kit GENECLEAN (Stratagene) (GENECLEAN este o marcă comercială înregistrată a BIO 101) și se subclonează în pBluescript II SK⁺ (Stratagene). Fragmentul EcoRI se purifică folosind aceleași metode și se resubclonează în același vector.

Secvența nucleotidică a insertului M1 se determină folosind kitul de secvențiere T7 (Pharmacia, U.K.), folosind primeri M13 atât din față, cât și reversi.

*Prepararea băncilor cADN λ gt11 și λ XZAP australiene**Izolarea mARN*

Se congelează brusc 5 g adulți *Haemonchus contortus* (tulpina susceptibilă australiană McMaster) în azot lichid, se triturează în azot lichid și se extrag mARN-ul folosind fenol fierbinte, prin metoda Cordingley și colab., (1983). Randamentul ARN-ului total este 10,35. Se folosesc 1,3 mg din acest ARN, pentru a prepara mARN prin cromatografie de afinitate pe celuloză oligo-dT (două purificări secvențiale), folosind metoda descrisă de Maniatis et al., (1982). Randamentul mARN-ului este de 21,6 μ g. Cantitatea de mARN se testează prin

690 translarea *in vitro* în lizat reticulocitar de iepure, în prezență de metionină-35S (Amsterdam), conform instrucțiunilor furnizorului. Produsele de translație obținute au benzi clar distinse, inclusiv benzi mai mari de 200 kb în mărime, așa cum se demonstrează prin electroforeză pe geluri de poliacrilamidă SDS, urmată de fluorografie.

Sinteza cADN și prepararea băncii

695 Se folosește 1 μg mRNA pentru a face cADN prin inițiere cu oligodT sau primeri oarecare, folosind o trusă de sinteză cADN de la Amersham International plc, urmând instrucțiunile fabricantului. Randamentul este 115 ng cADN dublu catenar (ds). Cantitatea cADN-ului se examinează prin electroforeză ADN-ului marcat ³²P pe un gel de agaroză alcalină, cum se descrie în instrucțiunile kit ADN, Amsterdam. Mărimea cADN-ului (prin comparație cu markeri λ-HindIII, New England Biolabs) este de la 150 bp până la mai mult de 700 10 kb, majoritatea produselor fiind în domeniul de mărime 0,6-5 kb. cADN-urile (ds) inițiate oligo-dT și inițiate la întâmplare se depozitează și este ligat la linker EcoRI 8-mer (5'-GGAATTCC 3') New England Biolabs. Catalog nr. 1018) în exces, care se marchează cu γ-³²P-ATP și polinucleotidkinază T4. cADN-ul se digeră cu EcoRI și excesul de linker se 705 îndepărtează prin cromatografie pe sefaroza 4B (Pharmacia) conform metodelor descrise de Maniatis et al., (1982). Frațiunile din coloană se strâng în două loturi, unul care conține cADN mai mare de 2 Kb și unul de cADN mai mic decât 2 Kb. Fiecare depozit este ligat apoi separat la un 1 μg tăiat EcoRI, brațe fosfatate λZapII (Stratagene) și pliat separat folosind Gigapack Gold (Stratagene, marcă înregistrată). cADN-ul de mărime mai mare da 1,3x10⁵ 710 recombinanți și cADN-ul mai mic, 1,4x10⁵ recombinanți; aceștia se depozitează pentru a obține o bandă de 2,7x10⁵. Banca λZap se amplifică prin depunere pe celule XL1-Blue (Stratagene) la 2x10⁴ pfu pe placa de 135 mm. Titrul băncii amplificate este 7x10⁷ pfu/ml.

În continuare, se folosesc 2 μg mRNA pentru a face cADN, cum este descris mai sus, dar folosind ca inițiator numai oligo-dT. Randamentul cADN ds este 740 ng. Acest 715 cADN se tratează cu EcoRI metilaza cum este descris în Maniatis și colab., (1982) înainte adăugării de linker EcoRI, și, în acest caz, se folosesc linker 12-mer (5'-CCGGAATTCGGG 3' New England Biolabs) Catalog nr. 1019). După digestia cADN-ului ligat cu EcoRI, toate fracțiunile dintr-o coloană sefaroză 4B care au conținut cADN se depozitează și sunt ligate la 2 μg tăiat EcoRI, brațe fosfatate λgt11 (Stratagene). Amestecul de ligare este împărțit în 720 două și se pliază cu două loturi de Gigapack Gold (Stratagene); acestea se stochează pentru a obține o bancă λgt11 de 7x10⁵ pfu. Banca este amplificată prin depunere pe celule ST9 la 5x10⁵ pfu pe placa de 135 mm. Titlul băncii λgt11 amplificate este 4,5x10¹¹ pfu/ml.

Cercetarea băncii λgt11 australian cu anti-ser pentru H110D

725 Prin injectarea oilor cu proteina H110D (de origine U.K.), care este electroeluată de pe poliacrilamida după electroforeza în SDS, se induc antiseruri, conform următoarei metode:

ConAH110D preparat cum este descris în **WO 88/00835** și **90/11086** este supus electroforezei pe geluri poliacrilamidice SDS (Laemli, 1970), pentru a obține electroeluantul H110D. După electroforeză, suprafața gelului poliacrilamidic, care conține H110D, se decu- 730 pează, se plasează într-un electroeluter (Atto) și eluția se realizează timp de 3 h la 10W.

Electroeluantul H110D (denumit H110DE) se concentrează pe un Centriprep 10 (Amico) și tampon schimbat pe o coloană PD10 (Pharmacia) în 50 ml bicarbonat de amoniu per 0,07% SDS, se amestecă cu adjuvanți și apoi se injectează la oi. Imunoglobulinele din ser se precipită cu sulfat de amoniu (Johnstone și Thorpe; 1982). Anticorpul precipitat se 735 resuspendă la 60 mg/ml în fosfat salin tamponat, se dializează contra fosfat salin tamponat și se diluează 1:10 în Tris salin tamponat (TBS) care conține 5% g/v lapte praf degresat. Se prepară 10 mg ConA H110D pentru 0,5% SDS, se încălzește la 100°C timp de 3 min și se usucă pe un filtru de nitroceluloză. După spălări cu TBS care conține 0,2% v/v Tween 20 și

0,5% Triton-X-100 (TBSTT) filtrul este incubat timp de 1 până la 2 h la temperatura camerei, cu anticorpi pentru H110D. După spălarea filtrului 2 h cu TBSTT, anticorpii legați sunt eluați cu 3 ml de 0,1 M glicină, 0,15M NaCl, pH 2,6, timp de 2 min și imediat pH-ul este ajustat la pH neutru, prin adăugarea de 75 μ l de 1,5 M Tris pH 8,0. Acești anticorpi purificați prin afinitate, desemnați anti-H110D, sunt folosiți pentru cercetarea a 5×10^5 pfu a băncii cADN λ gt11 australiene, cum s-a descris mai sus. 740

Se recombina 5×10^5 recombinanți de la banca λ gt11 derivată de la *Haemonchus contortus* australian și se colectează 3 pozitivi, după cercetarea ulterioară, și se desemnează B1A și B2. 745

Secvențierea clonelor pe B1A și B22

Cele două clone se digeră cu EcoRI, dând un singur insert de aproximativ 500 bp pentru B1A și 3 fragmente, B2A (aproximativ 400 bp), B2B (aproximativ 100 bp) și B2C (aproximativ 100 bp), pentru B2. Acestea se subclonează în pBluescript SK⁺ (Stratagene) și se secvențializează folosind un Kit Sequenase 2,0 (United States Biochemicals). 750

Expresia clonelor M1 și B1A

Insertiile M1 (Secv. ID. Nr.:1) și B1A(Secv. ID.Nr.: 2 și 3) se exprimă în *E.coli*, folosind un vector pGex (Smith și Johnson, 1988). Acest vector exprimă proteine la terminusul C al glutation-S-transferazei (GST) de la *Schistosoma japonicum*. Insertiile M1 EcoRI și B1A EcoRI sunt ligate la EcoRI tăiat, s-au folosit pGeX1 și se transformă în *E.coli* tulpina JM 101 conform metodelor descrise în Maniatis și colab., 1982. De la fiecare transformare se colectează 8 descendenți și se crește 2 ml de culturi timp de 6 h la 37°C. Se adaugă IPTG pentru inducerea sintezei fuziunii proteinei și se continuă, peste noapte, incubarea. Se recoltează celule prin centrifugare, se distruge prin fierbere în tampon probă Laemli, 1974) și extractele se analizează prin SDS-PAGE și prin pătare Western, folosind anticorpii de oaie purificați prin afinitate specifică pentru dubletul H110D denaturat SDS (anti-H110D, vezi mai sus). Anticorpii legați se detectează folosind conjugat fosfataza alcalină anti-oaie IgG de iepure conjugat fosfataza alcalină (Jackson Immunoresearch), urmată de dezvoltare de culoare cu 5-brom, 4-clor, 3-indolilfosfat (BCIP) și tetrazoliu nitroblue (NBT). Culturile clonelor imunopozitive se dezvoltă, induc un răspuns ca mai înainte și se distrug prin sonicare. Sonicatele se separă în fracțiuni solubile și insolubile prin centrifugare (centrifuga Sorvall RC-2B, rotor HS4, 7000 rpm, 30 min, 4°C). Peletele insolubile se resuspendă în 8M uree prin sonicare, iar probele fracțiunilor se examinează prin SDS-PAGE. Fuziunea proteinelor se va găsi a fi în corpul incluzionat insolubil. Fiecare din aceste preparate se folosesc pentru a vaccina două oi la 150 μ g fuziune proteică per doză în adjuvanți Freuds. Oile control pozitiv sunt imunizate cu proteina ConA H110D nativă și oile control negativ sunt imunizate cu proteina solubilizată de la *E.coli* care conține vectorul pGex fără un insert *Haemonchus*. Serurile de la oi vaccinate se analizează prin pătări Western contra H110D. 755 760 765 770 775

Cercetarea băncii AZAP australiene prin hibridizare ADN cu inserții M1 și B1A

Plasmidii ADN M1 și B1A (clonați în pBluescript) se digeră cu EcoRI și se izolează inserții prin electroforeză în tampon TBE (Tris-Borat-EDTA; 89mM Tris-Borat, 89 mM acid boric, 2 mM EDTA, pH aproximativ 8,3) în gel agaroză 1%, urmată de purificare, folosind o trusă GENECLEAN. Se repetă izolarea și purificarea pentru a evita contaminarea sondei cu secvențele plasmidului ADN, care ar hibridiza la secvența λ ZAP, producând nivele inacceptabile ale fondului. Inserțiile ADN purificate sunt marcate CU α -³²P-dCTP, folosind o trusă Nick Translation de la Promega Biotech, conform instrucțiunilor fabricantului. ADN-ul marcat este separat de marcajul neîncorporat prin spin cromatografie în coloană (Maniatis și colab., 1982). Se depune banca λ ZAP pe 8 plăci de 135 mm la 10^5 pfu/placă, și plăcile care au realizat ridicări, pe filtre nitrocelulozice (Maniatis și colab., 1982). După coacere într-un cuptor cu vid timp de 2 h, la 80°C, filtrele se prehibridizează timp de 2 h, apoi se hibridizează 780 785

peste noapte la 42°C (cum s-a descris mai jos în secțiunea de pată Southern). Patru filtre se cercetează cu sonda M1 și patru cu sonda B1A. Filtrele se spală de două ori în 2xSSC conținând 0,5% SDS, o dată în 1xSSC conținând 0,5% SDS și o dată în 0,5xSSC conținând 0,5% SDS, toate la 50°C și se autoradiografiază. Plăcile potențial pozitive se colectează și se recercetează cu sondele. Se prepară stocuri cu fag cu titru înalt de la pozitivi confirmați (denumiți M1AUS pentru clona care hibridizează M1 și AustB1 pentru clona care hibridizează B1A), și clonele se salvează în pBLUESCRIPT pentru λZAP conform manualului de instrucțiuni ale fabricantului (Stratagene), folosind ca gazdă tulpina BB4 de *E.coli*. Plasmidii ADN minipreparați ai descendentilor rezultați se prepară prin liza alcalină (Maniatis și colab., 1982) și se digeră cu EcoRI. Digeratele se analizează prin electroforeză în gel de agaroză.

Secvențarea inserției M1AUS

Secvențarea ADN se realizează pe plasmidul ADN pBLUESCRIPT folosind trusa Sequenase versiunea 2.0, United States Biochemicals, conform instrucțiunilor fabricantului. Pentru prima secvențare se folosesc, în vederea inițierii reacțiilor, primerii reacțiilor de la capetele secvenței vector. Datele secvențării, obținute de la aceste reacții, sunt folosite pentru a desemna o a doua pereche de primeri și, de la datele generate cu aceasta, a doua pereche de primeri se desemnează a treia pereche de primeri. În acest mod, ADN-ul s-a secvențat prin "walking along" de la ambele terminații 5' și 3'.

Secvențarea insertului AustB1

Aceasta se realizează folosind 2.0 polimeraza T7 (USB Biochemicals) așa cum este descris pentru secvențarea insertului M1AUS.

Reacții polimerazice de lanț

Prepararea cADN-ului

Se prepară așa cum s-a descris pentru viermii adulți (U.K.), MARN (lpg) de la *H.contortus* (U.K.) La 11 zile postinfecție, și se amestecă cu primer-adaptor T17 (5' GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3') dietilpirocarbonat (depc) tratat cu apă, apoi se încălzește la 65°C timp de 5 min și se plasează imediat pe gheață. Se adaugă hidroxid de metil mercuric până la o concentrație finală de 28,6 mM, și amestecul este incubat la temperatura camerei 3 min. Se adaugă 2-mercaptoetanol până la o concentrație finală de 14,2 mM, și amestecul se plasează pe gheață. Pentru sintetizarea cADN, se adaugă RNază Guard (Pharmacia) până la 1 unitate/μl, tampon Reverse Transcriptase (Life Sciences) până la 2 unități/μl (toate date concentrații finale). Reacția se incubează la 41°C timp de 75 min, apoi se extrage cu fenol și cloroform și se purifică printr-o coloană de spin cromatografie (Maniatis și colab., 1982). Amestecul de reacție purificat se diluează de 2,5 ori și se depozitează la 4°C.

Amplificarea PCR a cADN-ului folosind primeri M1 AUS specifici

Reacțiile PCR se realizează folosind un cicler termic programabil (M. J. Research Ing.). Amestecul de reacție conține în afară de 1 μl de cADN diluat 250 μl, preparat cum s-a descris mai sus, 25 pmoli din prima bandă a primerului adaptor T17, 25 pmoli din primerul de amplificare pentru a doua bandă, fie cel bazat pe pozițiile 865-884 (5' ACGGGTGTTCGGTTCCGTAT 3') sau cel bazat pe pozițiile 30-49 (5' GCTGAATC TAACTCCAATCC 3') ale secvenței M1AUS (Secv. ID Nr.: 5), tampon 1xTaq (Notddumria Biologicals Ltd.) și 0,5 mM de fiecare dATP, dTTP, dGTP și dCTP, într-un volum de reacție de 100 μl și se acoperă cu 40 μl ulei mineral pentru prevenirea evaporării. Acest amestec este încălzit apoi în ciclerul termic la 95°C, 2 min apoi este ținut la 72°C. În acest timp se adaugă 2 unități de polimerază Taq și se amestecă cu blândețe cu ceilalți reactanți. S-a realizat apoi în ciclerul termic următorul program:

- Etapa 1 Normalizarea la 50°C timp de 5 min
- Etapa 2 Extinderea la 72°C timp de 40 min.

RO 117709 B1

- Etapa 3 Denaturare la 94°C timp de 40 secunde
- Etapa 4 Normalizare la 50°C timp de 2 min
- Etapa 5 Extinderea la 72°C timp de 3 min
- Etapa 6 39 cicluri de etape 3 la 5
- Etapa 7 Extindere finala la 72°C timp de 15 min
- Etapa 8 Păstrare la 40°C

840

Aceste condiții au fost stabilite de Frohman și colab., 1988.

Clonarea produselor PCR

Produsele PCR din reacțiile de mai sus se separă prin electroforeză în gel de agaroză. Benzile de ADN de aproximativ 2,5 și 3,5 kb se electroeluează pe fibre de sticlă (Whatman) se extrage cu fenol și se purifică prin cromatografie G50 (Pharmacia Sambrok și colab., 1989), ADN-ul purificat este ligat în vectorul pT7BlueT (Novagene) urmând instrucțiunile fabricantului.

845

Secvențarea produselor PCR de 2,5 kb și 3,5 kb

850

Secvențarea ADN-ului se realizează cu o trusă Sequenase 2,0 (US Biochemicals) folosind tehnica "Oligonucleotide walking" descrisă în secțiunea privind secvențarea M1AUS.

Reacții de polimeraze în lanț pentru terminațiile 5'

Prepararea primei benzi cADN

Se amestecă 1 μg de mARN la 11 zile post-infecție *Haemonchus contortus* (U.K.) preparat așa cum s-a descris pentru viermi adulți, cu un primer constant (5' AATGAAAG CGGATGGCTTGATGC 3' desemnat de la o regiune conservată din AustB1 și produsele 2,5 kb PCT și 3,5 kb PCR (Secvențe ID Nr.: 6, 7 și respectiv 8). Amestecul se încălzește la 65°C timp de 5 min, se plasează pe gheață și se adaugă hidroxidul mercuric până la o concentrație finală de 28,6 mM. Amestecul este incubat la temperatura camerei timp de 5 min, se adaugă 2-mercaptoetanol până la o concentrație finală de 14,2 mM și amestecul se plasează pe gheață. Prima bandă ADN se prepară folosind reactivul din sistemul 5'RACE (Gibco/BRL) la o concentrație finală de 20 mM Tris/HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 100 μg/ml BSA, 0,5 mM de dATP, dCTP, dGTT, dTTP. Se adaugă 200 unități Superscript Reverse Transcriptase și reacția se incubează la 42°C timp de 30 min și apoi se încălzește la 55°C timp de 5 min. Se adaugă RN-aza H până la o concentrație finală de 100 unități/ml, se incubează reacția la 55°C, 10 min și apoi se plasează pe gheață. cADN-ul se purifică printr-o coloană Glassmax spin (Gibco/BRL) și se depozitează la -20°C.

855

860

865

Prelucrarea cozii C a cADN-ului

Se încălzește 1/5 din prima bandă cADN la 70°C timp de 5 min, apoi se racește pe gheață 1 min. Se adaugă reactivii din sistemul 5' RACE (Gibco/BRL) până la o concentrație finală de 10mM Tris/HCl pH 8,4, 25 mM KCl, 1,25 mM MgCl₂, 50 μg/ml BSA, 0,2 mM dCTP. Se adaugă 500 unități/ml Terminal Transferase și reacția se incubează la 37°C timp de 30 min, apoi se încălzește la 70°C timp de 15 min și se depozitează pe gheață.

870

Amplificarea PCR folosind primeri specifici AustB1, 2,5 kb PCR și 3,5 kb PCR

875

Reacțiile PCR se realizează într-un Thermal Cycler programabil (M.J. Research Inc.). Pentru terminația 3' se folosește unul dintre următorii primeri.

1. Un primer specific pentru produsul PCR 2,5 kb pe pozițiile 374 la 394 (5'TGTTGTGGCTAATTTTCGTCCA 3').

2. Un primer specific pentru produsul 3,5 kb bazat pe pozițiile 1210 la 1229 (5' GACCATCGCTGATGAAGTCGG 3').

880

3. Un primer specific pentru clona cADN austb1 bazat pe pozițiile 357 la 377 (5' GACCATCGCTGATGAAGTCGC 3').

Pentru terminația 5' a reacțiilor se folosește un primer comun ("Anchor primer") (5' CUACUACUACUAGGCCACGCGTCTGACTAGTACGGGTTGGGTTGGGTTG 3'). Fiecare

885

amestec de reacție conține 4 μ l din primeri corespunzători, tampos 1xpolimeraza Taq (Boehringer Mannheim) și 0,5 mM fiecare dintre dATP, dCTP, dGTP și dTTP, până la un volum final de 100 μ l. Acest amestec se acoperă cu 50 μ l ulei mineral și se încălzește până la 95°C în cicler timp de 2 min. Amestecul de reacție se menține la 80°C, adăugându-se în acest timp 0,6 unități polimerază Taq, și apoi este trecut în următorul program:

1. Normalizarea la 50°C timp de 50 min.
2. Extinderea la 72°C timp de 10 min.
3. Denaturare la 94°C timp de 45 sec.
4. Normalizare la 50°C timp de 1 min.
5. Extinderea la 72°C timp de 2,5 min.
6. 39 cicluri conform etapelor 3 la 5.
7. Extindere la 72°C timp de 15 min.
8. Menținere la 4°C.

Clonarea produselor PCR 5'

Produsele PCR se separă prin electroforeză pe un gel de agaroză, și benzile de mărime așteptată, circa 1,3 kb, se decupează. ADN-ul se purifică folosind o trusă GENECLAN și este ligat în vectorul pT7Blue (Novagene) conform instrucțiunilor fabricantului.

Reacția polimerazică de lanț pentru producerea terminației 3' a AUSTB1

Prima bandă de ADN folosită este cea descrisă pentru producerea cADN pentru utilizare cu primeri M1 AUS. Se folosește un primer specific de la 1414 la 1435 (5' TCTTGAAGAAATGAAAAAGCTT 3') din AustB1 (Secv. ID Nr. 6) cu primerul adaptor T17 folosit pentru PCR M1AUS și reacțiile se realizează într-un cicler termic (M.J. Research Inc.). Amestecul se reacție a constat din 255 moli de fiecare primer, 2 μ l cADN, tampon 1xrazaq (Boehringer Mannheim), 0,5 mM dATP, dCTP, dGTP și dTTP în 100 μ l). Acestea se acoperă cu 50 μ l ulei mineral și se încălzește la 95°C timp de 2 min, se adaugă 0,6 μ l de polimerază Taq și se realizează același ciclu de program ca pentru PCT 5' descrisă mai sus.

Clonarea și secvențarea produselor 3'

Produsele PCR se separă prin electroforeză într-un gel de agaroză, se decupează banda de mărime așteptată, 1,4 kb, și ADN-ul purificat cu un kit GENECLAN și este ligat într-un PCR-Script (Stratagene) conform instrucțiunilor fabricantului.

Secvențarea produselor PCR clonate

ADN-ul de la clonele PCR se secvențiază folosind un kit Sequenase 2.0 (United States Biochemicals) conform instrucțiunilor fabricantului. Primerii oligonucleotidici se folosesc pentru "Walk along", a ADN-ului clonelor de la ambele terminații 5' și 3'.

Analiza secvențelor ADN integrate

Secvențele se analizează folosind GCG-ul (Genetics Computer Group) Sequence Analysis Software Package, Devereux și colab., 1984.

Analiza Blot Northern și Southern

Prepararea petelor Northern

Petele Northern se realizează în geluri de formaldehidă, în special cum se descrie în Maniatis și colab., 1982. Probele de mRNA (de la *H. contortus* în vârstă de 11, 15 și 23 zile) se tratează cu 17,5% v/v formaldehidă și 50% formamidă în tampon MOPS (20 mM acid 3-(N-morfolin)propansulfonic, pH 7,0, 8mM acetat de sodiu, 1 mM EDTA, la 65°C, 15 min și se răcește pe gheață. Gelurile se supun electroforezei în tampon MOPS și se pătează pe membrane Duralon prin transfer capilar, cum se descrie în Sambrook și colab., 1989.

Prepararea petelor Southern

Se triturează în azot lichid 2 g adulți *Haemonchus contortus* care anterior este înghețat brusc în azot lichid, până la o pulbere fină. Pudra se adaugă ușor la 25 ml tampon de liză (0,05 M Tris/HCl, pH 8, 0,1 EDTA, 1% g/v sarcosil, 0,05 mg/ml proteinază K (Boehringer

Mannheim) și se incubează 2 h la 65°C. Suspensia se extrage apoi de 2 ori cu un volum de fenol+cloroform, de două ori cu două volume de cloroform și se precipită cu etanol, ADN-ul genomic precipitat se resuspendă în 20 ml Tris, tampon EDTA (TE, pH 8), peste noapte la 4°C pe un suport cu balansare, apoi se dializează contra câte unui litru TE (2 l). ARN-ul se îndepărtează prin incubare cu DN-ază lipsită de RN-ază A Tip (Sigma) la o concentrație finală de 20 µg/ml, la 37°C timp de 1 h, a urmat o extracției cu fenol-cloroform, o extracție cu cloroform și precipitare cu etanol ca mai sus. Peleta de ADN genomic precipitat se spală de două ori cu 70% v/v etanol, și resuspendat într-un ml TE, ca mai sus. 940

ADN-ul genomic se digera cu EcoRI sau HindIII (25 µg de ADN în fiecare digerat) peste noapte, la 37°C apoi se supune electroforezei la 5 µg per traseu pe un gel 1% agaroză în tampon Tris-acetat. Gelul se pătează Southern prin transfer capitat cum se descrie în Maniatis și colab., (1982) pe membrana Hybond-N (Amersham International). ADN-ul se fixează pe membrane folosind lumina ultraviolet, conform recomandărilor fabricantului. 945

Prepararea sondelor

Plasmidele pBLUESCRIPT, care conțin inserțiile M1AUS, B1A sau AustB1, se digeră cu EcoRI. Plasmidele pT7 Blue conținând inserțiile produsului 3,5 kb PCR se digeră cu BamHI și cei conținând inserțiile produsului 2,5 Kb PCR se digeră cu BamHI și XbaI. Digeratele se supun electroforezei, se recuperează inserțiile și se marchează radioactiv prin Nick Translare cu α-³²P-dCTP, așa cum se descrie mai sus la cercetarea băncii AZAP. 950

Condiții de hibridizare

Pentru pete Southern

Membranele se taie în fâșii și se prehibridizează în tampon cum s-a descris mai devreme, timp de 3 h la 28°C. Fâșiile ADN genomic pătate Southern se hibridizează peste noapte la fiecare din sondele de mai sus la 29°C, se spală de două ori la temperatura camerei (24°C apoi de două ori la 42°C, în 2xSSC conținând 0,1% SDS stringent moderată) și se autoradiografiază. După dezvoltarea autoradiografiilor, fâșiile se spală din nou la o stringență înaltă (0,1xSSC, 0,1% g/v SDS la 65°C) și se reautografiază. 960

Pentru pete Northern

Pentru Sonde M1, M1AUS și B1A (Secv. ID Nr. 1,5 și respectiv 2)

Pata Northern a mRNA-ului de la *Haemonchus contortus* în vârstă de 11, 15 și 23 zile se sondează inițial cu inserția M1. Filtratul se prehibridizează pentru 2 h la 48°C în 2xSSC (unde 20xSSC este egal 3M NaCl, 0,3M citrat de sodiu, pH 7,2) conținând 5xDenhardt (0,1% g/v Ficoll 400 (Pharmacia), 0,1% polivinipirrolidonă, 0,1% albumină serică bovină fracțiunea V (Sigma Chemical Corp.)), 0,5% SDS (dodecilsulfat de sodiu), 10% dextran sulfat, 0,1 mg/ml ADN din icre de somon și 50% formamidă deionizată. Hibridizarea la sondă se realizează peste noapte la 42°C în același tampon. Filtrele se spală de două ori timp de 30 min în 2xSSC conținând 0,5% SDS și 50% formamidă, de două ori timp de 30 min, în 2xSSC, conținând, 0, 5% SDS și de două ori timp de 30 min în 2xSSC. Prima spălare este la 42°C, și toate celelalte care urmează, la 37°C. După autoradiografiere, pata se desprinde prin spălare în 0,1% SDS fierbinte și se reautografiază până la asigurarea îndepărtării sondei. Aceeși pată este sondată apoi cu insertul M1AUS, spălată și autoradiografiată. Pata este din nou desprinsă și păstrată până a devenit clară, și se testează cu inserția B1A. După ce se desprinde din nou, pata se sondează cum se descrie mai jos. 970

Pentru sonde AustB1 se produce PCR 2,5 kb și 3,5 kb (Secv. ID Nr.: 6, 7 și 8).

Pata Northern se hibridizează cu insertul AustB1, folosind condiții de stringent moderată, cum se descrie pentru hibridizarea petei Southern. După autoradiografiere, pata se desprinde cu 0,1% SDS fierbinte conform instrucțiunilor fabricantului membranei (Amersham), apoi se sondează cu inserția 2,5 kb PCR (clona 2), se desprinde și se sondează cu insertul 3,5 kb PCR (clona 2). 980

*Digestia H110D și cercetarea activității enzimatică*985 *Prepararea H110D*

Se prepară H110D nativă (H110DN) conform metodelor descrise în **W088/00835** și **90/11086**.

Prepararea unui fragment elastază (h11s) al H110D

990 Se omogenizează adulți *Haemonchus* în volume de gheață PBS rece/0,02% azidă de sodiu și apoi se centrifughează timp de 20 min la 13000 rpm. Peleta se resuspendă în 10 volume de PBS per azidă, reomogenizat, și se repetă centrifugarea. După resuspendare, în 50mM tampon MOPS, pH 7,4 (volumul pentru suspensie este 1 ml pentru fiecare 0,17 g viermi) și preîncălzire la 37°C timp de 30 min, materialul peletei se digeră cu elastază (800 μ l/20 ml suspensie; 1 mg/ml soluție stoc proaspătă adusă la 1 mM HCl/2mM Ca^{2+})

995 pentru 1 h. Digestia se oprește prin adăugarea de 3,4-diclorrizocumarină (300 μ l de stoc 10 mM în DMSO/20 ml de digerat). Amestecul se centrifughează la 13000 rpm timp de 20 min și se reține peleta. Supernatantul se ultracentrifughează la 100000 g timp de 1 h și 20 min. Lichidul supernatat obținut se aplică la o coloană ConA și se obțin fracțiunile legate. Pentru analiză, această fracțiune este pusă pe un gel SDS-poliacrilamidă și se transferă

1000 electroforetic la o membrană difluorură de poliviniliden (Immobilon P, Millipore), colorată cu Coomassie blue, se excizează banda de 105 kg și se analizează într-un secvențator de aminoacizi, în fază gazoasă. Pentru studiul de vaccinare ConA, sunt purificate prin concentrare și aplicare la o coloană de filtrare cu gel Sepharose 12 (Pharmacia) și colectarea acelor fracțiuni care conțin activitate aminopeptidazică.

1005 *Digestia H110D cu termoliză*

Dubletul H110D se purifică prin electroeluție de la un gel preparat 8% SDS-poliacrilamidă pentru a obține H110D, așa cum este descris în **WO 90/11086**, și prin eluția unei forme dimere, începând exact peste 200 kd, (care a dat dubletul caracteristic la 110 kd, când se repune pe SDS-PAGE) pentru a obține H110D. Soluțiile de H110D se concentrează până

1010 la 200 μ l, se adaugă clorură de calciu până la 5 mM și amestecul se încălzește la 37°C. Se adaugă o soluție proaspăt preparată de termoliză per 1 mh/ml (în 1 mM HCl, 2 mM CaCl_2) în raport de 0,1 μ g H110D. Amestecul se incubează la 37°C timp de 120 min.

Fragmentele proteice se separă prin electroforeză la gel 15% SDS-acrilamidă și se transferă electroforetic la membrană difluorură de poliviniliden (Immobilon-P, Millipore). După colorare cu Coomasie blue, benzile discrete cele mai intens colorate se excizează și se analizează într-un secvențator de aminoacizi în fază gazoasă.

1015 *Prepararea unei fracțiuni H110D (H11A), îmbogățită pentru activitatea aminopeptidazică A*

Materialul peletat, obținut după tratament cu elastază prin centrifugare la 17000 g, timp de 20 min (vezi mai sus) se resuspendă în PBS la 4°C și se repeletează prin centrifugare, se resuspendă în 1% Tween în PBS/azidă și lăsat (cu agitare) 1 h. Suspensia se centrifughează la 17000 g, 20 min și se îndepărtează supernatantul. Peleta este extrasă repetat cu 1% Thesit în PBS/azidă. Supernatantele, după centrifugare la 17000g, 20 min se combină și ultracentrifughează timp de 1 h 20 min, la 100000 g. Supernatantul se aplică la o coloană de afinitate ConA (Affigel, Biorad) și materialul legat se eluează ulterior, fracționându-se prin cromatografie de schimb ionic pe o coloană MonoQ.

1025 *Cercetări ale activității enzimatică*

Activitățile aminopeptidazei α -aminopeptidhidrolazei (microzomale) din preparatele H110D se caracterizează prin cercetări, în soluție, folosind 1-leucină, metionină, fenilalanină, acid α -glutamic și lizin-*p*-nitroanilină (pNA). Toate substraturile aminoacide-nitroanilină (cu excepția acidului α -glutamic) se obțin de la Sigma, Poole, Doset U.K., iar acidul α -glutamic

1030

de la Fluka, Dorset U.K. Pentru măsura efectului inhibitorilor enzimatici și inhibiția serului asupra activităților aminopeptidazice H110D, se aleg doar aminoacizi hidrofobi (leucina sau fenilalanina) și încărcăți (acid α -glutamic) pNA cunoscuți a fi substraturi pentru aminopeptidazele -M(ApM) și respectiv -A(ApA) de mamifere.

1035

(a) *Cercetare pe microplacă*

Microplăci ELISA (Dynatech Immulon 1, Virginia, SUA) scobite se umple fiecare cu 250 μ l din fracțiunea de cercetat. Plăcile sunt apoi preincubate la 37°C timp de 10 min înainte de a adăuga 10 μ l de 25 mM substrat aminoacid *p*-nitroamilidă per godeu. Se măsoară apoi momentul zero al densității optice (OD) la 405 nm folosind un cititor de placă ELISA, și plăcile se incubează apoi la 37°C, 15...30 min. Se citește apoi OD finale, ca înainte, și se calculează schimbarea OD per minut per mg de proteină.

1040

(b) *Sensibilitate la inhibitori*

Metoda folosită pentru cercetarea enzimei este ca cea descrisă mai sus, la (a), cu excepția faptului că inhibitorii se adaugă la 250 μ l tampon + 10 μ l de ConA H110D 1 mg/ml, și se preincubează 10 min la 37°C înainte de adăugarea substraturilor (leucină-pNA sau acid α -glutamic-pNA). Procentul de inhibare se calculează după cum urmează:

1045

$$\frac{x-y}{x} \times 100 = \text{procentul de inhibare}$$

1050

unde $y = \Delta OD/\text{min}$ de enzimă cu inhibitor și

$x = \Delta OD/\text{min}$ de enzimă fără adăugare de inhibitor.

Se testează individual 9 compuși cu diferite clase de enzime de inhibare: Amastatin, Bestatin, (metalprotează aminopeptidază), 1,1+-fenantrolină, EDTA (metalprotează), fosforamidon, (metalprotează, termolizină, collagenază), aprotinin, (serinprotează), pepstatin, (protează aspartică), PMSF (serin și cisteinproteaza) și E64 (cistein proteaza). Amastatin, Bestatin, 1,10-fenantrolină, PMSF și pepstatin se obțin de la Boehringer-Mannheim. Fiecare inhibitor se folosește la două concentrații egale, sau mai mari decât maximul concentrațiilor recomandate de către BoehringerMannheim.

1060

(c) *Cercetarea antiserului inhibitor al enzimei*

Testul se face cum este descris mai sus la (a), cu excepția faptului că se pregătesc două plăci micro-ELISA. Într-o placă preincubată la 37°C timp de 15 min, 10 μ l ConA H110D (1 mg/ml) plus 10 μ l antiser de la fiecare oaie per godeu. A doua placă, cu 250 μ l HEPES/bicarbonat plus 10 μ l de fie fenilalanină-pNA, fie acid α -glutamic-pNA drept substrat pe godeu se preincubează, de asemenea, la 35°C timp de 15 min. Se adaugă apoi amestecurile ConA H110D-ser la amestecurile tampon substrat din cea de-a doua placă, cu ajutorul unei pipete multiple, se determină $\Delta OD/\text{min}$. În vederea cercetărilor, se calculează procentul de inhibare folosind formula din (b) de mai sus, unde:

1065

x reprezintă media $\Delta OD/\text{min}$ pentru godeurile care conțin enzima plus ser de la oile de control negative (vaccinate cu feritină splenică de la cal) și

1070

y reprezintă $\Delta OD/\text{min}$ pentru godeurile care conțin enzima plus ser de la oi individuale vaccinate cu H110D. În vederea corelării (fig. 18), procentul de protecție se calculează folosind formula din (b) de mai sus, unde x = medie de ouă eliminate prin fecale/g, fie media încărcării cu viermi paraziți a controalelor și y = ouă din fecale/g, eliminate în timpul experimentului sau încărcarea cu viermi paraziți a oilor individuale vaccinate cu H110D.

1075

Localizarea activității enzimice prin histochimie

Activitatea aminopeptidază se demonstrează pe 10 μ g de secțiuni criostatate de adult *Haemonchus contortus* folosind L-leucină 4-metoxi- β -naftalină și acid 1- α -glutamic 4-metoxi- β -naftilamidă ca substraturi, prin metodele lui Nachlas și colab., 1957, Nakane și colab., (1974) și Lojda și colab., (1980).

1080

Expresia recombinantului H110D în sistemul eucariot baculovirus celule de insectă

Construcția plasmidelor de expresie

Fragmentele 3,5 k PCR descrise mai sus, se generează prin amplificare între un adaptor oligo dT (care a conținut un sit Sall) și oligo 872, care reprezintă bazele numerele 30...49 din secvența M1AUS, și se clonează în vectorul pT7 Blue. Clona pT7 3.5...2 este orientată cu situsul BamHI al vectorului polilinker la terminația sa 5' și situsurile HindIII, XbaI și Sall la terminația 3'.

Secvența la terminația 5' este:

BAMHI x! ---- oligop 872 ----- !--3,5K -----
5' GG ATC CGA TTG CTG AAT CTA ACT CCA ATC C..... 3'
Leu Asn Leu Thr Pro Ile.....

Asterixul indică proeminența 3' dT/dA folosită pentru clonare în vectorul pT7Blue.

Clona 2 3,5 PCR se digeră cu HindIII (unicul sit în secvența vector polilinker la capatul 3' al genei 3,5 k) și capetele sunt umplute cu deoxinucleotide folosind ADNpolimeraza I (fragment Kleonow), conform cu Maniatis și colab., (1982). Un linker BamHI (5'CGCATCCG 3', New England Biolabs Catalog nr. 1021) este ligat la capetele teșite, și se aleg clone cu un extras sit BamHI, care permit ca o secvență a genei H110D cu lungimea integrală să fie excizată ca un fragment BamHI. Fragmentul BamHI se izolează prin electroforeză pe un gel de agaroză 6% g/v în tampon Tris-acetat, și se purifică ulterior folosind GENECLANT (BIO 101); această procedură se realizează de două ori. Fragmentul purificat este apoi ligat la tăiatul-BamHI, pBlueBacII fosfat (Invitrogen Corp.) și clonele purtătoare ale fragmentului orientat corect (adică cu capătul 5' al clonei 2 3,5 PCR plasat sub controlul promotorului poliedrinei baculovirale se determină prin digestia cu NheI și XbaI. Plasmidul rezultat se digeră parțial cu BamHI, și capetele se completează cum se descrie mai sus. Se adaugă un linker NcoI, conținând un ATG (5' CCCATGGG 3' New England Biolabs Catalog Nr. 1040) și amestecul este ligat. Clonele care au avut linkerul ligat la capătul 5' sit BamHI al clonei 2 3,5 PCR, mai degrabă la capatul 3', se determină prin digestie NcoI. Plasmidul rezultat, desemnat pBB3,5-2(N), este prezentat ca diagramă în fig. 19.

Această construcție rezultă din inserția unui ATG în cadru la capatul 5' al insertului clonă 2 3,5 PCR pentru inițierea translării. Secvența încurajatoare a acestui ATG de inițiere este

BamHI--NcoI link-BamHI ----- *! ----- oligo 872 ----- ! -----
5' GGATCCCC ATG GGG ATC CGA TTG CTG AAT CTA ACT CCA ATC
C--

Met Gly Ile Arg Leu Leu Asn Leu Thr Pro Ile

Proteina exprimată va fi lipsită de aminoacizii 2...9 ai secvenței H110D corespunzătoare, și va avea 3 aminoacizi ai secvenței linker imediat următori ATG-ului.

Generarea baculovirusului recombinat care conține secvențe H110D

Plasmidul pBB3,5-2(N) este transfectat în celule (sf9 *Spodoptera frugiperda* (de la Invitrogen Corp.), folosind virusul ADN liniar al poliedrozei nucleare la *Autographica californica* (ACNPV) și lipozomi cationici (Invitrogen Corp.). Modul de transfecție este conform instrucțiunilor fabricantului. Celulele se cultivă în mediu TC-100 (Sigma) suplimentat cu un ser fetal de vițel (CSL Ltd.; inactivat termic la 56°C, 45 de min și antibiotice (penicilină/streptomicină, gentamicină; CSL Ltd.). Se realizează, de asemenea, un control de transfecție folosind un plasmid pBB 3,5-2(N) cu ATG-ul inserat la capatul 3' al secvenței clonă 2 3,5 PCR. Plăcile recombinante se selectează pe baza faptului că vectorul pBlueBacII codifică și β-galactozidază *E.coli* (-gal), și se include x-gal în agaroză de acoperire la nivelul

recomandat. Se culege o selecție de plăci albastre și se supune la două runde ulterioare de purificare de placă, după care, în momentul infectării monostraturilor, se observă că nu au prezentat nici un fel de contaminare cu virusul de tip sălbatic care ar putea fi evidențiat prin prezența unor poliedre nucleare. Virusurile purificate se desemnează 3,5-2-P2A, P3A și P4A și se amplifică prin două infecții secvențiale ale celulelor sf9 utilizate mai înainte. O placă purificată de la controlul de transfecție se desemnează 3,5-2-rev. 1135

Cercetarea expresiei H110D în celulele de insecte infectate cu baculovirus recombinant

Se infectează monostraturi de celule sf9 (1×10^6 celule în vase de 25 cm²) cu virusuri 3,5-2, virusul de tip sălbatic (wt), cu un virus de control care exprimă β -gal, sau nu a fost infectate. După patru zile creșterea la 26°C, se detașează monostraturile prin scuturare ușoară, se recuperează celulele prin centrifugare (2000 rpm, 10 min), și peletele celulare se distrug prin trei cicluri înghețare-dezghețare. Lizatele se resuspendă în 500 μ l PBS și se cercetează prin activitate ApM, alicotii de 25 μ l prin testare pe microgodeu. 1140

Se supune electroforezei pe geluri SDS-poliacrilamidă 7% denaturate alicotii de 15 μ l (echivalenți 3×10^4 celule) din lizatele de mai sus. Unul dintre geluri se colorează apoi cu Coomassie Blue pentru testarea nivelurilor de expresie. Alt gel se pătează Western și pata se sondează cu anti-H110D (cum se descrie mai sus). 1145

Rezultate

Analiza clonelor imunopozitive

1150

Analiza anticorpilor purificați prin afinitate asupra M1

Se prepară și folosește pentru a sonda o pată Western a extractului H110D îmbogățit cu anticorpi specifici purificați prin afinitate pentru fiecare din cele cinci clone anticorp-pozitive. Așa cum se arată în fig. 8, toate 5 clonele par a recunoaște dubletul H110D. Totuși, reacția cu clona M1 a dat cel mai puternic semnal (fig. 8d) comparativ cu pata de control negative λ gt11 (fig. 8e). De aceea, această clonă a fost investigată în continuare. 1155

Analiza petei Northern Blot cu clona M1

Analiza petei Northern a mARN-ului de *Haemonchus contortus* sondat cu insertul M1 se prezintă în fig. 9. Se recunoaște o singură bandă MARN, la aproximativ 3,5kb. Aceasta este de mărime suficientă pentru a codifica o proteină de aproximativ 110 kd. 1160

Analiza secvenței clonei M1

Analiza digeratelor de restricție ale ADN-ului cu EcoRI arată insetul M1 de aproximativ 300 bp. Secvența ADN a fragmentului M1 se determină și este arătat în fig. 3. Fragmentul conține 295 bp, cu un cadru deschis de citire începând la baza nr. 3.

Analiza Northern Blot cu clona B1A

1165

Analiza petei Northern a mARN-ului *Haemonchus contortus* s-a sondat cu inserul B1A și este prezentată în fig. 9e. Ca și pentru M1, s-a recunoscut o singură bandă mARN, la aproximativ 3,5 Kb.

Secvențarea clonelor B1A și B2

Clonele B1A se secvențează (Secv. ID Nr. 2 și 3) și secvența întreagă (Secv. ID. 2) se prezintă aliniată la H11-1 (Secv. ID. Nr 19) și AustB1 (Secv. ID. Nr. 6) în fig. 5. Insertul este de 484 bp și are un ORF întreg de la prima bază. Cele 3 fragmente ale B2 care rezultă din digestie cu EcoRI se secvențează, și secvența completă pentru H11-2 este prezentată în fig. 4. Secvența are un ORF de la poziția 3 până la 213 bp, codonul stoc și regiunea netranslată care împerechează pe cea a secvenței produsului 2,5 kb PCR (Secv. ID Nr. 7). 1170

Expresia M1 și B1A în E.coli

1175

Când se clonează într-un vector de expresie GST, se obțin clone care exprimă fuziunea proteinelor de 38-40 Kd pentru M1 și 45 kb pentru B1A. Acestea concordă cu mărimea presupusă pentru acești inserti, permițând greutatea moleculară a glutathion-S-transferazei.

- 1180 Ambele fuziuni proteice reacționează foarte puternic pe pete Western cu anticorpi purificați prin afinitate pentru H110DE (fig. 11). Fuziunea proteinelor se exprimă sub formă de corpuri de incluziune insolubile.
- Răspunsuri ale anticorpilor în oi vaccinate cu fuziuni proteice M1-GST și B1A GST.*
- 1185 Se testează antiseruri de la oi injectate cu fuziuni proteice prin pătare Western contra preparate H110D. Atât GST-M1 cât și GST-B1A provoacă anticorpi care recunosc specific dubletul H110D (fig. 12). Seruri de oi de control negative nu recunosc dubletul H110D.
- Izolarea și caracterizarea clonelor selectate prin hibridizare cu insertul ADN M1 sau B1A*
- 1190 Clona confirmată pozitivă care hibridizează la sonda M1 se desemnează M1AUS (Secv. ID Nr. 5), Aust B1 (Secv. ID Nr. 6). Digestia de restricție a ADN-urilor plasmidice cu EcoRI indică un insert de mărime de aproximativ 900 bp pentru M1AUS și de aproximativ 1,6 kb pentru AustB1. Așa cum se arată în fig. 9b) și 9d), pe pete Northern, M1AUS și AustB1 hibridizează la mARN-ul de aceeași mărime (aproximativ 3,5 kb) cum au făcut M1 și B1A.
- 1195 *Analiza secvenței M1AUS*
- 1200 Secvențarea întregului fragment M1AUS se realizează folosind oligonucleotide sintetice pentru "walk along" ADN-ului de la fiecare capăt. Analizele secvenței obținute arată că insertul M1AUS este de 948 bp, cum se arată în fig. 3. Secvența (Secv. ID Nr. 5) începe cu ATG (care codifică metionina) și are un cadru deschis de citire (ORF) pe întreaga sa lungime. Secvența este cu 19 baze perechi mai mare decât secvența M1 la capătul 5' și cu 634 bp mai lungă la capatul 3'. Secvența comună pentru cele două clone (bazele 20 la 314) este identică exceptând două diferențe nucleotidice în poziția celui de-al III-lea codon. Compararea tuturor cadrelor de citire posibile la diverse baze arată că începând cu ATG-ul de la baza nr. 1, cadrul de citire prezintă omologie cu membrii unei familii de aminopeptidaze microzomale.
- 1205 *Secvența lui AustB1*
- 1210 Secvențarea integrală a fragmentului AustB1 se realizează folosind oligonucleotide sintetice pentru "plimbare de-a lungul" ADN-ului de la fiecare capăt. Secvența ADN (Secv. ID. Nr 6) este arătată în fig. 5. Clona de 1689 bp lungime și are un ORF de la restul 2. Această secvență formează partea lui H11-1, precum cea arătată în fig. 1. Translarea aminoacidă a acestei secvențe prezintă motivul sitului de legare a zincului caracteristic aminopeptidazelor.
- Amplificarea PCR a cADN-ului, mARN-urilor PCR H110D folosind primeri M1AUS*
- 1215 Se sintetizează cARN *Haemonchus contortus* folosind ca primeri oligo-dT conținând o secvență adaptor care facilitează clonarea și manipularea ulterioară a ADN-ului. Acest cADN se folosește apoi pentru a amplifica secvența M1AUS prin PCR, folosind ca primeri de terminare 5' o oligonucleotidă sintetică bazată pe pozițiile 865-885. Se amplifică un fragment PCR de aproximativ 2,5 kb. Aceasta este mărimea aproximativă, așteptată, a fragmentului, bazat pe mărimea cunoscută a mARN-ului și pe secvențele cADN ale aminopeptidazei de la mamifere.
- 1220 Un al doilea set de reacții PCR se realizează folosind un primer lângă capătul 5' al M1AUS (bazele 30-49). Se detectează 4 benzi pe un gel de agazoză. Cel mai mare dintre acestea, la 3,5 kb, corespunde mărimii presupuse pentru produsul PCR:
- Clonarea și secvențarea produselor PCR de 2,5 kb și 3,5 kb de la primeri M1AUS*
- 1225 Se clonează produsele PCR 2,5 kb și 3,5 kb și sunt destinate 2,5 PCR (Secv. ID. Nr. 7) și 3,5kb (Secv. ID. Nr. 8, 14 și 15 pentru clonele 2, 10 și respectiv 19). Pe peretele Northern 2, 5 PCR și 3,5 PCR (Clona 2, 3,5 PCR-2) hibridizează cu mARN de aproximativ 3,5 kb (fig. 9 e, f) în aceeași origine (respectând vârsta pentru *Haemonchus* care se folosește pentru obținerea de mARN) ca M1, B1A, M1AUS și AustB1.

Secvențarea integrală a clonelor se realizează prin "oligonucleotide walking". Așa cum se arată în fig. 1, secvența pentru produsul 2,5 kb (Secv. ID. Nr.7) este parte a H11-2 (Secv. ID Nr. 20) și secvența pentru produsul 3,5kb (Secv. ID. Nr. 8) este partea principală a H11-3 (Secv. ID. Nr. 21). Translațiile aminoacide ale ambelor aceste secvențe (arătate în fig. 6) motivul de legare a zincului His Glu Xaa Xaa His Xaa Trp (HEXXHXW) caracteristic aminopeptidazelor microzomale.

1230

Secvențarea clonelor PCR ale capătului 5'

Se sintetizează cADN folosind un primer care împerechează o secvență conservată din clona cADN AustB1, 2,5 PCR și 3,5 PCR (Secv. ID. Nr. 6, 7 și 8) care hibridizează cu mARM-ul pentru aceste secvențe aproximativ 1,3 de la capătul 5'. cADN-urile se prelucrează la capătul C de la capătul 5' și apoi se realizează reacții PCR cu un primer universal Anchor (A) pentru capătul 5' și trei primeri specifici pentru fiecare dintre secvențele AustB1 2,5 PCR și 3,5 PCR - clona 2 (Secv. ID Nr. 6, 7, 8) pentru capătul 3'. Fiecare reacție dă un produs de mărime presupusă, chiar sub 1,3 kb: 1301 bp (Secv. ID. Nr. 9), 1280 bp (Secv. ID. Nr. 10) și 1292 bp (respectiv Secv. ID. Nr. 11). Toate trei secvențele au o regiune netranslată la capatul 5' (fig. 2). Toate încep cu aceeași secvență de 22 bp (5' GGTTTAATTACC C AAGTTTGAG 3') care este cunoscută ca Spliced Leader Sequence 1 (SL1) și este prezentă în regiunea 5' netranslată a unei varietăți extinse de nematode Huang și colab., 1990. În secv. ID. Nr. 9 și 10, secvența SL1 este imediat înaintea ATG-ului de inițiere. În Secv. ID. Nr. 11 există 13 bp între SL 1 și ATG-ul de inițiere. Toate trei secvențele au ORF-uri complete.

1235

1240

1245

Secvențarea clonei PCR Aust B1 capăt 3'

Folosind un primer specific care împerechează pozițiile 1414-1438 din Aust B1 (Secv. ID. Nr. 6), produsul PCR dă o bandă precum cea presupusă de aproximativ 1,4 kb. Secvențarea bandei clonate dă secvențele Secv. ID. Nr. 12 și 13. Ele dau un ORF de la 1-615 bp și o regiune netranslată substanțial.

1250

Analiza secvenței produselor PCR clonate

În fig. 2 sunt prezentate compozite ale secvențelor descrise mai sus, desemnate H11-1, H11-2 și H11-3. Secvențele aminoacide presupuse de la acestea sunt cele din fig. 6a. Validitatea translărilor presupuse, ale secvențelor ADN prezentate, este confirmată, în principal, prin împerecherea cu secvențele aminoacide determinate prin degradare Edmond de la fragmente de clivaj CNBr și proteolitic (fig. 7). Astfel, 27 de resturi ale secvenței N-terminale de 29 resturi a H11S (Secv. ID Nr. 16) împerechează Hii-2 de la resturile 61-90 (fig. 7b). Împerecherea valinei (V) la poziția 78 și glicinei (G) la poziția 90 sunt caracteristice H11-2 deoarece H11-3 are asparagina (N) la poziția 90 și H11-1 are leucină (L) la poziția 86 (care corespunde poziției 78 din H11-2). Două resturi ale secvenței aminoacide N-terminale a H11-s (Secv. ID. 16) nu împerechează nici una dintre cele trei secvențe H110D prezentate aici. Sunt de remarcat, în special împerecherile exacte ale secvențelor PepA și B, foarte asemănătoare, dar distincte (descrise anterior în **WO 90/11086**) cu H11-2 și respectiv H11-1 în regiunea resturilor 540-555. În mod similar, în regiunea resturilor 450-470, PepD este o pereche exactă pentru H11-2, în timp ce asemănătoarea dar distinctă Pep E împerechează mai strâns H11-3.

1255

1260

1265

Prin exemplificare, secvența aminoacidă translatată, a uneia dintre secvențele de lungime integrală (H11-3), este comparată în fig. 6b cu două secvențe pentru aminopeptidaze microzomale, de mamifere. Omologia translației H110D cu aceste aminoptidaze este prezentată prin încercuirea aminoacizilor identici. Un motiv caracteristic al aminopeptidazelor microzomale este secvența aminoacidă HEXXHXW, care funcționează ca sit de legare pentru zinc (Jongeneel și colab., 1898; Vallee și colab., 1990); aceasta este arătată în fig. 6 prin asterixuri. Această secvență, care este prezentată, se află în translațiile H11-1, H11-2 și

1270

1275

H11-3 și este conservată în toate aminopeptidazele cromozomale. Alte trăsături pentru aminopeptidazele microzomale mamifere și *Haemonchus* sunt prezente într-o regiune intracelulară comparativ scurtă, o singură secvență transmembranară adiacentă la capătul N-terminal și câteva situri potențiale de glicozilare. Nivelurile de omologie (similarități de 52...55% și identității de 30...32%) ale H11-1, -2 și -3 față de aminopeptidazele microzomale de mamifere sunt prezentate în tabelul 2.

Analiza de pată Southern

Rezultatele petelor Southern ale ADN-ului genomic *H. contortus*, sondate cu diferite clone cADN H110D și produse PCR, sunt prezentate în fig. 10. Toate sondele prezintă benzi de hibridizare multiple, tipic pentru o familie multigenică. Cum era de așteptat, B1A și AustB1 prezintă origini de hibridizare similare pentru fiecare altă clonă, ca în cazul M1AUS de 3,5 kb PCR. Totuși, aceste origini sunt diferite notabil una de cealaltă și de aceea s-a văzut că sonda 2,5 kb PCR, chiar în condiții de stringență moderată (fig. 10 a), reflectă niveluri diferite de omologie între aceste trei cADN-uri.

Demonstrarea activităților aminopeptidazice asociate cu H110D

Activitatea aminopeptidazică microzomală, asociată cu H110D sau cu acele fracțiuni care conțin H110D, este prezentă în supernatantele de la ultracentrifugarea extractelor Thesit, în fracțiunea care leagă ConA (ConAH110D) și fracțiunile conținând H110D, obținute prin cromatografie de schimb ionic pe o coloană MonoQ (tabel 3).

Activitățile specifice, cu toate substratele testate, au crescut o dată cu creșterea purității H110D.

Activități enzimatică ale fracțiunilor de la o preparare tipică H110D

Tabelul 3

Fracțiune	Activități enzimatică specifice (O.D./min/mg/proteină)				
	fenilalanină-pNA	leucină-pNA	lizină-pNA	avid alfa glutamicpNA	metionină-pNA
Fosfat salin tamponat (PBS)	0,20	0,80	0,12	0,01	0,16
1% Tween 20/PBS	0,15	0,15	0,09	0,01	0,09
1% Thesit/PBS	1,94	1,25	0,57	0,54	1,91
ConA H110D	4,08	3,01	1,43	2,09	3,84
CamQ H110D	6,55	5,01	3,01	3,90	6,41

Efectele inhibitorilor aminopeptidazelor de mamifere asupra activităților aminopeptidazei H110D

Adăugarea inhibitorului bestatin (care inhibă aminopeptidaza microzoinală de mamifere) pentru ConA H110D la concentrația recomandată de către furnizor (Boehringer-Mannheim) a redus activitatea împotriva leucin-p-nitroanilidă cu aproximativ 70%. Acei inhibitori nu sunt specifici pentru metal protează sau aminopeptidaze ce nu au efecte inhibitoare asupra ratei de reacție. Inhibitorii cunoscuți că efectuează metalproteineazele sau aminopeptidazele au avut efect asupra ratelor de reacție, așa cum este prezentat în tabelul 4. Cel mai eficient inhibitor este fenantrolina 5mM.

Inhibarea activităților aminopeptidazice ale H110D folosind diferiți inhibitori de protează

Inhibitor	Procent de inhibiție		
	concentrație	substrat acid <i>alfa</i> glutamic- <i>p</i> -nitroanilină ¹	substrat leucină- <i>p</i> -nitroanilină ²
Amastatin	10M	0	61
	50M	0	66
Bestatin	50M	23	63
	100mM	35	68
EDTA	1mM	17	8
	10mM	21	16
1,10 fenantrolină	1mM	78	78
	10mM	85	87
Fosfoamidon	10M	1	0.8
	50M	1	7

¹un substrat de aminopeptidază-A de mamifer

²un substrat de aminopeptidază-M de mamifer

Subfracționarea H110D

Distribuția activităților asociate cu fracțiunile de la cromatografia de schimb ionic a ConA H110D pe MonoQ este prezentată în fig. 13a și SDS-PAGE fracțiunilor în fig. 13b.

Ulterior, activitatea enzimatică se asociază cu subfracțiunile H110D, separate prin recircularea focalizării izoelectrice în curgere liberă (fig. 14 și 15). La valori pt (pH 4,5) aceste subfracțiuni conțin numai benzile mai mari care completează dubletul H110D. Fracțiunile intermediare conțin ambele benzi. Banda mai mică poate fi obținută, de asemenea, ca o fracțiune separată, prin cromatografie de schimb ionic pe MonoQ, folosind instalația Pharmacia SMART[®]. Toate aceste subfracțiuni leagă anticorpii de oaie la H110D purificată prin afinitate de proteină exprimată prin clonă λ gt11 M1, în timp ce anticorpii eluați de la λ gt11 fără nici un insert nu se leagă, (fig. 14c). Toate subfracțiunile leagă anticorpi monoclonali de șoarece, desemnați TS 3/19,7 (fig. 14 c) care se leagă, de asemenea, la proteina recombinantă, exprimată de către clona M1. Toate sub-fracțiunile arată activitate aminopeptidazică microzomală (fig. 15c), deși această activitate este comparativ scăzută la fracțiunile obținute la cele mai ridicate și cele mai scăzute pl-uri. Această activitate mai scăzută poate fi atribuită concentrațiilor mai scăzute de proteină, efectelor extremelor de pH în timpul subfracționării, sau unei necesități de a fi prezente, pentru activitate maximă, atât benzile mai mari, cât și cele mai mici.

Vaccinarea cu componente separate de H110D

Benzile separate, superioare, și mai joase, obținute prin focalizare izoelectrică în curgere liberă sau prin cromatografie de schimb ionic, induc formarea anticorpilor protectori când se injectează la oi, așa cum se exemplifică în următorul experiment. Componentele separate de H110D se atribuie la 30 de oi în vârstă de aproximativ 6 luni, la 5 grupuri de câte 6, astfel încât fiecare grup se asociază după domeniul de greutate al oilor. Fiecare animal se injectează cu un total de 150 μ g proteină dată în 3 doze egale, cum este descris

în Munn și colab., (1992) și Tavernor și colab., (1992 a, b) pe o perioadă de 54 zile. Animalele din grupul L se injectează cu banda mai joasă (mai mică) a dubletului H110D, acelea din grupul U cu banda superioară, U+L cu recombinantul benzilor superioare și mai joase, D cu două benzi (neselectate) obținute prin focalizare izoelectrică la valori de pH intermediare și drept control (grupul C) feritină splenică de cal (o proteină antigenică neînrudită). Oile sunt injectate cu 10000 larve infectioase, la 3 săptămâni după cea de-a treia injecție. Desfășurarea experimentului este prezentată pe scurt în fig. 16. Injectarea oricăreia dintre cele trei subfracțiuni a redus complet eliminarea de ouă în 90% din încercări și a redus numărul total de viermi cu 63...84%, toate prezentând o diferență semnificativă ($p < 0,05$) față de controale, folosind analize statistice non-parametrice. Reducerea (70...80%) numărului de viermi femele a fost mai mare decât reducerea numărului de viermi masculi, exceptând reducerea numărului de viermi masculi la oile injectate cu recombinantul benzilor superioare și mai joase, unde la $p < 0,07$ pentru ambele sexe, reducerile au fost simplificate ($p < 0,05$).

Vaccinarea cu H110D și H11A

O formă scurtată, solubilă în apă a H110D (H11S; care păstrează activitatea sa enzimatică) se poate obține de la molecula nativă prin tratament cu elastază. Această formă se dovedește a conține activitate enzimatică asemenea ApM și se îmbogățește pentru activitate asemenea ApA, un extract Thesit al peleței digerate cu elastază (H11A) (Vezi tabelul 5)

Tabelul 5

Raport	
Aminopeptidază-M (leucină-pNA)	Aminopeptidază-A (Acid alfa-glutamic-pNA)
H110D	1,44:1
H11S	26,0:1
H11A	0,48:1

Experimentul arată că vaccinarea oilor atât cu H11S, cât și cu H11A, asigură protecție împotriva provocării sau infecției cu *Haemonchus*. H11S și H11A se atribuie la 3 grupe de câte 6, 18 oi cu vârsta de aproximativ 8 luni, gruparea făcându-se după domeniul de greutate a oilor. Fiecare animal se injectează cu un total de 100 μ g proteină dată în 2 doze egale, cum este descris în Munn și colab., (1992) și Tavernor și colab., (1992 a, b) peste o perioadă de 23 de zile. Animalele din grupul A se injectează cu H11A, cele din grupul S cu H11S și cele din grupul C cu feritină splenică de cal (o proteină antigenică neînrudită) drept control negativ. Oile sunt apoi injectate cu 10000 larve infectioase, 25 zile după cea de-a doua injecție și experimentul se termină la 34...36 zile postinfecție. Desfășurarea experimentului este prezentată pe scurt în fig. 17. Injectarea de H11S reduce complet, prin încercări, cu 89% eliminarea de ouă, și numărul total de viermi, cu 76%. Injectarea de H11A reduce complet, prin încercări, 98% din eliminarea de ouă, și reduce numărul total de viermi cu 84%. Aceste rezultate arată o diferență semnificativă ($p < 0,05$) față de controale, folosind analize statistice nonparametrice.

Inhibarea activităților aminopeptidazice a H110D de către anticorpi

Soluții conținând H110D se incubează cu seruri de la oi individuale injectate cu fracțiuni conținând H110D sau de la oile control. Soluțiile se cercetează apoi pentru activități aminopeptidazice folosind ca substrat fenilalanina-pNA sau acid α -glutamic-pNA. Gradul de inhibare al activității (maximum 80%) se corelează cu nivelul protecției arătat de către fiecare oaie individual de la care s-a obținut ser. (Vezi fig. 18).

Localizarea activității enzimei

Se examinează activitatea aminopeptidazică pe secțiuni înghețate de adulți *Haemonchus contortus*. Așa cum se arată în fig. 19, activitățile enzimatice aminopeptidazice sunt localizate la suprafața lumenului intestinal. Proteina H110D este, de asemenea, găsită în mod specific în această localizare.

1415

Expresia de H110D (3,5 PCR clona 2) folosind sistemul eucariot baculovirus-celule de insecte

Se recoltează celule infectate și se cercetează activități aminopeptidazice folosind ca substraturi fenilalanina, leucina, metionina și lizina, toate pNA. Cercetarea este complicată prin observația că celulele de insecte posedă o activitate aminopeptidazică cu o preferință marcată pentru lizină amidă-legată. Cu toate acestea, extractele celulare conțin exprimat H110D suplimentar clivată, leucina, metionina și fenilalanina -pNA, în ordinea preferinței.

1420

Greutatea moleculară imunoreactivitatea proteinei H110D (3,5 PCR clona 2) exprimate

Probe de extracte celulare infectate sau de control se supun electroforezei pe un gel poliacriamidă 7,5%, care apoi se colorează cu Coomassie Blue. Lizatele celulare infectate 3,5-2-p3A și 3,5-2-P4A, au amândouă o bandă la aceeași mărime ca H110D, care a migrat direct sub β -gal co-exprimată, care are greutate moleculară de 120 kb. Această bandă nu este prezentată în nici un lizat de control negativ. (Ea este, de asemenea, absentă din lizatul P2A, care nu exprimă activitate enzimatică).

1425

1430

Se pătează Western un duplicat de gel și se sondează cu anti-H110D. (fig. 21). Se obține o imunoreacție pozitivă foarte puternică pentru banda de 110 kb, exprimată de către 3,5-2-P3A și 3,5-2-P4A, și pentru dubletul nativ H110D într-un traseu de control care conține ConAH110D și, în același timp, nu se vede nici o reacție în oricare din traseele de control negative.

1435

LISTA DE SECVENȚE

(1) INFORMAȚIE GENERALĂ:

1440

(i) SOLICITANT:

(A) NUME: AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL

(B) STRADA: BABRAHAM HALL

(C) ORAȘ: BABRAHAM

(D) STAT SAU PROVINCIE: CAMBRIDGESHIRE

1445

(E) ȚARĂ: REGATUL UNIT

(F) COD POȘTAL: 2B2 4AT

TELEFON: 223 - 832312

TELEX: 223 - 837952

(ii) TITLUL INVENȚIEI: POLIPEPTIDE AVÂND ACTIVITATE DE ENZIMĂ AMINOPEPTIDAZICĂ HELMINTICĂ, MOLECULE DE ACID NUCLEIC CE LE CODIFICĂ, PROCEDU DE PRODUCERE ȘI COMPOZIȚIE DE VACCIN CU ACESTE POLIPEPTIDE.

1450

(iii) NUMĂR DE SECVENȚE: 24

1455

(v) FORMA CITIBILĂ PE COMPUTER :

(A) TIP MEDIU: dischetă

(B) COMPUTER: PC compatibil IBM

(C) SISTEM DE OPERARE: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE:

1460

Informatia pentru Secv.ID Nr.1

Caracteristici de secvență:

Lungime: 295 baze perechi

Tip: acid nucleic

Impletire: dublă

Topologie: lineară

Descrierea secvenței :Secv.ID Nr.1

1465	CGCGGACATT GCTGAATCTA ACTCCAATCC GTCTTATTGT CGCATTATTT CTAGTAGCTG	60
	CTGCAGTCGG CCTCTCTATT GGTCTCACCT ATTACTTTAC TCGCAAAGCG TTCGATACCT	120
	CAGAAAAGCC AGGGAAGGAT GATACTGGTG GCAAGGACAA AGACAATTCT CCCTCTGCCG	180
1470	CGGAACACT TCTTCCAAGT AATATAAAAC CATTGTCTTA CGACTTGACG ATCAAAACAT	240
	ATCTACCTGG TTATGTGGAC TTCCCACCGG AGAAAAACCT CACATTTCGAC GGGCG	295

Informatia pentru Secv.ID Nr. 2

Caracteristici de secvență:

Lungime: 484 baze perechi

Tip: acid nucleic

Impletire: dublă

Topologie: lineară

Descrierea secvenței: Secv.ID Nr. 2

1480	GCAATATCAG GATTCAATAC AATTTTGGAC TTTTTCGGCA GCGAACCCGA ATCTCAATGG	60
	GCTTCGGAAT ACATGCGAAA ACTGATGAAG CCAATTATG ACAAGAGTAG CATCAAGTTT	120
	ATAGCGGAGA ACTACAAAAA AGATTGCGTT TTCTTCAAAA ATAATCTCCA AATAGCTGTT	180
	ATTGACACAT ACTGTGGTCT TGGAGGCAAA GAATGTCTTG AAGAAATGAA AAAGCTTTTT	240
	GACAAGGAGG TCATGAAATG TCAACCTGGT CAGCAAGCGA CCGACTGCGT AAAGGTAAC	300
	GCTCCTCTCC GAAAACTGT TTAATGCTAT GGGGTCCAGG AAGGCGGTGA TGAGGCATTC	360
	GACAAGGTGA TGGAACTATA TAATGCGGAA CAAGTGCAGT TGGAGAAAGA CAGTCTACGT	420
1485	GAAGCATTGG GATGCCATAA AGACGTTACA GCTCTAAAGG GACTTCTTAT GCTGGCTTTG	480
	GATC	484

Informatie pentru Secv.ID Nr. 3

Caracteristici de secvență:

Lungime : 216 baze perechi

Tip: acid nucleic

Impletire: dublă

Topologie: lineară

Descrierea secvenței: Secv.ID.Nr.3

1495	ACCTGGTCAG CAAGCGACCG ACTGCGTAAA GGTAAGTGTCT CCTCTCAAAA CTGTTTACTG	60
	CTATGGGGTC CAGGAAGGCG GTGATGAGGC ATTCGACAAG GTGATGGAAC TATATAATGC	120
	GGAACAAGTG CAGTTGGAGA AAGACAGTCT ACGTGAAGCA TTGGGATGCC ATAAAGACGT	180
	TACAGCTCTA AAGGGACTTC TTATGCTGGC TTTGGA	216

Informatia pentru Secv.ID Nr. 4

Caracteristici de secvență:

Lungime: 581 baze perechi

Tip: acid nucleic

Impletire: dublă

Topologie: lineară

RO 117709 B1

Descrierea secvenței: Secv.ID Nr. 4

GGGAGGAAAT	CACTGCGAGC	TTGGAAACAG	AACACAGAGC	AGTTGATAAA	GTGGTCGGCG	60	
CTTGTTGCAC	AGGAATTCGC	TCCCAACAAC	AAATAGATCA	GCTGAAGAAG	AATCTACAGA	120	1505
AGAACAATGC	GCAGGCTAAG	AAGTTCCATA	AAATTGCCTG	GATCAAGAAA	CATTTTCACA	180	
GATTATCGGA	ATTCTTCAAG	AGAGCAAGAT	CATAGCTTTT	CACACTGAGC	TCCAATTTTA	240	
ACGTCTTCAA	ACTAGGAGAC	AGTTTTGCTG	AAAAGTCAGT	TTCACATTTT	CCGTTTGAAT	300	
GCCATCCATT	CGAATACAAC	CAACCCCAT	TTAAGTACCT	TTCATTACACA	GTGATTACTA	360	
AATTTCGAAT	ATATTATGAA	GCTTGATCT	TGAACGTTAT	GATCGGTGAC	TTTCAATTTA	420	
TAGAGCTCAC	TCTCCATTTT	GTAGCTGTGA	TGACTTGCAT	TTAAGACCCA	CCATTTACCA	480	
GCCTATAATC	TTTCCCCAAT	ACATTCCAAA	CTCCGATCAC	CTCCACCGCT	GACAATGCCC	540	1510
AGATTTGTTT	CTTTGTCTGC	TATCCATCTA	ACTGTTTCGA	T		581	

Informatie pentru Secv.ID Nr. 5

Caracteristici de secvență:

Lungime: 948 baze perechi

Tip: acid nucleic

Impletire: dublă

Topologie: lineară

1515

Descrierea secvenței: Secv.ID Nr.5

ATGACGTCGC	AGGGGAGAAC	GCGGACATTG	CTGAATCTAA	CTCCAATCCG	TCTTATTGTC	60	
GCATTATTTT	TAGTAGCTGC	TGCAGTCGGC	CTCTCTATTG	GTCTCACCTA	TTACTTTACT	120	1520
CGCAAAGCGT	TCGATACCTC	AGAAAAGCCA	GGGAAGGATG	ATACTGGTGG	CAAGGACAAA	180	
GACAATTCTC	CCTCTGCGGC	GGAAGTACTC	CTTCCAAGTA	ATATAAAACC	ATTGTCTTAC	240	
GACTTGACGA	TCAAAACATA	TCTACCTGGT	TATGTGGACT	TCCCACCGGA	GAAAAACCTC	300	
ACATTTCGATG	GGCGTGTGGA	AATATCAATG	GTTGTAATTG	AGCCAACAAA	GAGTATCGTA	360	
CTCAATTCAA	AGAAGATCTC	TGTAATACCC	CAAGAATGTG	AACTGGTATC	GGGCGATAAA	420	
AAATTCGAAA	TTGAAAGTGT	AAAGGAGCAC	CCAAGACTGG	AAAAGGTTGA	GTTTCTTTATC	480	
AAAAGCCAAC	TGGAAAAAGA	TTCACAAATC	TTGCTCAAGT	CGGCTTACAT	CGGTCTCATC	540	1525
AGCAACAGCC	TTGGTGGAAAT	CTACCAGACC	ACTTATACCA	CCCCGGATGG	CACCCCTAAG	600	
ATCGCTGCAG	TTTCACAAAA	TGAGCCCAT	GATGCTCGTC	GAATGGTACC	ATGCATGGAT	660	
GAACCGAAAT	ACAAAGCAAA	CTGGACCGTT	ACTGTCATTC	ATCCAAAAGG	CACCAAAGCC	720	
GTCTCGAATG	GAATCGAAGT	GAACGGAGAT	GGAGAGATCA	GTGGTGATTG	GATCACATCG	780	
AAGTTCTTGA	CTACTCCACG	GATGTCATCC	TACTTGTGG	CAGTTATGGT	TTCAGAATTT	840	
GAATACATCG	AAGGTGAAAC	AAAGACGGGT	GTTCCGGTTC	GTATATGGTC	ACGCCCAGAG	900	
GCAAAGAAGA	TGACACAATA	TGCTCTGCAA	TCTGGTATCA	AGTGCATA		948	1530

Informatia pentru Secv. Nr. 6

Caracteristici de secvență:

Lungime: 1689 baze perechi

Tip: acid nucleic

Impletire: dublă

Topologie: lineară

Descrierea secvenței: Secv.ID Nr.6

1540	AATTCGGGCT	CGTCCGGAAG	CTATGAAGAT	GACAGAATAT	GCCATGATAG	CTGGAATCAA	60
	ATGTTTGGAT	TACTATGAGG	ACTTCTTCGG	GATCAAATTC	CCACTTCCAA	AACAAGATAT	120
	GGTTGCTCTT	CCTGACTTCT	CATCTGGTGC	TATGGAGAAC	TGGGGTCTCA	TCACATACAG	180
	GGAGGGTTCC	GTGCTCTACG	ATGAAAACCT	CTACGGACCA	ATGAATAAGG	AGCGGGTTGC	240
	AGAAGTGATC	GCGCACGAAC	TTGCACATCA	GTGGTTCCGT	AATTTGGTCA	CGATGAAGTG	300
	GTGGGATAAC	CTATGGCTGA	ACGAAGGATT	CGCGTCATTG	GTGGAATACA	TCGGAGCCGA	360
	CTTCATCAGC	GATGGTCTAT	GGGAAATGAA	AGATTTCTTC	CTGCTGGCAC	CGTACACAAG	420
1545	TGGTATTACG	GCTGATGCAG	TAGCTTCAAG	CCATCCGCTT	TCCTTCAGAA	TAGATAAGGC	480
	TGCAGATGTA	TCAGAAGCGT	TCGATGATAT	CACATACCGT	AAAGGAGCAT	CCGTTCTTCA	540
	AATGCTATTG	AATTTAGTTG	GGGACGAAAA	TTTCAAGCAG	TCTGTTTCGC	GTTACCTCAA	600
	GAAGTTTTCA	TATGATAATG	CGGCTGCTGA	AGATTATGG	GCAGCATTG	ACGAAACCGT	660
	CCAAGGTATA	ACCGGACCTA	ATGGTGGACC	ATTGAAAATG	TCCGAGTTTG	CGCCACAATG	720
	GACAACTCAG	ATGGGGTTCC	CTGTTCTTAC	TGTCGAGTCG	GTTAACGCAA	CGACTTTGAA	780
	AGTCACCCAA	AAACGATACA	GGCAGAACAA	GGATGCAAAG	GAACCAGAGA	AGTACCGTCA	840
	TCCAACCTAT	GGGTTCAAAT	GGGATGTTCC	TCTGTGCTAT	CAGGAAGATG	AACAGCAAGT	900
1550	GAAAAGAACT	TGGTTAAAAA	GAGAGGAACC	GCTCTATTTC	CATGTAAGCA	ATTCTGATTC	960
	GTCAGTTGTG	GTGAATGCCG	AACGTCGTGC	TTTTTGCCGA	TCAAACATATG	ACGCTAACGG	1020
	TTGGAGGAAC	ATTATGAGAA	GACTCAAGCA	GAATCATAAG	GTCTATGGTC	CACGAACAAG	1080
	AAACGCTCTC	ATAAGTGATG	CGTTTGACGC	AGCTGCAGTT	GAGGAAATGA	ATTACGAGAC	1140
	CGTATTTGAA	ATGCTCAAAT	ACACCGTGAA	AGAAGAGGAT	TACTTACCAT	GGAAGGAGGC	1200
	AATATCAGGA	TTCAATACAA	TTTTGGACTT	TTTCGGCAGC	GAACCCGAAT	CTCAATGGGC	1260
	TTCCGAATAC	ATGCGAAAAC	TGATGAAGCC	AATTTATGAC	AAGAGTAGCA	TCAAGTTTAT	1320
1555	AGCGGAGAAC	TACAAAAAAG	ATTGCTTTT?	CTTCAAAAAT	AATCTCCAAA	TAGCTGTTAT	1380
	TGACACATAC	TGTGGTCTTG	GAGGCAAAGA	ATGCTCTGAA	GAAATGAAAA	AGCTTTTTGA	1440
	CAAGGAGGTC	ATGAAATGTC	AACCTGGTCA	GCAAGCGACC	GACTGCGTAA	AGGTAACGTC	1500
	TCCTCTCCGA	AAAACGTGTT	ACTGCTATGG	GGTCCAGGAA	GGCGGTGATG	AGGCATTGCA	1560
	CAAGGTGATG	GAACATATATA	ATGCGGAACA	AGTGCAAGTTG	GAGAAAGACA	GTCTACGTGA	1620
	AGCATTGGGA	TGCCATAAAG	ACGTTACAGC	TCTAAAGGGA	CTTCTTATGC	TGGCTTTGGA	1680
	TCCGAATTC						1689

1560 Informatie pentru Secv.ID Nr. 7

Caracteristici de secvență:

Lungime: 2472 baze perechi

Tip: acid nucleic

Impletire: dublă

1565 Topologie: lineară

Descrierea secvenței: Secv.ID Nr. 7

	ACGGGTGTTT	GGTTCCGTAT	ATGGTCTCGA	CCAGAGGCCA	AACGAATGAC	GGCATAACGT	60
	TTGGATGCTG	GCATCAGATG	CCTGGAGTTC	TATGAGAAGT	TCTTTGACAT	AAAATTCCCT	120
	CTGGAAAAAC	AAGATATGAT	TGCTCTTCCT	GATTTACCCG	CTGGTGCCAT	GGAAAACTGG	180
1570	GGCCTTATCA	CTTATAGAGA	GGATTCTCTC	CTATACGATG	AAAAAATTTA	TGCACCGATG	240
	AATAAACAGC	GGGTTGCTCT	CGTAGTTGCT	CACGAGCTTG	CTCATCAGTG	GTTCCGGCAAT	300
	CTGGTCACAC	TGAAGTGGTG	GGATGATACG	TGGTTGAACG	AAGGTTTTGC	AACATTTGTT	360
	GAGTATCTTG	GAATGGACGA	AATTAGCCAC	AACAATTTCA	GAACGCAAGA	TTTCTTCTTG	420
	CTCGATGGAA	TGGATCGCGG	AATGAGAGCT	GACTCGGCAG	CATCGAGCCA	TCCGCTTTTCG	480
	TTTAGGATTG	ACAAAGCGGC	AGAAGTTGCC	GAAGCCTTTG	ACGATATTTT	ATACGCCAAG	540
	GGAGCGTCAG	TTCTCACTAT	GCTACGGGCT	TTGATTGGAG	AGGACAATTA	CAGGAATGCT	600
	GTTGTGCAAT	ACCTCAAGAA	GTTCTCTTAC	AGCAATGCAC	AAGCAGCCGA	TCTGTGGAAC	660
1575	GTCTTCAATC	AAGTTCTCAA	AGGCTTTAAC	CGTCTGACG	GCAACGTCAT	GAAAAATCGAC	720
	CAATTTACCG	ATCAGTGGAC	GTATCAGATG	GGTTATCCTG	TGCTTAAAGT	AGAAGAATTT	780
	AATGCGACCG	CCCTAAAGGT	TACGCAGACC	CGGTACAAGA	CAAATAAAGA	CCCCTTGGA	840

RO 117709 B1

CCAGAGAAAT	ATCGTAATCC	AAAATACGGG	TTCAAGTGGG	ATGTTCCCT	ATGGTATCAG	900
GAAGGCAATA	GCAAAGAGGT	GAAGCGAACA	TGGCTAAAAA	GAGATGAACC	GCTGTACTTG	960
AACGTCAACA	ATCGGGATAC	ATCCCTTGTG	GTGAACGCTG	ATCGACATGG	ATTTTATCGA	1020
CAAACTATG	ATGCCAACGG	TTGGAAAAAG	ATAATCAAGC	AGCTCAAGAA	AGATCACAAG	1080
GTCTTCGGTC	CAAGGACAAG	GAACGCTATC	ATAAGCGATG	CATTTGCTGC	AGCTACGATT	1140
GACGCAATCG	ACTATGAAAC	TGTAATCGAA	CTACTTGAAT	ATGCCAAAAA	TGAAGAGGAA	1200
TTCTTGCCCTT	GGAAGGAAGC	TCTGTCCGGC	ATGTTTCGCAG	TTTTAAAGTT	CTTCGGTAAT	1260
GAGCCCGAGA	CAAAACCAGC	TAGAGCTTAC	ATGATGAGCA	TATTAGAACC	GATGTATAAT	1320
AAGAGCAGCA	TTGATTACAT	CGTCAAGAAT	TATTTGGATG	ATACGTTATT	CACAAAAATT	1380
AATACTCAA	AGGATATCAT	TGATGCATAT	TGTTCCCTTG	GATCAAAGGA	CTGTATAAAG	1440
CAATATAAGG	ATATCTTCTA	CGATGAGGTT	ATGCCCAAGT	GTAAGGCCGG	GGAAGCAGCA	1500
ACCAAATGCG	TTAAGGTTTC	CGCTCCTCTT	CGAGCCAATG	TTTACTGTTA	TGGTGTACAG	1560
GAAGGTGGTG	AAGAAGCTTT	TGAAAAAGTG	ATGGGGCTGT	ATCTAGCAGA	AGATGTTCAA	1620
CTGGAGAAGG	GTATCCTGTT	CAAAGCCTTG	GCATGCCACA	AAGATGTTAC	AGCTCTAAAA	1680
GAACCTCTTT	TGCGAGCCCT	GGACCGTAAA	TCGTCGTTTG	TGCGTCTTCA	GGATGTCCCT	1740
ACCGCTTTCC	GTGCTGTATC	TGAAAAACCT	GTGGGCGAAG	AATTCATGTT	CAATTTCTTA	1800
ATGGAGAGAT	GGGAGGAAAT	CACTGCGAGC	TTGGAAACAG	AACACAGAGC	AGTTGATAAA	1860
GTGGTCGGCG	CTTGTTGCAC	AGGAATTCGC	TCCCAACAAC	AAATAGATCA	GCTGAAGAAT	1920
CTACAGAAGA	ACAATGCGCA	GGCTAAGAAG	TTCGGCTCAT	TCACCCAGGA	AATCGAAAAA	1980
GGAGAACATA	AAATTGCCTG	GATCAAGAAA	CATTTTCACA	GATTATCGGA	ATTCTTCAAG	2040
AGAGCAAGAT	CATAGCTTTT	CACACTGAGC	TCCAATTTTA	ACGTCTTCAA	ACTAGGAGAC	2100
AGTTTTGCTG	AAAAGTCAGT	TTCACTTTT	CCGTTTGAAT	GCCATCCATT	CGAATACAC	2160
CAATAATACC	ATTTTAAGTA	CCTTTCATTC	ACAGTGATTA	CTGAATTTTCG	AATATATCAT	2220
GAAGCTTGTA	TCTTGAACGT	TATGATCGGT	GACTTTCAAT	TTATAGAGCT	CACCTCTCAT	2280
TTTGATAGCTG	TGATGACTTG	CATTTAAGAC	CCACCATTTA	CCAGCCTAGA	ATCTTTCCCC	2340
AATACATTCC	AAACTCCGAT	CACCTCCACC	GCTGACAATG	CCCAGATTTG	TTTTTTTGTG	2400
TGCTATCCAT	CTAACTGTTT	CGATCGCCGG	TTGTTTGTC	ATTGCTTATC	TGATAAATAT	2460
TGACGTTGGT	GT					2472

Informatie pentru Secv, ID Nr. 8

Caracteristici de secvență:

Lungime: 3305 baze perechi

Tip: acid nucleic

Implementare: dublă

Topologie: lineară

Descrierea secvenței: Secv. ID Nr. 8

GCTGAATCTA	ACTCCAATCC	GTCTTATTGT	CGCATTATTT	CTAGTAGCTG	CTGCAGTCGG	60
CCTCTCTATT	GGTCTCACCT	ATTACTTTAC	TCGCAAAAGC	TTTCGATACCT	CAGAAAAAGCC	120
AGGGAAGGAT	GATACTGGTG	GCAAGGACAA	AGACAATTCT	CCCTCTGCGG	CGGAACTACT	180
CCTTCCAAGT	AATATAAAAC	CATTGTCTTA	CGACTTGACG	ATCAAAACAT	ATCTACCTGG	240
TTATGTGGAC	TTCCACCGG	AGAAAAACCT	CACATTCGAT	GGGCGTGTGG	AAATATCAAT	300
GGTTGTAATT	GAGCCAACAA	AGAGTATCGT	ACTCAATTCA	AAGAAGATCT	CTGTAATACC	360
CCAAGAATGT	GAACTGGTAT	CGGGCGATAA	AAAACCTCGA	ATTGAAAGTG	TAAAGGAGCA	420
CCCAAGACTG	GAAAAGGTTG	ACTTTCTTAT	CAAAAACCAA	CTGGAAAAAG	ATCAACAAAT	480
CTTGCTCAAG	GTCGGCTACA	TCGGTCTCAT	CAGCAACAGC	TTTGGTGGAA	TCTACCAGAC	540
CACCTATACC	ACCCCGGATG	GCACCCCTAA	GATCGCTGCA	GTTTCACAAA	ATGAGCCCAT	600
AGATGCTCGT	CGAATGGTAC	CATGCATGGA	TGAACCCGAA	TACAAAGCAA	ACTGGACCGT	660
TACTGTCAAT	CATCCAAAAG	GCACCAAAAG	CGTCTCGAAT	GGAATCGAAG	TGAACGGAGA	720
TGGAGAGATC	AGTGGTGATT	GGATCACATC	GAAGTTCTTG	ACTACTCCAC	GGATGTATC	780
CTACTTGTTG	GCAGTTATGG	TTTCAGAAAT	TGAATACATC	GAAGGTGAAA	CAAAGACGGG	840
TGTTCCGGTT	CGTATATGGT	CACGCCAGAA	GGCAAAGAAG	ATGACACAAT	ATGCTCTGCA	900
ATCTGGTATC	AAGTGCATAG	AATTCTACGA	AGATTTCTTT	GATATCAGAT	TCCCTCTGAA	960
GAAACAAGAT	ATGATTGCCC	TTCTTGATT	CTCTGCCGGT	GCCATGGAGA	ATTGGGGCCT	1020
CATCACTTAC	AGGGAACACT	CTTTGTTGTA	CGATGACAGA	TTCTATGCAC	CGATGAATAA	1080
ACAGCGAATT	GCTCGCATTG	TTGCTCATGA	GCTTGCTCAT	CAGTGGTTTCG	GCGACTTGGT	1140
TACGATGAAG	TGGTGGGATA	ATTTGTGGTT	GAATGAAGGT	TTTGCAAGAT	TCACAGAAAT	1200
TATTGGAGCT	GGTCAGATAA	CTCAAGATGA	CGCCAGAATG	AGGAACTACT	TCCTGATTGA	1260
TGTACTTGAA	CGCGCTTTGA	AAGCTGATTC	GGTAGCGTCA	AGCCATCCAC	TTTCCTTCAG	1320
AATCGACAAA	GCTGCAGAAG	TTGAAGAAGC	CTTTGATGAT	ATCACATACG	CCAAAGGAGC	1380
TTCTGTTCTT	ACTATGCTGA	GAGCCTTGAT	TGGAGAAGAA	AAACATAAGC	ATGCAGTATC	1440
GCAGTACCTC	AAGAAGTTCT	CGTATAGCAA	TGCAGAAGCG	ACTGATCTAT	GGGCAGTTTT	1500
TGATGAAGTT	GTCAGTGACC	TCGAAGGTCC	AGACGGCAAA	CCTATGAAAA	CCACAGAGTT	1560

1625	TGCAAGTCAG	TGGACGACTC	AGATGGGCTT	CCCAGTTATT	TCCGTAGCAG	AGTTTAACTC	1620
	GACTACTTTG	AAATTAACGC	AAAGTCGATA	TGAGGCGAAT	AAAGACGCTG	TGGAGAAAGA	1680
	GAAGTACCGT	CACCCGAAAT	ACGGATTTAA	ATGGGATATT	CCACTGTGGT	ATCAGGAAGG	1740
	CGATAAGAAG	GAGATAAAGC	GAACATGGTT	GAGAAGAGAT	GAACCGCTTT	ACTTGCATGT	1800
	TAGTGATGCT	GGCGCTCCCT	TTGTGGTGAA	CCGAGACCGC	TATGGATTTT	ATCGACAAAA	1860
	TCATGACGCT	AATGGTTGGA	AAAAGATAAT	CAAGCAGCTC	AAGGATAATC	ATGAGGTTTA	1920
	CAGTCCCCGG	ACAAGGAATG	TCATCATTAG	CGATGCGTTT	GCTGCGGCTG	CAACTGACGC	1980
	AATTGAGTAT	GAGACTGTAT	TTGAACTTCT	GAATTATGCC	GAAAAAGAAA	CGGAATATCT	2040
	ACCATTAGAA	ATCGCAATGT	CCGGGATCTC	TTCGATTTTG	AAATACITCC	CTACCGAGCC	2100
1630	AGAGGCAAAG	CCAGCTCAAA	CATACATGAT	GAACATATTG	AAACCGATGT	ATGAAAAAAG	2160
	CAGTATCGAC	TTCATTGCCA	ATAACTACAG	AAATGACAAG	CTGTTTTTCC	AAATCAACCT	2220
	CCAAAAAGAT	GTCATTGATA	TGTTCTGCGC	CCTCGGATCG	CAAGACTGCA	GGAAGAAATA	2280
	TAAAAAACTT	TTCGATGACG	AAGTCATGAA	CAAAATGCAGG	GATGGTCAAG	CAGCAACCGA	2340
	ATGCGTAAGA	ATCGCCGCTC	CTCTCCGATC	AAGTGTITAT	TGTTATGGTG	TGAAGGAAGG	2400
	CGGTGATTAT	GCTTCCGACA	AGGTGATGGA	GCTTTATACG	GCCGAAACAC	TCCGCTTAGA	2460
	AAAAGACTTC	CTACGCCTAG	CATTGGGATG	TCATAAAGAT	GTTACTGCTT	TGAAAGGACT	2520
	TCTCTTGCGG	GCTCTGGACA	GGAAATTCGT	GTTTCGTACGT	ATGCAGGATA	TCCCAAGTGC	2580
1635	TTTCAACGAT	GTAGCAGCAA	ATCCTATTGG	CGAAGAATTC	ATTTTCAATT	TCCTTATTGA	2640
	GAGATGGCCA	GATATCATTG	AAAGTATAGG	AACGAAGCAC	ACATATGTTG	AGAAAAGTGAT	2700
	ACCAGCCTGC	ACTTCAGGAA	TCCGCTCACA	ACAGCAGATT	GACCAGCTGA	AGAACTGCA	2760
	GAAAAATGGC	ATGAACGCTC	GTCAAATTCG	TGCATTTCAT	AAAGCAATCG	AACGAGCACA	2820
	AAATAGGGTG	GATTGGATTA	AAAAAACATT	CCAAAAATTA	GCGGCTTTCT	TCAAGAAAGC	2880
	CACCTTGTA	TTCGAATTAC	ATTGCCAGTA	ATCCAGATCT	TAAAGTTCAT	GAAGGAATAT	2940
	GACAGGGAAC	TGACTGTCTG	TTGGTCACTG	TGCCACTGAA	TGGAAGTTTT	TACCTACAAA	3000
1640	AATTTTTATC	GTTATATTTG	CCTTCCGCTG	GGGGTCATTG	TTGTCACTTG	AATAGTAAAC	3060
	AAAGCTCAGT	ATTGGCAACC	TGAGAACAAT	ATTACTTTTC	CTTCATCAAA	TTGTTATCTT	3120
	CCCTATACCC	TCTTCCTAAC	TGAATTCCGA	AATTTGTTCA	TATTCGTTTG	TAGTCTGTTG	3180
	CTCAGAACAC	TTTCTCCTCA	ATAGCTTCTT	GTTTGTTTTT	TTTTTGATTG	TATTGATCGT	3240
	TTTACAATTG	TATAGATTAG	TTATCTTATA	AATATTGATG	GTAAAAAATA	AAAAAATAAA	3300
	AAAAA						3305

Informatie pentru Secv.ID Nr. 9

1645

Caracteristici de secvență:

Lungime: 1301 baze perechi

Tip: acid nucleic

Impletire: dublă

Topologie: lineară

1650

Descrierea secvenței: Secv.ID Nr. 9

1655	GGTTTAATTA	CCCAAGTTTG	AGATGACAGC	AGAGGAGAGT	CAGGAGCAGG	AGACGCAGCA	60
	ACCACGAAAA	AATACAGTGC	TACGGCTCAC	CCCAATCAAG	TCTCTCTTTG	CTTTGTTAGT	120
	GGTAGCTGCT	GCCGTGCGCC	TCTCAATCGG	TCTCACCTAT	TACTTTACAA	GGAAGGCTTT	180
	TGATACTACT	GGCGGAAATG	GAAAAGGGGA	TCAACCTATT	GTCGATGATA	ATTCCCCATC	240
	AGCTGAAGAA	TTACGTCTCC	CAACAACCAT	AAAACTTTTG	ACATACGACT	TAGTAATCAA	300
	AACGTATCTG	CCAAACTATG	TAAACTATCC	ACCTCAGAAA	GATTTGCTCA	TTGATGGGAC	360
	TGTGGTGATT	GCTATGGAAG	TTGTGGAGCC	AACAAAGTCT	ATTGTGCTCA	ACTCGAAAAA	420
	TATTCCTGTA	ATTGCAGACC	AGTGCGAACT	GTTTTCTAAC	AACCAAAAAC	TCGACATCGA	480
	AAAGGTTGTG	GATCAGCCAA	GGCTGGAGAA	AGTCGAATTC	GTTTTGAAGA	AAAAGCTGGA	540
	GAAGAATCAG	AAAATCACGC	TCAAGATTGT	ATACATTGGC	CTTATCAACG	ACATGCTTGG	600
	AGGACTTTAT	CGAACAACTT	ACACGGATAA	AGATGGTACA	ACCAAGATTG	CTGCATGCAC	660
	TCATATGGAA	CCGACGGACG	CCCGTCTTAT	GGTCCCCCTG	TTCGACGAGC	CGACGTTTAA	720
1660	GGCAAACTGG	ACTGTGACTG	TGATTTCATC	GAAGGGCACC	AGTGCCGTGT	CGAATGGAAT	780
	AGAAAAGGGA	GAAGGAGAAG	TCTCTGGCGA	TTGGGTACAA	ACCAGATTTC	ATCCAACCCC	840
	GCGAATGCCT	TGCTATTTGA	TTGCTCTTGT	GATTTCCGAA	TTTAAGTACA	TTGAAAAATTA	900
	TACGAAAAGC	GGTGTTTCGAT	TCCGAATATG	GGCTCGTCCG	GAAGCTATGA	AGATGACAGA	960
	ATATGCCATG	GTAGCTGGAA	TCAAATGCTT	GGATTACTAT	GAGGACTTCT	TCCGGATCAA	1020
	ATTCCCTCTT	CCAAAACAAG	ATATGGTTGC	TCTTCCTGAC	TTCTCATCTG	GTGCTATGGA	1080
	GAAGTGGGGT	CTCATCACAT	ACAGGGAGGG	TTCGGTACTA	TACGATGAAA	ACCTCTATGG	1140
	ACCAATGAAT	AAGGAGCGGG	TTGCAGAACT	GATTGCACAC	GAGCTTGAC	ATCAGTGGTT	1200
1665	CGGTAATTTG	GTCACGATGA	AGTGGTGGGA	TAACCTATCG	CTAAACGAAG	GATTTCGCGTC	1260
	ATTCGTAGAA	TACATTGGAG	CCGACTTCAT	CAGCGATGGT	C		1301

RO 117709 B1

Informatie pentru Secv.ID Nr. 10

Caracteristici de secvență:

Lungime: 1280 baze perechi

Tip: acid nucleic

Impletire: dublă

Topologie: lineară

1670

Descrierea secvenței: Secv.ID Nr.10

GGTTTAATTA	CCCAAGTTTG	AGATGACGGC	GGAGTGGCAG	AAGCGTCGAA	TCTTGGGCTT	60	
CTCACCTATC	AGCCTACTTT	GTACATTATT	TGTATTAGCT	GCTGCCGTTG	GACTCTCCAT	120	1675
TGGTCTTACC	TATTACTTCA	CTCGTAAAGC	ATTTCGATACC	ACACAAAAAG	AACAGAAGGA	180	
TGACAGTGGT	GGTAAAGAAA	AGGATAATTC	TCCTTCTGCA	GAAGAACTAC	TTCTTCCAAC	240	
GAACATAAAA	CCAGTCTCGT	ACGACTTGAA	CATCAAAACA	TATCTACCGG	GTTACGTGAA	300	
CTTTCCACCA	GAAAAGAATC	TCACATTTGA	TGCCCCATGTG	GAGATTGCTA	TGGTTGTGGT	360	
TGAGCCTACA	AATAGTATTG	TGCTGAACTC	GAAGAAAATC	ACTTTGGCAC	AAGGAGGATG	420	
CGAACTGTTT	TCAGGTAATC	AGAAAATTGA	CATCGAAAAGT	GTAAAGATGC	AGGAAAGACT	480	
TGACAAGCTT	GAGATTACCC	TCAAAAATCA	GCTGCAAAAA	GATCTGAAAA	TCCTGCTCAA	540	
GATCACTTAC	ACCGGCCCTA	TTAGCGACAC	TCTCGGTGGG	CTCTACCACT	CCATCTACAC	600	1680
TGATAAGGAC	GGAAAACTA	AGATCGTTGC	TGTTTCACAA	AATGAACCAT	CAGACGCTCG	660	
TCGTATAGCG	CCATGCTTTG	ACGAACCGAA	GTACAAGGCA	ACATGGACTG	TCACCGTCTG	720	
TCATCCCAAA	GGTACAAAGG	CTGCATCGAA	CGGCAATTGAA	GCAAATGGAA	AAGGGGAGCT	780	
CAAGGGTGAT	TGGATAACGT	CTAAATTTAA	AACTACCCCA	CCGATGTCGT	CCTATTTATT	840	
GGCTATTATT	GTTTGTGAAT	TTGAATACAT	TGAAGGATTT	ACAAAAACAG	GTGTACGGTT	900	
CCGTATATGG	TCTCGACCAG	AGGCGATGGC	AATGACGGGA	TATGCCCTGG	ATGCTGGCAT	960	
CAGATGTCTG	GAGTTCTATG	AGAGATTCTT	TGACATCAAA	TTCCCTCTGG	AAAAACAAGA	1020	1685
TATGATTGCT	CTACCTGATT	TCACCGCTGG	TGCTATGGAA	AACTGGGGTC	TTATCACTTA	1080	
CAGAGAGGAT	TCTCTTCTAT	ACGATGAGAA	AATTTATGCG	CCGATGAATA	AGCAGCGGGT	1140	
TGCTCTCGTA	GTTGCACACG	AGCTTGCTCA	TCAGTGGTTC	GGCAATCTGG	TCACATTGAA	1200	
GTGGTGGGAT	GATACGTGGT	TGAACGAAGG	TTTTGCGACA	TTTGTGTAAT	ATCTTGAAT	1260	
GGACGAAATT	AGCCACAACA					1280	

Informatie pentru Secv.ID Nr. 11

Caracteristici de secvență:

Lungime: 1293 baze perechi

Tip: acid nucleic

Impletire: dublă

Topologie: lineară

1690

Descrierea secvenței: Secv.ID Nr.11

GGTTTAATTA	CCCAAGTTTG	AGGGTCTCCA	TCTAGATGAC	GTCGCAGGGG	AGAACGCGGA	60	
CATTGCTGAA	TCTAACTCCA	ATCCGTCTTA	TTGTGCGATT	ATTTCTAGTA	GCTGCTGCAG	120	
TCGGCCTCTC	TATTGGTCTC	ACCTATTACT	TTACTCGCAA	AGCGTTTCAT	ACCTCAGAAA	180	
AGCCAGGGAA	GGATGATACT	GGTGGCAAGG	ACAAAGACAA	TTCTCCCTCT	GCGGCGGAAC	240	
TACTCCTTCC	AAGTAATATA	AAACCATTGT	CTTACGACTT	GACGATCAAA	ACATATCTAC	300	
CTGGTTATGT	GGACTTCCCA	CCGGAGAAAA	ACCTCACATT	CGATGGGCGT	GTGGAAATAT	360	
CAATGGTTGT	AATTGAGCCA	ACAAAGAGTA	TCGTACTCAA	TTCAAAGAAG	ATCTCTGTAA	420	1700
TACCCCAAGA	ATGTGAACTG	GTATCGGGCG	ATAAAAAACT	CGAAATTGAA	AGTGTAAGG	480	
AGCACCCAAG	ACTGGAAGAG	GTTGAGTTTC	TTATCAAAAG	CCAAGTGGAA	AAAGATCAAC	540	
AAATCTTGCT	CAAGGTCGGC	TACATCGGTC	TCATCAGCAA	CAGCCTTGGT	GGAATCTACC	600	
AGACCACTTA	TACCACCCCG	GATGGCACCC	CTAAGATCGC	TGCAGTTTCA	CAAAATGAGC	660	
CCATAGATGC	TCGTGGAATG	GTACCATGCA	TGGATGAACC	GAAATACAAA	GCAAACCTGA	720	
CCGTTACTGT	CATTATCCCA	AAAGGCACCA	AAGCCGTCTC	GAATGGAATC	GAAGTGAACG	780	
GAGATGGAGA	GATCAGTGCT	GATTGGATCA	CATCGAAGTT	CTTGACTACT	CCACGGATGT	840	
CATCCTACTT	GTTGGCAGTT	ATGGTTTCAG	AATTTGAATA	CATCGAAGGT	GAAACAAAGA	900	1705
CGGGTGTTCC	GTTCCGTATA	TGGTCACGCC	CAGAGGCAAA	GAAGATGACA	CAATATGCTC	960	
TGCAATCTGG	TATCAAGTGC	ATAGAAATCT	ACGAAGATT	CTTTGATATC	AGATTCCCTC	1020	
TGAAGAAACA	AGATATGATT	GCCCTTCTCT	ATTTCTCTGC	CGGTGCCATG	GAGAAATGGG	1080	
GCCTCATCAC	TTACAGGGAA	AACTCTTTGT	TGTACGATGA	CAGATTCTAT	GCACCGATGA	1140	
ATAAACAGCG	AATTGCTCGC	ATTGTTCTCT	ATGAGCTTGC	TCATCAGTGG	TTCCGGCACT	1200	
TGGTTACGAT	GAAGTGGTGG	GATAATTTGT	CGTTGAATGA	ACGTTTTCGA	AGATTACACG	1260	
AATTCACCTG	AGCTGGTCAG	ATAACTCAAG	ATG			1293	1710

Informatie pentru Secv.ID Nr. 12

Caracteristici de secvență:

Lungime: 746 baze perechi

Tip: acid nucleic

Impletire: dublă

Topologie: lineară

Descrierea secvenței: Secv.ID Nr. 12

	CTTGAAGAAA	TGAAAAAGCT	TTTTGACAAG	GAGGTCATGA	AATGTCAACC	TGGTCAGCAA	60
	GCGACCGACT	GCGCGAAGGT	AACTGCTCCT	CTCCGAAAAA	CTGTTTACTG	CTATGGGGTC	120
1720	CAGGAAGGCG	GTGATGAGGC	ATTCGACAAG	GTGATGGAAC	TATATAATGC	GGAACAAGTC	180
	CAGTTGGAGA	AAGACAGTCT	ACGTGAAGCA	TTGGGATGTC	ATAAAGACGT	TACTGCTCTA	240
	AAGGGAAGTC	TTATGCTGGC	GTTGGATCGG	AATTCGTCT	TTGTGCGTCT	TCAAGATGCT	300
	CATGATGTGT	TTAACATTGT	ATCCAGAAAT	CCTGTTGGAA	ACGAACGTCT	GTTCAATTTT	360
	CTCACAGAGC	GATGGGAAGA	GATACCTGAA	AGTTTGTCAA	TACGACACAG	ATCAGTTGAT	420
	CGAGTGATCA	AAGCCTGTAC	TCGAGGACTA	CGATCCAGGG	AACAAGTACA	ACAGTTGAAG	480
	AATCTATACA	AAAATGACAA	GCGTGCTCGC	GAATACGGTG	CATTTGGTGG	GGCAATAGAA	540
	AGATCGGAAC	ACAGAGTCAA	ATGGATTGAG	AAACATTTCC	GAAAACTAGC	AGCTTTCTTC	600
1725	AAAAAATCTA	ATTCATAATT	CTGAAATGGC	TATAACTAGC	ACACTGGATA	GTTGTCTCGA	660
	ATCATCCAAA	AAGATTAATG	ATGTTTTTTT	ACTAGATAAT	ATGGAGATAT	TCTGTAAATT	720
	TGTCATCGAT	TCAAGTGTCT	GTATTG				746

Informatie pentru Secv.ID Nr. 13

Caracteristici de secvență:

Lungime: 1274 baze perechi

Tip: acid nucleic

Impletire: dublă

Topologie: lineară

Descrierea secvenței: Secv.ID Nr.13

1735	TCTTGAAGAA	ATGAAAAAGC	TTTTTCGACGA	AGAGGTCATG	AAAAAATGTA	GACCTGGTCA	60
	GCAAGCGACC	GACTGCGTAA	AGGTAAGTGC	TCCTCTCCGA	AAAACTGTTT	ACTGCTATGG	120
	GGTCCAGGAA	GGCGGTGATG	AGGCATTCTGA	CAAGGTGATG	GAACATATATA	ATGCGGAACA	180
	AGTCCAATTG	GAGAAAGACA	GTCTACGTGA	AGCATTGGGA	TGTCATAAAG	ACGTTACTGC	240
	TCTAAAGGGA	CTTCTTATGC	TGGCTTTGGA	TCGGAATTTCG	TCATTTGTGC	GTCTTCAAGA	300
	TGCTCATGAT	GTGTTTAACA	TTGTATCCAG	AAATCCTGTT	GGAAACGAAC	TGCTGTTCAA	360
	TTTCCTCACA	GAGCGATGGG	AAGAGATACT	TGAAAGTTTG	TCAATACGAC	ACAGATCAGT	420
	TGATCGAGTG	ATCAAAGCCT	GTAATCGAGG	ACTACGATCC	AGGGAACAAG	TACAACAGTT	480
1740	GAAGAATCTA	TACAAAAATG	ACAAGCGTGC	TCGCGAATAC	GGTGCAATTTG	GTGGGGCAAT	540
	AGAAAGATCG	GAACACAGAG	TCAAATGGAT	TGAGAAACAT	TTCCGAAAAC	TAGCAGCTTT	600
	CTTCAAAAAA	TCTAATTCAT	AATTCTGAAA	TGGCTATAAC	TAGCACACTG	GATAGTTGTC	660
	TCGAATCATC	CAAAAAGATT	AATGATGTTT	TTTTACTAGA	TAATATGGAG	ATATTCTGTA	720
	AATTTGTCTAT	CGATTCAAGT	GTCTGTATTG	CAGCCACATT	ACATATCTCG	ATGGTTCTGT	780
	GAATTTTGTGA	TGGAATTATT	TTCTCCTCAA	AATAGACACT	ATGCGCTAAC	TCCCATTTAT	840
	ACCAATCTTT	GAGAGAAATC	TTTTGCAATA	TACCCTAAAT	AGCCCTTGGG	AACTAGCTTT	900
1745	TTTCATTATT	GTAATTTTTG	TACTCTTCAA	ATGACGTATT	TCCAACATGA	CACATTCTCA	960
	GTGATTTACT	CGAGTAATTT	TATTCTTCTC	AATTGCAGTG	CCTTATTGTT	ATTCGCTTTG	1020
	AGACTTTGTA	GCTCAACTGT	TTTCTGCCCT	GCTGTCTTCT	TCTCTTTATC	TACTACTTCA	1080
	GTGATGAACT	TACCTGAAGT	TGTAGGTTTT	AAGAAAGAAA	TAACATATTTT	CCATAACTCA	1140
	TCTTCATGCC	ATTGTTCTTT	GGACTTTCTC	ATGCTTCACA	TTGTAGAGAT	ATTTACTAAA	1200
	AATGGAAATTC	TAATTTTCGT	TTACTTACAT	AAAAATCACT	TATTGCCTAA	AAAAAATAAA	1260
	AAAAAAAAAA	AAAA					1274

RO 117709 B1

Informatie pentru Secv.ID Nr. 14

1750

Caracteristici de secvență:

Lungime: 3296 baze perechi

Tip: acid nucleic

Impletire: dublă

Topologie: lineară

1755

Descrierea secvenței: Secv.ID Nr. 14

GCTGAATCTA	ACTCCAATCC	GTCTAATTTT	TGCATTATTT	CTAGTAGCTG	CTGCAGTCCG	60
CCTCTCTATT	GGTCTCACCT	ATTACTTTAC	TCCGAAAGCG	TTCGATACCT	CAGAAAAGCC	120
AGGGAAGGAT	GATACTGGTG	GCAAGGGCAA	AGACAATTCT	CCCTCTGCGG	CGGAACTACT	180
TCTTCCAACC	AATATAAAAC	CATTGTCTTA	CGATTTGACG	ATCAAAACAT	ATCTACCTGG	240
TTATGTGAAC	TTCCCAACCG	AGAAGAATCT	CACATTTCGAT	GGGCGTGTGG	AAATATCAAT	300
GGTTGTAATT	GAGCCAACAA	AGAGTATCGT	GCTCAATTCA	AAGAAGATCT	CTGTGATACC	360
CCAAGAATGT	GAACCTGGTAT	CGGGCGATAA	AAAACACGAA	ATTGAAAGTG	TAAAGGAGCA	420
CCCAAGACTG	GAAAAGGTCG	AGTTTCTTCT	TAAGAACCAA	CTGGAAAAAG	ATCAACAAAT	480
CTTGCTCAAG	GTCCGGCTATA	TCCGCCCTCAT	CAGCAACAGT	CTTGGAGGAA	TCTACCAGAC	540
CACCTTACACC	ACCCCGAATG	GCACCCCTAA	GATCGCTGCA	GTTTCACAAA	ATGAGCCCAT	600
AGATGCTCGT	CGAATGGTAC	CATGCATGGA	CGAACCGAAA	TACAAAGCAA	ACTGGACCGT	660
TACTGTCAAT	CATCCAAAAG	GCACCAAAGC	CGTCTCGAAT	GGAATCGAAG	TGAACGGAGA	720
TGGAGAGATC	AGTGGTGATT	GGATCACATC	GAAGTTCTTG	ACTACTCCAC	GGATGTCAAT	780
CTACTTGTGG	GCAGTTATGG	TTTCAGAATT	TGAATACATT	GAAGGTGAAA	CAAGGACGGG	840
TGTCCGGTTC	CGCATATGGT	CACGCCCCAGA	GGCCAAAGAG	ATGACAAAAC	TTGCTTTGGA	900
TTATGGTATC	AAATGCATAG	AGTTCTACGA	AGATTTCTTT	GATATCAAAT	TCCCTCTGAA	960
AAAACAAGAT	ATGATCGCCC	TTCTGTGATT	CTCAGCAGGA	GCCATGGAGA	ACTGGGGTCT	1020
TATCACTTAC	AGGGAAAACT	CTTTGTTGTA	CGATGACAGA	TTCTATGCAC	CGATGAATAA	1080
ACAGCGAATT	GCTCGCATTG	TTGCTCATGA	GCTTGCCCAT	CAGTGGTTTG	GGGACTTGGT	1140
TACAATGAAG	TGGTGGGATA	ATCTGTGGTT	GAATGAAGGT	TTTGCAAGAT	TCACGGAATT	1200
CATTGGAGCT	GGTCAGATAA	CTAAAGATGA	CGCCAGAATG	AGGAACTACT	TTCTGATTGA	1260
TGTACTTGAA	CGCGCTTTGA	AAGCTGATTC	GGTAGCGTCA	AGCCATCCAC	TTTCTTTCAG	1320
AATCGACAAA	GCTGCAGAAG	TTGAAGAAGC	CTTTGATGAT	ATCACATACG	CCAAAGGAGC	1380
TTCTGTTCTT	ACTATGTTGA	GAGCCTTGAT	TGGAGAAGAA	AAACATAAGC	ATGCAGTATC	1440
GCAGTACCTC	AAGAAGTTCT	CGTATAGCAA	TGCAGAAGCG	ACTGATCTAT	GGGCAGTTTT	1500
CGATGAAGTT	GTCAGTGACG	TGGAAGGTCC	AGACGGGCAA	CCTATGAAAA	CCACGGAAAT	1560
TGCAAGTCAG	TGGACGACTC	AGATGGGCTT	CCCAGTTATT	TCCGTAGCAG	AGTTTAACTC	1620
GACTACTTTG	AAATTAACGC	AAAGTCGATA	TAAGGCGAAT	AAAGACGCTG	TGGAGAAAGA	1680
GAAGTACCGT	GATCCGAAT	ACGGATTTAA	ATGGGATATT	CCATTGTGGT	ATCAGGAAGG	1740
CGATAAGAAG	GAGATAAAGC	GAACATGGCT	GAGAAGAGAT	GAACCGCTTT	ACTTGCATGT	1800
TAGTAATCCT	GGTGCTCCAT	TTGTGGTGAA	CGCAGACCGC	TATGGATTTT	ATCGACAAA	1860
TCATGACGCT	AATGGTTGGA	AAAAGATAAT	CAAGCAGCTC	AAGGACAATC	ATGAGGTTTA	1920
TAGTCCTCGG	ACAAGGAATG	TCATCATTAG	CGATGCGTTT	GCTGCAGCCG	CAACTGACGC	1980
AATTGAGTAT	GAGACTGTTT	TTGAACTTCT	GAAATATGCC	GAAAAAGAAA	CGGAATACCT	2040
ACCGTTGGAA	ATAGCAATGT	CCGGGATCTC	TTCGATTTTG	AAGTACTTCG	GTACCGAGCC	2100
GGAAGCAAAG	CCAGCTCAAG	TGTACATGAT	GAACATATTG	AAGCCGATGT	ATGAAAAAAG	2160
CAGTATCGAG	TTCAATTACCA	ATAACTACAG	AAACGACACG	CTGTTTTTCC	AAATCAACCT	2220
CCAAAAGGAT	GTCGTTGATA	TGTTCTCGCG	CCTTGATCG	CAAGACTGCA	GGCAGAAATA	2280
TAAAAAACTT	TTCCGATGACG	AAGTCATGGC	GAAATGCAGG	GATGGTCAAG	CAGCAACCGA	2340
ATGCGTGAGA	ATCGCCGCTC	CTCTCCGATC	AAGTGTTTAT	TGTTATGGTG	TGAAGGAAGG	2400
CGGTGATTAT	GCTTTTCGACA	AGGTGATGGA	GCTTTTATACG	GCCGAAACAC	TTGCCCTAGA	2460
AAAAGACTTC	CTACGCCTAG	CATTAGGATG	TCACAAAGAT	GTTACTGCTT	TGAAAGGACT	2520
TCTCTTGCGG	GCTCTGGACA	GGAATTCGTC	ATTTCGTACGT	ATGCAGGATA	TCCCAAGTGC	2580
TTTCAACGAT	GATAGCAGCA	ATCCTATTGG	CGAAGAATTC	ATTTTCAATT	TCCTCATTTA	2640
GAGATGGCCA	GATATCATTT	AAAGTATAGG	AACGAAGCAC	ACATATGTTG	AGAAAGTGAT	2700
ACCAGCCTGC	ACTTCAGGAA	TCCGCTCACA	ACAGCAGATT	GACCACTGTA	AGAATCTGCA	2760
GAAAAATGGC	ATAAATGCTC	GTCAATTTGG	TGCATTTCGAT	AAAGCAATCG	AACGAGCACA	2820
AAATAGGGTG	GATTGGATTA	AAAAACATTT	CCAAAAATTA	GCGCTTTTCT	TCAAGAAAGC	2880
CACCTTGATG	TTTGAATTAC	GTCGCCATTA	ATCCAGATCT	TAAAGCTCGC	TAAGGAATAT	2940
GTGGGAACCT	ACTGTGTGTT	GGTTACTGTT	CCACTGAATG	GAAGTTTTTA	CCCACAAAAA	3000
TTTTTACCAT	TTGCCTTCCA	TGAGGGGTCA	TTGTTGTCAC	TTGAATAGTA	AACAAAGCTC	3060
AGTATTAGGA	CCCAGTGATC	AATATTACTT	TTGCTTCATC	AAATTGTTAC	CTTCTCTATA	3120
CCCTCTTCCT	ACCTGAATTC	AGAAATTTGT	TCATATTCGT	TTGTAGTCTG	TTGCTCAGAA	3180
CACCTTCTCC	TCGATAGCTT	TTTGTTTTGTT	TTTCTTTTGA	TTGTATTGAT	CGTTTTACAA	3240
TTGTATAGAT	TAGTTATCTG	ATAAAATATG	ATGGCTAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAA	3296

1760

1765

1770

1775

1780

1785

1790

Informatie pentru Secv.ID Nr. 15

Caracteristici de secvență:

1795

Lungime: 3319 baze perechi

Tip: acid nucleic

Impletire: dublă

Topologie: lineară

Descrierea secvenței: Secv.ID Nr.15

1800	GCTGAATCTA	ACTCCAATCC	GTCTAATTTT	TGCATTATTT	CTAGTAGCCG	CTGCAGTCGG	60
	CCTCTCTATT	GGTCTCACCT	ATTACTTTAC	TCGCAAAGCG	TTCGATACCT	CAGAAAAGCC	120
	AGGGAAAGAT	GATACTGGTG	GTAAAGACAA	AGATAATTCT	CCCTCTGCCG	CGGAACTACT	180
	TCITCCAAAC	AACATAAAAC	CATTGTCTTA	CGATTTGACA	ATCAAAACAT	ATCTACCTGG	240
	TTATGTGAAC	TTCCCACCGG	AGAAGAACTCT	CACATTTGAT	GGGCGTGTCT	AAATTTCAAC	300
	GGTTGTCTAT	GAGCCAACAA	AGAGTATCGT	GCTCAATTCA	AAGAAGATCT	CAGTAATACC	360
	CCCTGAATGT	GAACTGGTAT	CGGGCGGTAA	AAAACTCGAA	ATCGAAAATG	TAAAGGATCA	420
1805	CCCAAGACTG	GAAAAGGTTG	AGTTTCTTCT	TAAGAACCAA	CTGGAAAAAG	ATCAACAAAT	480
	CTTGCTCAAG	GTTGCCTACA	TCGGCCTCAT	CAGCAACAGC	CTTGGCGGAA	TCTACCAGAC	540
	CACCTACACA	ACCCCGGATG	GCACCCCAAA	GATCGCTACA	GTGTCACAAA	ATGAGCCCAT	600
	AGATGCTCGT	CGGATGGTGC	CATGCATGGA	TGAACCGAAA	TACAAAGCGA	ATTGGACCGT	660
	TACTGTCTAT	CATCCAAAAG	GTACAAAAGC	CGTCTCGAAT	GGCATCGAAA	CGAACCGAGA	720
	TGGAGAGATC	AGTGGTGATT	GGATTACGTC	GAAGTTCTTG	ACTACTCCGA	GGATGTCATC	780
	CTACTTGTTG	GCAGTTATGG	TATCAGAAAT	TGAATTTATC	GAGGGTAAAA	CAAAGACAGA	840
	TGTTCCGGTC	CGTATATGGT	CACGCCCAAG	GGCCAAGAAG	ATGACAAAAC	TTGCTTTGGA	900
1810	TTATGGTATC	AAATGCATAG	AGTTCTACGA	AGATTTCTTT	GATATCAGAT	TCCCTTTAAA	960
	GAAACAAGAT	ATGATCGCCC	TTCTTGATT	CTCAGCAGGA	GCCATGGAGA	ACTGGGGTCT	1020
	TATCACCTAC	AGGGAAAACC	CTTTGTTGTA	CGATGACAGA	TTCTATGCAC	CGATGAATAA	1080
	ACAGCGAATT	GCTCGCATTG	TTGCTCATGA	GCTTGCCCAT	CAGTGGTTTG	GCGACTTGGT	1140
	TACGATGAAG	TGGTGGGATA	ATCTGTGGTT	GAATGAAGGT	TTTGCAAGAT	TCACAGAATT	1200
	CATTGGAGCT	GGTAAGATAA	CTGAAGATGA	CGCCAGAATG	AGGAACTACT	TCCTGATTGA	1260
	TGTACTTGAA	CGCCGGTTGA	AAGCTGATT	CGTAGCGTCA	AGCCATCCAC	TTTCCTTCAG	1320
	AATCGACAAA	GCTGCAGAAG	TTGAAGAAGC	GTTTGATGAT	ATCACATACG	CCAAAGGAGC	1380
1815	TTCTGTTCTT	ACGATGCTGA	GAGCGTTGAT	CGGAGAGAGAA	AAACATAAGC	ATGCGGTATC	1440
	GCAGTATCTC	AAGAAGTTCT	CGTATAGCAA	TGCAGAAGCG	ACTGATCTAT	GGGCAGTTTT	1500
	CGATGAAGTT	GTCAGTATG	TGGAGGGTCC	AGACGGCAAA	CCTATGAAAA	CCACGGAATT	1560
	CGCAAGTCAG	TGGACAACCTC	AGATGGGCTT	TCCAGTAATT	TCTGTGGCAG	AGTTTAACTC	1620
	GACTACTCTG	AAACTAACGC	AAAGTCGATA	TAAGGCGAAT	AAGGACGCTG	TTGAGAAAGA	1680
	GAAATACCGT	CATCCGAAAT	ACGGATTCAA	GTGGGATATT	CCATTGTGGT	ATCAGGAAGG	1740
	CGATAAGAAG	GAGGTAAAGC	GAGCATGGTT	AAGAAGAGGT	GAACCGCTTT	ACTTGCAATG	1800
	GAGTGATCCT	GGCGCTCCAT	TTGTGGTGAA	TGCGGACCGC	TATGGATTTT	ACCGACAAAA	1860
1820	CCACGACACT	AATGGTTGGA	AAAAGATAAT	CAAGCAGCTC	AAGGATAATC	ATGAGGTTTA	1920
	CAGTCCCCGG	ACAAGGAATG	CCATCATTAG	CGATGCGTTT	GCTGCGGCTG	CAACTGACGC	1980
	GATTGAGTAC	GAGACTGTAT	TCGAACCTCT	GAAATATGCC	GAAAAAGAAA	CGGAATACCT	2040
	ACCGTTGGAA	ATAGCAATGT	CTGGAATCTC	TTCGATTTTG	AAGTACTTCG	GTACCGAGCC	2100
	CGAGGCAAG	CCAGCTCAAA	CATACATGAT	GAACATATTG	AAGCCGATGT	ATGAGAAAAA	2160
	CGATATCGAC	TTCAATTGCCA	AAAACCTACAA	GGACGACAAG	CTGTTTTTCC	AAATCAACCT	2220
	CCAAAAAGAT	GTCATTGATA	TGTTCTGCGC	CCTTGATTCG	CAAGACTGCA	GGAAGAAATA	2280
1825	TAAAAAATCT	TTGATGACA	AAGTCATGGC	GAAATGCAGG	GATGGCCAAG	CAGCAACCGA	2340
	ATGCGTGAAA	ATCGCCGCTC	CTCTCCGATC	AAGTGTTTTAT	TGTTATGGTG	TGAAGGAAGG	2400
	CGGTGATTAT	GCTTTTCGACA	AGGTGATGGA	GCTTTATACG	GCCGAAACAC	TCGCCCTAGA	2460
	AAAAGACTTC	CTACGCCCTAG	CATTAGGATG	TCACAAAGAT	GTTACCGCTT	TGAAAGGACT	2520
	TCTCCTGCGG	GCTCTGGACA	GGAATTCTGC	GTTTCGTACG	ATGCAGGATA	TCCCAAGTGC	2580
	TTTCAACGAT	GTAGCAGCAA	ATCCTATTGG	CGAAGAATTC	ATTTTCAATT	TCCTTATTGA	2640
	GAGATGGCCA	GATATCGTTG	AAAGTATAGG	AACGAAACAC	ACATATGTTG	AAAAAGTGAT	2700
	ACCAGCTTGC	ACTTCAGGAA	TCCGCTCACA	ACAACAGATT	GACCAGCTGA	AGAATCTGCA	2760
1830	GAAAAATGGC	ATAAACGCTC	GTCAATTTGG	TGCATTTCAT	AAAGCGATCG	AACGAGCACA	2820
	AAATAGGGTG	GATTGGATTA	AAAAACATTT	CCAAAAATTA	GCGGCTTTCT	TCAAGAAAGC	2880
	CACCTTGTA	TTCGTATTAC	ATCACCATGA	ATCCAGATCT	TAAAACTCAC	TAAGGAATGT	2940
	GTGGGAACTG	ACTGTCTGTT	GCTTACTGTT	CCACTGAATG	GAAGTTTTTA	CCCATAAAAA	3000
	TTTTTACCAT	TTGCCTTCCG	TGAGGGCTCA	TTGTTGTCAC	TTGAATAGTA	AACAAAGCTC	3060
	AGTATTGAC	CCAGTGATCA	ATATTACTTT	CGCTTCATCG	AATTGTTACC	TTCTCTATAC	3120
	CCTCCTCTA	CCTGAATTCA	CACATTTGTT	CATA'TTTGTT	TGTAGTCTGT	TGCTCAGAAC	3180
	ACTTTCTCTT	CGATAGCTTT	TTGTTTCTTT	TTCTTTTGAT	TGTATTGATC	GTTTTACAA	3240
1835	TGTATAGATT	AGTTATCTGA	TAAATATTGA	TGGCTAAGGA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	3300
	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA					3319

RO 117709 B1

Informatie pentru Secv. ID Nr. 16

1840

Caracteristici de secvență:

Lungime : 30 aminoacizi

Tip: peptidă

1845

Descrierea secvenței: Secv.ID Nr. 16

Asp Asn Ser Pro Ser Ala Glu Glu Leu Leu Leu Pro Thr Asn Ile
1 5 10 15

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

1850

Informatie pentru Secv. ID Nr. 17

Caracteristici de secvență:

Lungime: 15 amino acizi

1855

Tip: peptidă

Descrierea secvenței: Secv. ID Nr. 17

Leu Tyr Leu Ala Glu Asp Val Gln Leu Xaa Lys Ile Leu Phe
1 5 10 15

1860

Informatie pentru Secv. ID Nr. 18

Lungime: 15 amino acizi

1865

Tip: peptidă

Descrierea secvenței: Secv. ID Nr. 18

Leu Ala Tyr Asp Glu Lys Ser Tyr Ala Pro Asp Asn Gln Tyr
1 5 10 15

1870

Informatie pentru Secv. ID Nr.19

Caracteristici de secvență:

1875 Lungime: 3084 baze perechi
 Tip: acid nucleic
 Impletire: dublă
 Topologie: lineară

Descrierea secvenței: Secv.ID Nr.19

1880	GGTTTAATTA	CCCAAGTTTG	AGATGACAGC	AGAGGAGAGT	CAGGAGCAGG	AGACGCAGCA	60
	ACCACGAAAA	AATACAGTGC	TACGGCTCAC	CCCAATCAAG	TCTCTCTTTG	CTTTGTTAGT	120
	GGTAGCTGCT	GCCGTCGGCC	TCTCAATCGG	TCTCACCTAT	TACTTTACAA	GGAAAGCTTT	180
	TGATACTACT	GGCGGAAATG	GAAAAGGGGA	TCAACCTATT	GTCGATGATA	ATTCCCCATC	240
	AGCTGAAGAA	TTACGTCTCC	CAACAACCAT	AAAACTTTTG	ACATACGACT	TAGTAATCAA	300
	AACGTATCTG	CCAAACTATG	TAAACTATCC	ACCTGAGAAA	GATTTGCTCA	TTGATGGGAC	360
	TGTGGTGATT	GCTATGGAAG	TTGTGGAGCC	AACAAAAGTCT	ATTGTGCTCA	ACTCGAAAAA	420
	TATTCTTGTA	ATTGCAGACC	AGTGCGAAC	GTTTTCTAAC	AACCAAAAAAC	TCGACATCGA	480
	AAAGGTTGTG	GATCAGCCAA	GGCTGGAGAA	AGTCGAATTC	GTTTTGAAGA	AAAAGCTGGA	540
1885	GAAGATCAG	AAAATCACGC	TCAAGATTGT	ATACATTGGC	CTTATCAACG	ACATGCTTGG	600
	AGGACTTTAT	CGAACAACCT	ACACGGATAA	AGATGGTACA	ACCAAGATTG	CTGCATGCAC	660
	TCATATGGAA	CCGACGGACG	CCCGTCTTAT	GGTCCCCTGT	TTCGACGAGC	CGACGTTTAA	720
	GGCAAACCTG	ACTGTGACTG	TGATTTCATCC	GAAGGGCACC	AGTGCCGTGT	CGAATGGAAT	780
	AGAAAAGGGA	GAAGGAGAAG	TCTCTGGCGA	TTGGGTCAAC	ACCAGATTCT	ATCCAACCCC	840
	GCGAATGCCT	TCGTATTTGA	TTGCTCTTGT	GATTTCCGAA	TTTAAGTACA	TTGAAAAATTA	900
	TACGAAAAGC	GGTGTTTCGAT	TCCGAATTCG	GGCTCGTCCG	GAAGCTATGA	AGATGACAGA	960
1890	ATATGCCATG	ATAGCTGGAA	TCAAATGTTT	GGATTACTAT	GAGGACTTCT	TCGGGATCAA	1020
	ATTCCCACTT	CCAAAACAAG	ATATGGTTGC	TCTTCCTGAC	TTCTCATCTG	GTGCTATGGA	1080
	GAAGTGGGGT	CTCATCACAT	ACAGGGAGGG	TCCGTCGCTC	TACGATGAAA	ACCTCTACGG	1140
	ACCAATGAAT	AAGGAGCGGG	TTGCAGAAGT	GATCGCGCAC	GAACCTGCAC	ATCAGTGGTT	1200
	CGGTAATTTG	GTACAGATGA	AGTGGTGGGA	TAACCTATGG	CTGAACGAAG	GATTCGCGTC	1260
	ATTCGTGGAA	TACATCGGAG	CCGACTTCAT	CAGCGATGGT	CTATGGGAAA	TGAAAGATTT	1320
	CTTCCTGCTG	GCACCGTACA	CAAGTGGTAT	TACGGCTGAT	GCAGTAGCTT	CAAGCCATCC	1380
	GCTTTCCTTC	AGAATAGATA	AGGCTGCAGA	TGTATCAGAA	GCGTTCGATG	ATATCACATA	1440
1895	CGTTAAAGGA	GCATCCGTTT	TTCAAATGCT	ATTGAATTTA	GTTGGGGACG	AAAATTTCAA	1500
	GCAGTCTGTT	TCGCGTTACC	TCAAGAAGTT	TTTATATGAT	AATGCGGCTG	CTGAAGATT	1560
	ATGGGCAGCA	TTTCGACGAA	CCGTCCAAGG	TATTAACCGGA	CCTAATGGTG	GACCAATTGAA	1620
	AATGTCCGAG	TTTGCGCCAC	AATGGACAAC	TCAGATGGGG	TTCCCTGTTT	TTACTGTCTGA	1680
	GTCCGTTAAC	GCAACGACTT	TGAAAGTCAC	CCAAAAACGA	TACAGGCAGA	ACAAGGATGC	1740
	AAAGGAACCA	GAGAAGTACC	GTCATCCAAC	TTATGGGTTC	AAATGGGATG	TTCTCTGTG	1800
	GTATCAGGAA	GATGAACAGC	AAGTGAAGAG	AACCTGGTTA	AAAAGAGAGG	AACCGCTCTA	1860
	TTTCCATGTA	AGCAATTCTG	ATTTCGTAGT	TGTGGTGAAT	GCCGAACGTC	GTGCTTTTTG	1920
1900	CCGATCAAAAC	TATGACGCTA	ACGGTTGGAG	GAACATTATG	AGAAGACTCA	AGCAGAATCA	1980
	TAAGGTCTAT	GGTCCACGAA	CAAGAAACGC	TCTCATAAGT	GATGCGTTTG	CAGCAGCTGC	2040
	AGTTGAGGAA	ATGAATTACG	AGACCGTATT	TGAAATGCTC	AAATACACCG	TGAAAGAAGA	2100
	GGATTACTTA	CCATGGAAAG	AGGCAATATC	AGGATTCAAT	ACAATTTTGG	ACTTTTTTCGG	2160
	CAGCGAACCC	GAATCTCAAT	GGGCTTCGGA	ATACATGCGA	AAACTGATGA	AGCCAATTTA	2220
	TGACAAGAGT	AGCATCAAGT	TTATAGCGGA	GAACACAAA	AAAGATTTCG	TTTTCTTCAA	2280
	AAATAATCTC	CAAATAGCTG	TTATTGACAC	ATACTGTGGT	CTTGGAGGCA	AAGAAATGCT	2340
	TGAAGAAATG	AAAAAGCTTT	TTGACAAGGA	GGTCATGAAA	TGTCAACCTG	GTCAGCAAGC	2400
1905	GACCGACTGC	GTAAAGGTAA	CTGCTCCTCT	CCGAAAAACT	GTTTACTGCT	ATGGGGTCCA	2460
	GGAAGGCGGT	GATGAGGCAT	TCGACAAGGT	GATGGAACTA	TATAATGCGG	AACAAGTGCA	2520
	GTTGGAGAAA	GACAGTCTAC	GTGAAGCATT	GGGATGCCAT	AAAGACGTTA	CAGCTCTAAA	2580
	GGGACTTCTT	ATGCTGGCTT	TGGATCGGAA	TTGCTCATTT	GTGCGTCTTC	AAGATGCTCA	2640
	TGATGTGTTT	AACATTGTAT	CCAGAAATCC	TGTTGGAAAC	GAAGTCTGCT	TCAATTTCTT	2700
	CACAGAGCGA	TGGGAAGAGA	TACTTGAAAG	TTTGTCAATA	CGACACAGAT	CAGTTGATCG	2760
	AGTGATCAAA	GCCTGTACTC	GAGGACTACG	ATCCAGGGAA	CAAGTACAAC	AGTTGAAGAA	2820
	TCTATACAAA	AATGACAAGC	GTGCTCGCGA	ATACGGTGCA	TTTGGTGGGG	CAATAGAAAAG	2880
1910	ATCGGAACAC	AGAGTCAAAT	GGATTGAGAA	ACATTTCCGA	AAACTAGCAG	CTTTCTTCAA	2940
	AAAATCTAAT	TCATAATTCT	GAAATGGCTA	TAAGTAGCAC	ACTGGATAGT	TGTCTCGAAT	3000
	CATCCAAAAA	GATTAATGAT	GTTTTTTTAC	TAGATAATAT	GGAGATATTC	TGTAAATTTG	3060
	TCATCGATTG	AAGTGTCTGT	ATTG				3084

RO 117709 B1

Informatie pentru Secv.ID Nr. 2o

Caracteristici de secvență:

Lungime: 3358 baze perechi

Tip acid nucleic

Impletire: dublă

Topologie: lineară

Descrierea secvenței: Secv.ID Nr.2o

GGTTTAATTA	CCCAAGTTTG	AGATGACGGC	GGAGTGGCAG	AAGCGTCGAA	TCTTGGGCTT	60	
CTCACCTATC	AGCCTACTTT	GTACATTATT	TGTATTAGCT	GCTGCCGTTG	GACTCTCCAT	120	
TGGTCTTACC	TATTACTTCA	CTCGTAAAGC	ATTCGATACC	ACACAAAAAG	AACAGAAGGA	180	
TGACAGTGGT	GGTAAAGAAA	AGGATAATTC	TCCTTCTGCA	GAAGAACTAC	TTCTTCCAAC	240	
GAACATAAAA	CCAGTCTCGT	ACGACTTGAA	CATCAAAACA	TATCTACCGG	GTTACGTGAA	300	
CTTTCCACCA	GAAAAGAATC	TCACATTTGA	TGCCCCATGTG	GAGATTGCTA	TGGTTGTGGT	360	
TGAGCCTACA	AATAGTATTG	TGCTGAATCT	GAAGAAAATC	ACTTTGGCAC	AAGGAGGATG	420	
CGAACTGTTC	TCAGGTAATC	AGAAACTTGA	CATCGAAAGT	GTAAAGATGC	AGGAAAGACT	480	1925
TGACAAGCTT	GAGATTACCC	TCAAAAATCA	GCTGCAAAAA	GATCTGAAAA	TCCTGCTCAA	540	
GATCACTTAC	ACCGGCCTTA	TTAGCGACAC	TCTCGGTGGG	CTCTACCACT	CCATCTACAC	600	
TGATAAGGAG	GGAAAAACTA	AGATCGTTGC	TGTTTCACAA	AATGAACCAT	CAGACGCTCG	660	
TCGTATAGCG	CCATGCTTTG	ACGAACCGAA	GTACAAGGCA	ACATGGACTG	TCACCGTCTG	720	
TCATCCCAAA	GGTACAAAGG	CTGCATCGAA	CGGCATTGAA	GCAAATGGAA	AAGGGGAGCT	780	
CAAGGGTGAT	TGGATAACGT	CTAAATTTAA	AACTACCCCA	CCGATGTCGT	CCTATTTATT	840	
GGCTATTATT	GTTTGTGAAT	TTGAATACAT	TGAAGGATTT	ACAAAAACGG	GTGTTCCGGT	900	1930
CCGTATATGG	TCTCGACCAG	AGGCGAAACG	AATGACGGCA	TACGCTTTGG	ATGCTGGCAT	960	
CAGATGCCTG	GAGTTCTATG	AGAAGTTCTT	TGACATAAAA	TTCCCTCTGG	AAAAACAAGA	1020	
TATGATTGCT	CTTCCTGATT	TCACCGCTGG	TGCCATGGAA	AACCTGGGCG	TTATCACTTA	1080	
TAGAGAGGAT	TCTCTCCTAT	ACGATGAAAA	AATTTATGCA	CCGATGAATA	AACAGCGGGT	1140	
TGCTCTCGTA	GTTGCTCACG	AGCTTGCTCA	TCAGTGGTTC	GGCAATCTGG	TCACACTGAA	1200	
GTGGTGGGAT	GATACGTGGT	TGAACGAAGG	TTTTGCAACA	TTTGTGTAGT	ATCTTGGAAT	1260	
GGACGAAATT	AGCCACAACA	ATTTCAAGAC	GCAAGATTTT	TTCTTGCTCG	ATGGAATTGA	1320	
TCGCGGAATG	AGAGCTGACT	CGGCAGCATC	AGCCATCCCG	CTTTCGTTTA	GGATTGACAA	1380	1935
AGCGGCAGAA	GTTGCCGAAG	CCTTTGACGA	TATTTTCATC	GCCAAGGGAG	CGTCAGTTCT	1440	
CACTATGCTA	CGGGCTTTGA	TTGGAGAGGA	CAATTACAGG	AATGCTGTTG	TGCAATACCT	1500	
CAAGAAGTTC	TCCTACAGCA	ATGCACACAG	AGCCGATCTG	TGGAACGCTT	TCAATGAAGT	1560	
TGTCAAAGGT	GTTAAGGGTC	CTGACCGCAA	CGTCATGAAA	ATCGACCAAT	TTACCGGATC	1620	
GTGGACGTAT	CAGATGGGTT	ATCCTGTGGT	TAAAGTAGAA	GAATTTAATG	CGACCGCCCT	1680	
AAAGGTTACG	CAGAGCCGGT	ACAAGACAAA	TAAAGACGCC	TTGGAACCCAG	AGAAATATCG	1740	
TAATCCAAAA	TACGGGTTCA	AGTGGGATGT	TCCCCTATGG	TATCAGGAAG	GCAATAGCAA	1800	
AGAGGTGAAG	CGAACATGGC	TAAAAAGAGA	TGAACCGCTG	TACTTGAACG	TCAACAATCG	1860	1940
GGATACATCC	CTTGTGGTGA	ACGCTGATCG	ACATCGAATT	TATCGACAAA	ACTATGATGC	1920	
CAACGGTTGG	AAAAAGATAA	TCAAGCAGCT	CAAGAAAGAT	CACAAGGTCT	TCGGTCCAAG	1980	
GACAAGGAAC	GCTATCATAA	GCGATGCATT	TGCTGCAGCT	ACGATTGACG	CAATCGACTA	2040	
TGAAACTGTA	TTCCGAACTAC	TTGAATATGC	CAAAAATGAA	GAGGAAATCT	TGCCTTGGAA	2100	
GGAAAGCTCT	TCCGGCATCT	TCCGAGTTTT	AAAGTTCCTT	GGTAATGAGC	CGGAGACAAA	2160	
ACCAGCTAGA	GCTTACATGA	TGAGCATATT	AGAACCAGAT	TATAATAAGA	GCAGCATTGA	2220	
TTACATCGTC	AAGAATTATT	TGGATGATAC	GTTATTACAC	AAAAATTAATA	CTCAAAAGGA	2280	
TATCATTGAT	GCATATTGTT	CCCTTGGATC	AAAGGACTGT	ATAAAGCAAT	ATAAGGATAT	2340	1945
CTTCTACGAT	GAGGTTATGC	CCAAGTGTA	GGCCGGGGAA	GCAGCAACCA	AATGCGTTAA	2400	
GGTTTCCGCT	CCTCTTCGAG	CCAATGTTTA	CTGTTATGGT	GTACAGGAAG	GTGGTGAAGA	2460	
AGCTTTTGAA	AAGGTGATGG	GGCTGTATCT	AGCAGAAGAT	GTTCAACTGG	AGAAGGGTAT	2520	
CCTGTTCAAA	GCCTTGGCAT	GCCACAAAGA	TGTTACAGCT	CTAAAAGAAC	TTCTTTTGCG	2580	
AGCCCTGGAC	CGTAAATCGT	CGTTTGTGCG	TCTTCAGGAT	GTCCCTACCG	CTTTCCGTGC	2640	
TGTATCTGAA	AACCTGTGG	GCGAAGAATT	CATGTTCAAT	TTCTTAATGG	AGAGATGGGA	2700	
GGAAATCACT	GCGAGCTTGG	AAACAGAACA	CAGAGCAGTT	GATAAAGTGG	TCGGCGCTTG	2760	
TTGCACAGGA	ATTTCGCTCCC	AACAACAAAT	AGATCAGCTG	AAGAATCTAC	AGAAGAACAA	2820	1950
TGCGCAGGCT	AAGAAGTTCG	GCTCATTAC	CCAGGAAATC	GAAAAAGGAG	AACATAAAAT	2880	
TGCCTGGATC	AAGAAACATT	TTACAGAGAT	ATCGGAATTC	TTCAAGAGAG	CAAGATCATA	2940	
GCTTTTCACA	CTGAGCTCCA	ATTTTAACTG	CTTCAAACTA	GGAGACAGTT	TTGCTGAAAA	3000	
GTCAAGTTCA	CATTTTCCGT	TTGAATGCCA	TCCATTGCAA	TACAACCAAT	AATACCATTT	3060	
TAAGTACCTT	TCTTTCACAG	TGATTACTGA	ATTTCGAATA	TATCATGAAG	CTTGATCTTT	3120	
GAACGTTATC	ATCGGTGACT	TTCAATTTAT	AGAGCTCACT	CTCCATTTTG	TAGCTGTGAT	3180	
GACTTGCAAT	TAAGACCCAC	CATTTACCAG	CCTAGAATCT	TTCCCCAATA	CATTCCAAAC	3240	
TCCGATCACC	TCCACCCCTG	ACAATGCCCA	GATTTGTTTT	TTTGTCTGCT	ATCCATCTAA	3300	1955
CTGTTTCGAT	CGCCGGTTGT	TTGTCAATTG	CTTATCTGAT	AAATATTGAC	CTTGCTGT	3358	

Informatie pentru Sedv. ID Nr.21

Caracteristici de secvență:

1960

Lungime: 3369 baze perechi

Tip: acid nucleic

Impletire: dublă

Topologie: lineară

Descrierea secvenței: Secv. ID Nr.21

1965	GGTTTAATTA	CCCAAGTTTG	AGGGTCTCCA	TCTAGATGAC	GTCGCAGGGG	AGAACGCGGA	60
	CATTGCTGAA	TCTAACTCCA	ATCCGTCCTA	TTGTCCGATT	ATTTCTAGTA	GCTGCTGCAG	120
	TCGGCCTCTC	TATTGGTCTC	ACCTATTACT	TTACTCGCAA	AGCGTTCGAT	ACCTCAGAAA	180
	AGCCAGGGAA	GGATGATACT	GGTGGCAAGG	ACAAAGACAA	TTCTCCCTCT	GCGGCGGAAC	240
	TACTCCTTCC	AAGTAATATA	AAACCATTGT	CTTACGACTT	GACGATCAAA	ACATATCTAC	300
	CTGGTTATGT	GGACTTCCCA	CCGGAGAAAA	ACCTCACATT	CGATGGGCGT	GTGGAAATAT	360
	CAATGGTTGT	AATTGAGCCA	ACAAAGAGTA	TCGTACTCAA	TTCAAAGAAG	ATCTCTGTAA	420
	TACCCCAAGA	ATGTGAACTG	GTATCGGGCG	ATAAAAAACT	CGAAATTGAA	AGTGTAAAGG	480
1970	AGCACCCAAG	ACTGGAAAAAG	GTTGAGTTTC	TTATCAAAAG	CCAACTGGAA	AAAGATCAAC	540
	AAATCTTGCT	CAAGGTCGGC	TACATCGGTC	TCATCAGCAA	CAGCTTTGGT	GGAACTCTAC	600
	AGACCACTTA	TACCACCCCG	GATGGCACCC	CTAAGATCGC	TGCAGTTTCA	CAAAATGAGC	660
	CCATAGATGC	TCGTGCAATG	GTACCATGCA	TGGATGAACC	GAAATACAAA	GCAAACTGGA	720
	CCGTTACTGT	CATTCACTCA	AAAGGCACCA	AAGCCGTCTC	GAATGGAATC	GAAGTGAACG	780
	GAGATGGAGA	GATCAGTGGT	GATTGGATCA	CATCGAAGTT	CTTGACTACT	CCACGGATGT	840
	CATCCTACTT	GTTGGCAGTT	ATGGTTTCAG	AATTTGAATA	CATCGAAGGT	GAAACAAAGA	900
	CGGGTGTTTCG	GTTCCGTATA	TGGTCACGCC	CAGAGGCCAA	GAAGATGACA	CAATATGCTC	960
1975	TGCAATCTGG	TATCAAGTGC	ATAGAATTCT	ACGAAGATTT	CTTTGATATC	AGATTCCCTC	1020
	TGAAGAAACA	AGATATGATT	GCCCTTCCTG	ATTTCTCTGC	CGGTGCCATG	GAGAAATGGG	1080
	GCCTCATCAC	TTACAGGGAA	AACTCTTTGT	TGTACGATGA	CAGATTCTAT	GCACCGATGA	1140
	ATAAACAGCG	AATTGCTCGC	ATTGTTGCTC	ATGAGCTTGC	TCATCAGTGG	TTCCGGGACT	1200
	TGGTTACGAT	GAAGTGGTGG	GATAATTTGT	GGTTGAATGA	AGGTTTTGCA	AGATTTCACAG	1260
	AATTTATTGG	AGCTGGTCAG	ATAACTCAAG	ATGACGCCAG	AATGAGGAAC	TACTTCCTGA	1320
	TTGATGTACT	TGAACGCGCT	TTGAAAGCTG	ATTCCGTAGC	GTCAAGCCAT	CCACTTTCCT	1380
	TCAGAATCGA	CAAAGCTGCA	GAAAGTTGAAG	AAGCCTTTGA	TGATATCACA	TACGCCAAAG	1440
1980	GAGCTTCTGT	TCTTACTATG	CTGAGAGCCT	TGATTGGAGA	AGAAAAACAT	AAGCATGCAG	1500
	TATCGCAGTA	CCTCAAGAAG	TTCTCGTATA	GCAATGCAGA	AGCGACTGAT	CTATGGGCAG	1560
	TTTTTGATGA	AGTTGTCACT	GACGTCGAAG	GTCCAGACGG	CAAACCTATG	AAAACCACAG	1620
	AGTTTGCAAG	TCAGTGGACG	ACTCAGATGG	GCTTCCAGT	TATTTCCGTA	GCAGAGTTTA	1680
	ACTCGACTAC	TTTGAAATTA	ACGCAAAAGT	GATATGAGGC	GAATAAAGAC	GCTGTGGAGA	1740
	AAGAGAAGTA	CCGTCACCCG	AAATACGGAT	TTAAATGGGA	TATTTCCACTG	TGGTATCAGG	1800
	AAGGCGATAA	GAAGGAGATA	AAGCGAAGCT	GGTTGAGAAG	AGATGAACCG	CTTTACTTGC	1860
1985	ATGTTAGTGA	TGCTGGCGCT	CCCTTTGTGG	TGAACGCAGA	CCGCTATGGA	TTTTATCGAC	1920
	AAAATCATGA	CGCTAATGGT	TGGAAAAAGA	TAATCAAGCA	GCTCAAGGAT	AATCATGAGG	1980
	TTTACAGTCC	CCGGACAAGG	AATGTCATCA	TTAGCGATGC	GTTTGCTGCG	GCTGCAACTG	2040
	ACGCAATTGA	GTATGAGACT	GTATTTGAAC	TTCTGAATTA	TGCCGAAAAA	GAAACGGAAT	2100
	ATCTACCATT	AGAAATCGCA	ATGTCCGGGA	TCTCTTCGAT	TTTGAAATAC	TTCCCTACCG	2160
	AGCCAGAGGC	AAAGCCAGCT	CAAAACATCA	TGATGAACAT	ATTGAAACCG	ATGTATGAAA	2220
	AAAGCAGTAT	CGACTTCATT	GCCAATAACT	ACAGAAATGA	CAAGCTGTTT	TTCCAAATCA	2280
	ACCTCCAAAA	AGATGTCATT	GATATGTTCT	GCGCCCTCGG	ATCGCAAGAC	TGCAGGAAGA	2340
1990	AATATAAAAA	ACTTTTCGAT	GACGAAGTCA	TGAACAAATG	CAGGGATGGT	CAAGCAGCAA	2400
	CCGAATGCGT	AAGAATCGCC	GCTCCTCTCC	GATCAAGTGT	TTATTGTTAT	GGTGTGAAGG	2460
	AAGGCGGTGA	TTATGCTTCC	GACAAGGTGA	TGGAGCTTTA	TACGGCCGAA	ACACTCGCCC	2520
	TAGAAAAAGA	CTTCCTACGC	CTAGCATTTG	GATGTCATAA	AGATGTTACT	GCTTTGAAAC	2580
	GACTTCTCTT	GCGGGCTCTG	GACAGGAATT	CGTCGTTCTG	ACGTATGCAG	GATATCCCAA	2640
	GTGCTTTCAA	CGATGTAGCA	GCAAATCCTA	TTGGCGAAGA	ATTCATTTTC	AATTTCCCTTA	2700
	TTGAGAGATG	GCCAGATATC	ATTGAAAGTA	TAGGAACGAA	GCACACATAT	GTTGAGAAAG	2760
	TGATACCAGC	CTGCACTTCA	GGAAATCCGCT	CACAACAGCA	GATTGACCAG	CTGAAGAATC	2820
1995	TGCAGAAAAA	TGGCATGAAC	GCTCGTCAAT	TCCGTGCATT	CGATAAAGCA	ATCGAACGAG	2880
	CACAAAATAG	GGTGGATTGG	ATTAAAAAAC	ATTTCCAAAA	ATTAGCGGCT	TTCTTCAAGA	2940
	AAGCCACCTT	GTAATTTCGAA	TTACATTGCC	AGTAATCCAG	ATCTTAAAGT	TCATGAAGGA	3000
	ATATGACAGG	GAAGTCACTG	TCTGTTGGTC	ACTGTTCCAC	TGAATGGAAG	TTTTTACCTA	3060
	CAAAAAATTTT	TATCGTTATA	TTTGCTTTCC	GTGAGGGGTC	ATTGTTGTCA	CTTGAATAGT	3120
	AAACAAAGCT	CAGTATTGGC	AACCGTAGAA	CAATATTACT	TTCCGTTTCT	CAAAATTGTTA	3180
	TCTTCCCTAT	ACCCTCTTCC	TAAGTGAATT	CGGAAATTTG	TTTGTAGTCT	TTTGTAGTCT	3240
	GTTGCTCAGA	ACACTTTTCT	CTCAATAGCT	TCTTGTTTGT	TTTTTTTTTG	ATTGTATTGA	3300
2000	TCGTTTTTACA	ATTGTATAGA	TTAGTTATCT	TATAAATATT	GATGGTTAAA	AAAAAAAATA	3360
	AAAAAAAATA						3369

RO 117709 B1

Informatie pentru Secv. ID Nr. 22

Caracteristici de secvență:

Lungime: 977 aminoacizi

Tip: peptidă

2005

Descrierea secventei: Secv. ID Nr. 22

Met	Thr	Ala	Glu	Glu	Ser	Gln	Glu	Gln	Glu	Thr	Gln	Gln	Pro	Arg	
1				5					10					15	
Lys	Asn	Thr	Val	Leu	Arg	Leu	Thr	Pro	Ile	Lys	Ser	Leu	Phe	Ala	
				20					25					30	
Leu	Leu	Val	Val	Ala	Ala	Ala	Val	Gly	Leu	Ser	Ile	Gly	Leu	Thr	
				35					40					45	
Tyr	Tyr	Phe	Thr	Arg	Lys	Ala	Phe	Asp	Thr	Thr	Gly	Gly	Asn	Gly	
				50					55					60	
Lys	Gly	Asp	Gln	Pro	Ile	Val	Asp	Asp	Asn	Ser	Pro	Ser	Ala	Glu	
				65					70					75	
Glu	Leu	Arg	Leu	Pro	Thr	Thr	Ile	Lys	Pro	Leu	Thr	Tyr	Asp	Leu	
				80					85					90	
Val	Ile	Lys	Thr	Tyr	Leu	Pro	Asn	Tyr	Val	Asn	Tyr	Pro	Pro	Glu	
				95					100					105	
Lys	Asp	Phe	Ala	Ile	Asp	Gly	Thr	Val	Val	Ile	Ala	Met	Glu	Val	
				110					115					120	
Val	Glu	Pro	Thr	Lys	Ser	Ile	Val	Leu	Asn	Ser	Lys	Asn	Ile	Pro	
				125					130					135	
Val	Ile	Ala	Asp	Gln	Cys	Glu	Leu	Phe	Ser	Asn	Asn	Gln	Lys	Leu	
				140					145					150	
Asp	Ile	Glu	Lys	Val	Val	Asp	Gln	Pro	Arg	Leu	Glu	Lys	Val	Glu	
				155					160					165	
Phe	Val	Leu	Lys	Lys	Lys	Leu	Glu	Lys	Asn	Gln	Lys	Ile	Thr	Leu	
				170					175					180	
Lys	Ile	Val	Tyr	Ile	Gly	Leu	Ile	Asn	Asp	Met	Leu	Gly	Gly	Leu	
				185					190					195	
Tyr	Arg	Thr	Thr	Tyr	Thr	Asp	Lys	Asp	Gly	Thr	Thr	Lys	Ile	Ala	
				200					205					210	
Ala	Cys	Thr	His	Met	Glu	Pro	Thr	Asp	Ala	Arg	Leu	Met	Val	Pro	
				215					220					225	
Cys	Phe	Asp	Glu	Pro	Thr	Phe	Lys	Ala	Asn	Trp	Thr	Val	Thr	Val	
				230					235					240	
Ile	His	Pro	Lys	Gly	Thr	Ser	Ala	Val	Ser	Asn	Gly	Ile	Glu	Lys	
				245					250					255	
Gly	Glu	Gly	Glu	Val	Ser	Gly	Asp	Trp	Val	Thr	Thr	Arg	Phe	Asp	
				260					265					270	
Pro	Thr	Pro	Arg	Met	Pro	Ser	Tyr	Leu	Ile	Ala	Leu	Val	Ile	Ser	
				275					280					285	
Glu	Phe	Lys	Tyr	Ile	Glu	Asn	Tyr	Thr	Lys	Ser	Gly	Val	Arg	Phe	
				290					295					300	
Arg	Ile	Pro	Ala	Arg	Pro	Glu	Ala	Met	Lys	Met	Thr	Glu	Tyr	Ala	
				305					310					315	
Met	Ile	Ala	Gly	Ile	Lys	Cys	Leu	Asp	Tyr	Tyr	Glu	Asp	Phe	Phe	
				320					325					330	
Gly	Ile	Lys	Phe	Pro	Leu	Pro	Lys	Gln	Asp	Met	Val	Ala	Leu	Pro	
				335					340					345	
Asp	Phe	Ser	Ser	Gly	Ala	Met	Glu	Asn	Trp	Gly	Leu	Ile	Thr	Tyr	
				350					355					360	
Arg	Glu	Gly	Ser	Val	Leu	Tyr	Asp	Glu	Asn	Leu	Tyr	Gly	Pro	Met	
				365					370					375	
Asn	Lys	Glu	Arg	Val	Ala	Glu	Val	Ile	Ala	His	Glu	Leu	Ala	His	
				380					385					390	
Gln	Trp	Phe	Gly	Asn	Leu	Val	Thr	Met	Lys	Trp	Trp	Asp	Asn	Leu	
				395					400					405	
Trp	Leu	Asn	Glu	Gly	Phe	Ala	Ser	Phe	Val	Glu	Tyr	Ile	Gly	Ala	
				410					415					420	
Asp	Phe	Ile	Ser	Asp	Gly	Leu	Trp	Glu	Met	Lys	Asp	Phe	Phe	Leu	
				425					430					435	

2045

RO 117709 B1

2050	Leu	Ala	Pro	Tyr	Thr	Ser	Gly	Ile	Thr	Ala	Asp	Ala	Val	Ala	Ser
					440					445					450
	Ser	His	Pro	Leu	Ser	Phe	Arg	Ile	Asp	Lys	Ala	Ala	Asp	Val	Ser
					455					460					465
2055	Glu	Ala	Phe	Asp	Asp	Ile	Thr	Tyr	Arg	Lys	Gly	Ala	Ser	Val	Leu
					470					475					480
	Gln	Met	Leu	Leu	Asn	Leu	Val	Gly	Asp	Glu	Asn	Phe	Lys	Gln	Ser
					485					490					495
2060	Val	Ser	Arg	Tyr	Leu	Lys	Lys	Phe	Ser	Tyr	Asp	Asn	Ala	Ala	Ala
					500					505					510
	Glu	Asp	Leu	Trp	Ala	Ala	Phe	Asp	Glu	Thr	Val	Gln	Gly	Ile	Thr
					515					520					525
2065	Gly	Pro	Asn	Gly	Gly	Pro	Leu	Lys	Met	Ser	Glu	Phe	Ala	Pro	Gln
					530					535					540
	Trp	Thr	Thr	Gln	Met	Gly	Phe	Pro	Val	Leu	Thr	Val	Glu	Ser	Val
					545					550					555
2070	Asn	Ala	Thr	Thr	Leu	Lys	Val	Thr	Gln	Lys	Arg	Tyr	Arg	Gln	Asn
					560					565					570
	Lys	Asp	Ala	Lys	Glu	Pro	Glu	Lys	Tyr	Arg	His	Pro	Thr	Tyr	Gly
					575					580					585
2075	Phe	Lys	Trp	Asp	Val	Pro	Leu	Trp	Tyr	Gln	Glu	Asp	Glu	Gln	Gln
					590					595					600
	Val	Lys	Arg	Thr	Trp	Leu	Lys	Arg	Glu	Glu	Pro	Leu	Tyr	Phe	His
					605					610					615
2080	Val	Ser	Asn	Ser	Asp	Ser	Ser	Val	Val	Val	Asn	Ala	Glu	Arg	Arg
					620					625					630
	Ala	Phe	Cys	Arg	Ser	Asn	Tyr	Asp	Ala	Asn	Gly	Trp	Arg	Asn	Ile
					635					640					645
2085	Met	Arg	Arg	Leu	Lys	Gln	Asn	His	Lys	Val	Tyr	Gly	Pro	Arg	Thr
					650					655					660
	Arg	Asn	Ala	Leu	Ile	Ser	Asp	Ala	Phe	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	Glu
					665					670					675
2090	Glu	Met	Asn	Tyr	Glu	Thr	Val	Phe	Glu	Met	Leu	Lys	Tyr	Thr	Val
					680					685					690
	Lys	Glu	Glu	Asp	Tyr	Leu	Pro	Trp	Lys	Glu	Ala	Ile	Ser	Gly	Phe
					695					700					705
2095	Asn	Thr	Ile	Leu	Asp	Phe	Phe	Gly	Ser	Glu	Pro	Glu	Ser	Gln	Trp
					710					715					720
	Ala	Ser	Glu	Tyr	Met	Arg	Lys	Leu	Met	Lys	Pro	Ile	Tyr	Asp	Lys
					725					730					735
2100	Ser	Ser	Ile	Lys	Phe	Ile	Ala	Glu	Asn	Tyr	Lys	Lys	Asp	Ser	Leu
					740					745					750
	Phe	Phe	Lys	Asn	Asn	Leu	Gln	Ile	Ala	Val	Ile	Asp	Thr	Tyr	Cys

RO 117709 B1

	935	940	945	
Ala Phe Gly Gly	Ala Ile Glu Arg Ser	Glu His Arg Val Lys	Trp	2095
	950	955	960	
Ile Glu Lys His	Phe Arg Lys Leu Ala	Ala Phe Phe Lys Lys	Ser	
	965	970	975	
Asn Ser				

Informatie pentru Secv.ID Nr. 23 2100

Caracteristici de secvență:

Lungime: 972 aminoacizi

Tip: peptidă

Descrierea secvenței: Secv.ID Nr.23

Met Thr Ala Glu Trp	Gln Lys Arg Arg	Ile Leu Gly Phe Ser Pro	2105
1	5	10	15
Ile Ser Leu Leu Cys	Thr Leu Phe Val	Leu Ala Ala Ala Val Gly	
	20	25	30
Leu Ser Ile Gly Leu	Thr Tyr Tyr Phe	Thr Arg Lys Ala Phe Asp	
	35	40	45
Thr Thr Gln Lys Glu	Gln Lys Asp Asp	Ser Gly Gly Lys Glu Lys	2110
	50	55	60
Asp Asn Ser Pro Ser	Ala Glu Glu Leu	Leu Leu Pro Thr Asn Ile	
	65	70	75
Lys Pro Val Ser Tyr	Asp Leu Asn Ile	Lys Thr Tyr Leu Pro Gly	
	80	85	90
Tyr Val Asn Phe Pro	Pro Glu Lys Asn	Leu Thr Phe Asp Ala His	
	95	100	105
Val Glu Ile Ala Met	Val Val Val Glu	Pro Thr Asn Ser Ile Val	2115
	110	115	120
Leu Asn Ser Lys Lys	Ile Thr Leu Ala	Gln Gly Gly Cys Glu Leu	
	125	130	135
Phe Ser Gly Asn Gln	Lys Leu Asp Ile	Glu Ser Val Lys Met Gln	
	140	145	150
Glu Arg Leu Asp Lys	Leu Glu Ile Thr	Leu Lys Asn Gln Leu Gln	
	155	160	165
Lys Asp Leu Lys Ile	Leu Leu Lys Ile	Thr Tyr Thr Gly Leu Ile	2120
	170	175	180
Ser Asp Thr Leu Gly	Gly Leu Tyr Gln	Ser Ile Tyr Thr Asp Lys	
	185	190	195
Asp Gly Lys Thr Lys	Ile Val Ala Val	Ser Gln Asn Glu Pro Ser	
	200	205	210
Asp Ala Arg Arg Ile	Ala Pro Cys Phe	Asp Glu Pro Lys Tyr Lys	
	215	220	225
Ala Thr Trp Thr Val	Thr Val Val His	Pro Lys Gly Thr Lys Ala	2125
	230	235	240
Ala Ser Asn Gly Ile	Glu Ala Asn Gly	Lys Gly Glu Leu Lys Gly	
	245	250	255
Asp Trp Ile Thr Ser	Lys Phe Lys Thr	Thr Pro Pro Met Ser Ser	
	260	265	270
Tyr Leu Leu Ala Ile	Ile Val Cys Glu	Phe Glu Tyr Ile Glu Gly	2130
	275	280	285
Phe Thr Lys Thr Gly	Val Arg Phe Arg	Ile Trp Ser Arg Pro Glu	
	290	295	300
Ala Lys Arg Met Thr	Ala Tyr Ala Leu	Asp Ala Gly Ile Arg Cys	
	305	310	315
Leu Glu Phe Tyr Glu	Lys Phe Phe Asp	Ile Lys Phe Pro Leu Glu	
	320	325	330
Lys Gln Asp Met Ile	Ala Leu Pro Asp	Phe Thr Ala Gly Ala Met	2135
	335	340	345
Glu Asn Trp Gly Leu	Ile Thr Tyr Arg	Glu Asp Ser Leu Leu Tyr	
	350	355	360
Asp Glu Lys Ile Tyr	Ala Pro Met Asn	Lys Gln Arg Val Ala Leu	
	365	370	375

RO 117709 B1

2140

Val	Val	Ala	His	Glu	Leu	Ala	His	Gln	Trp	Phe	Gly	Asn	Leu	Val
				380					385					390
Thr	Leu	Lys	Trp	Trp	Asp	Asp	Thr	Trp	Leu	Asn	Glu	Gly	Phe	Ala
				395					400					405
Thr	Phe	Val	Glu	Tyr	Leu	Gly	Met	Asp	Glu	Ile	Ser	His	Asn	Asn
				410					415					420

2145

Phe	Arg	Thr	Gln	Asp	Phe	Phe	Leu	Leu	Asp	Gly	Met	Asp	Arg	Gly
				425					430					435
Met	Arg	Ala	Asp	Ser	Ala	Ala	Ser	Ser	His	Pro	Leu	Ser	Phe	Arg
				440					445					450
Ile	Asp	Lys	Ala	Ala	Glu	Val	Ala	Glu	Ala	Phe	Asp	Asp	Ile	Ser
				455					460					465
Tyr	Ala	Lys	Gly	Ala	Ser	Val	Leu	Thr	Met	Leu	Arg	Ala	Leu	Ile
				470					475					480

2150

Gly	Glu	Asp	Asn	Tyr	Arg	Asn	Ala	Val	Val	Gln	Tyr	Leu	Lys	Lys
				485					490					495
Phe	Ser	Tyr	Ser	Asn	Ala	Gln	Ala	Ala	Asp	Leu	Trp	Asn	Val	Phe
				500					505					510
Asn	Glu	Val	Val	Lys	Gly	Val	Lys	Gly	Pro	Asp	Gly	Asn	Val	Met
				515					520					525
Lys	Ile	Asp	Gln	Phe	Thr	Asp	Gln	Trp	Thr	Tyr	Gln	Met	Gly	Tyr
				530					535					540

2155

Pro	Val	Val	Lys	Val	Glu	Glu	Phe	Asn	Ala	Thr	Ala	Leu	Lys	Val
				545					550					555
Thr	Gln	Ser	Arg	Tyr	Lys	Thr	Asn	Lys	Asp	Ala	Leu	Glu	Pro	Glu
				560					565					570
Lys	Tyr	Arg	Asn	Pro	Lys	Tyr	Gly	Phe	Lys	Trp	Asp	Val	Pro	Leu
				575					580					585
Trp	Tyr	Gln	Glu	Gly	Asn	Ser	Lys	Glu	Val	Lys	Arg	Thr	Trp	Leu
				590					595					600

2160

Lys	Arg	Asp	Glu	Pro	Leu	Tyr	Leu	Asn	Val	Asn	Asn	Arg	Asp	Thr
				605					610					615
Ser	Leu	Val	Val	Asn	Ala	Asp	Arg	His	Gly	Phe	Tyr	Arg	Gln	Asn
				620					625					630
Tyr	Asp	Ala	Asn	Gly	Trp	Lys	Lys	Ile	Ile	Lys	Gln	Leu	Lys	Lys
				635					640					645
Asp	His	Lys	Val	Phe	Gly	Pro	Arg	Thr	Arg	Asn	Ala	Ile	Ile	Ser
				650					655					660

2165

Asp	Ala	Phe	Ala	Ala	Ala	Thr	Ile	Asp	Ala	Ile	Asp	Tyr	Glu	Thr
				665					670					675
Val	Phe	Glu	Leu	Leu	Glu	Tyr	Ala	Lys	Asn	Glu	Glu	Glu	Phe	Leu
				680					685					690
Pro	Trp	Lys	Glu	Ala	Leu	Ser	Gly	Met	Phe	Ala	Val	Leu	Lys	Phe
				695					700					705
Phe	Gly	Asn	Glu	Pro	Glu	Thr	Lys	Pro	Ala	Arg	Ala	Tyr	Met	Met
				710					715					720

2170

Ser	Ile	Leu	Glu	Pro	Met	Tyr	Asn	Lys	Ser	Ser	Ile	Asp	Tyr	Ile
				725					730					735
Val	Lys	Asn	Tyr	Leu	Asp	Asp	Thr	Leu	Phe	Thr	Lys	Ile	Asn	Thr
				740					745					750
Gln	Lys	Asp	Ile	Ile	Asp	Ala	Tyr	Cys	Ser	Leu	Gly	Ser	Lys	Asp
				755					760					765
Cys	Ile	Lys	Gln	Tyr	Lys	Asp	Ile	Phe	Tyr	Asp	Glu	Val	Met	Pro
				770					775					780

2175

Lys	Cys	Lys	Ala	Gly	Glu	Ala	Ala	Thr	Lys	Cys	Val	Lys	Val	Ser
				785					790					795
Ala	Pro	Leu	Arg	Ala	Asn	Val	Tyr	Cys	Tyr	Gly	Val	Gln	Glu	Gly
				800					805					810
Gly	Glu	Glu	Ala	Phe	Glu	Lys	Val	Met	Gly	Leu	Tyr	Leu	Ala	Glu
				815					820					825
Asp	Val	Gln	Leu	Glu	Lys	Gly	Ile	Leu	Phe	Lys	Ala	Leu	Ala	Cys
				830					835					840

2180

His	Lys	Asp	Val	Thr	Ala	Leu	Lys	Glu	Leu	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu
				845					850					855
Asp	Arg	Lys	Ser	Ser	Phe	Val	Arg	Leu	Gln	Asp	Val	Pro	Thr	Ala
				860					865					870
Phe	Arg	Ala	Val	Ser	Glu	Asn	Pro	Val	Gly	Glu	Glu	Phe	Met	Phe

2185

RO 117709 B1

Asn Phe Leu Met	875	Glu Arg Trp Glu Glu	880	Ile Thr Ala Ser Leu	885
Thr Glu His Arg	890	Ala Val Asp Lys Val	895	Val Gly Ala Cys Cys	900
Gly Ile Arg Ser	905	Gln Gln Gln Ile Asp	910	Gln Leu Lys Asn Leu	915
Lys Asn Asn Ala	920	Gln Ala Lys Lys Phe	925	Gly Ser Phe Thr Gln	930
Ile Glu Lys Gly	935	Glu His Lys Ile Ala	940	Trp Ile Lys Lys His	945
His Arg Leu Ser	950	Glu Phe Phe Lys Arg	955	Ala Arg Ser	960
	965		970		

Informatie pentru Secv.ID Nr. 24

Caracteristici de secvență:

Lungime: 972 aminoacizi

Tip: peptidă

Descrierea secvenței: Secv.ID Nr. 24

Met Thr Ser Gln Gly	1	Arg Thr Arg Thr	10	Leu Leu Asn Leu Thr	15
Ile Arg Leu Ile Val	20	Ala Leu Phe Leu Val	25	Ala Ala Ala Val	30
Leu Ser Ile Gly Leu	35	Thr Tyr Tyr Phe Thr	40	Arg Lys Ala Phe Asp	45
Thr Ser Glu Lys Pro	50	Gly Lys Asp Asp Thr	55	Gly Gly Lys Asp Lys	60
Asp Asn Ser Pro Ser	65	Ala Ala Glu Leu Leu	70	Leu Pro Ser Asn Ile	75
Lys Pro Leu Ser Tyr	80	Asp Leu Thr Ile Lys	85	Thr Tyr Leu Pro Gly	90
Tyr Val Asp Phe Pro	95	Pro Glu Lys Asn Leu	100	Thr Phe Asp Gly Arg	105
Val Glu Ile Ser Met	110	Val Val Ile Glu Pro	115	Thr Lys Ser Ile Val	120
Leu Asn Ser Lys Lys	125	Ile Ser Val Ile Pro	130	Gln Glu Cys Glu Leu	135
Val Ser Gly Asp Lys	140	Lys Lys Leu Glu Ile	145	Glu Ser Val Lys Glu His	150
Pro Arg Leu Glu Lys	155	Val Glu Phe Leu Ile	160	Lys Ser Gln Leu Glu	165
Lys Asp Gln Gln Ile	170	Leu Leu Lys Val Gly	175	Tyr Ile Gly Leu Ile	180
Ser Asn Ser Phe Gly	185	Gly Ile Tyr Gln Thr	190	Thr Tyr Thr Thr Pro	195
Asp Gly Thr Pro Lys	200	Ile Ala Ala Val Ser	205	Gln Asn Glu Pro Ile	210
Asp Ala Arg Arg Met	215	Val Pro Cys Met Asp	220	Glu Pro Lys Tyr Lys	225
Ala Asn Trp Thr Val	230	Thr Val Ile His Pro	235	Lys Gly Thr Lys Ala	240
Val Ser Asn Gly Ile	245	Glu Val Asn Gly Asp	250	Gly Glu Ile Ser Gly	255
Asp Trp Ile Thr Ser	260	Lys Phe Leu Thr Thr	265	Pro Arg Met Ser Ser	270
Tyr Leu Leu Ala Val	275	Met Val Ser Glu Phe	280	Glu Tyr Ile Glu Gly	285
Glu Thr Lys Thr Gly	290	Val Arg Phe Arg Ile	295	Trp Ser Arg Pro Glu	300
Ala Lys Lys Met Thr	305	Gln Tyr Ala Leu Gln	310	Ser Gly Ile Lys Cys	315
Ile Glu Phe Tyr Glu		Asp Phe Phe Asp Ile		Arg Phe Pro Leu Lys	

RO 117709 B1

		320		325		330
	Lys Gln Asp Met	Ile Ala Leu Pro Asp	Phe Ser Ala Gly Ala	Met		
2235		335		340		345
	Glu Asn Trp Gly	Leu Ile Thr Tyr Arg	Glu Asn Ser Leu Leu	Tyr		
		350		355		360
	Asp Asp Arg Phe	Tyr Ala Pro Met Asn	Lys Gln Arg Ile Ala	Arg		
		365		370		375
	Ile Val Ala His	Glu Leu Ala His Gln	Trp Phe Gly Asp Leu	Val		
		380		385		390
2240	Thr Met Lys Trp	Trp Asp Asn Leu Trp	Leu Asn Glu Gly Phe	Ala		
		395		400		405
	Arg Phe Thr Glu	Phe Ile Gly Ala Gly	Gln Ile Thr Gln Asp	Asp		
		410		415		420
	Ala Arg Met Arg	Asn Tyr Phe Leu Ile	Asp Val Leu Glu Arg	Ala		
		425		430		435
	Leu Lys Ala Asp	Ser Val Ala Ser Ser	His Pro Leu Ser Phe	Arg		
		440		445		450
2245	Ile Asp Lys Ala	Ala Glu Val Glu Glu	Ala Phe Asp Asp Ile	Thr		
		455		460		465
	Tyr Ala Lys Gly	Ala Ser Val Leu Thr	Met Leu Arg Ala Leu	Ile		
		470		475		480
	Gly Glu Glu Lys	His Lys His Ala Val	Ser Gln Tyr Leu Lys	Lys		
		485		490		495
	Phe Ser Tyr Ser	Asn Ala Glu Ala Thr	Asp Leu Trp Ala Val	Phe		
		500		505		510
2250	Asp Glu Val Val	Thr Asp Val Glu Gly	Pro Asp Gly Lys Pro	Met		
		515		520		525
	Lys Thr Thr Glu	Phe Ala Ser Gln Trp	Thr Thr Gln Met Gly	Phe		
		530		535		540
	Pro Val Ile Ser	Val Ala Glu Phe Asn	Ser Thr Thr Leu Lys	Leu		
		545		550		555
	Thr Gln Ser Arg	Tyr Glu Ala Asn Lys	Asp Ala Val Glu Lys	Glu		
		560		565		570
2255	Lys Tyr Arg His	Pro Lys Tyr Gly Phe	Lys Trp Asp Ile Pro	Leu		
		575		580		585
	Trp Tyr Gln Glu	Gly Asp Lys Lys Glu	Ile Lys Arg Thr Trp	Leu		
		590		595		600
	Arg Arg Asp Glu	Pro Leu Tyr Leu His	Val Ser Asp Ala Gly	Ala		
		605		610		615
2260	Pro Phe Val Val	Asn Ala Asp Arg Tyr	Gly Phe Tyr Arg Gln	Asn		
		620		625		630
	His Asp Ala Asn	Gly Trp Lys Lys Ile	Ile Lys Gln Leu Lys	Asp		
		635		640		645
	Asn His Glu Val	Tyr Ser Pro Arg Thr	Arg Asn Val Ile Ile	Ser		
		650		655		660
	Asp Ala Phe Ala	Ala Ala Ala Thr Asp	Ala Ile Glu Tyr Glu	Thr		
		665		670		675
2265	Val Phe Glu Leu	Leu Asn Tyr Ala Glu	Lys Glu Thr Glu Tyr	Leu		
		680		685		690
	Pro Leu Glu Ile	Ala Met Ser Gly Ile	Ser Ser Ile Leu Lys	Tyr		
		695		700		705
	Phe Pro Thr Glu	Pro Glu Ala Lys Pro	Ala Gln Thr Tyr Met	Met		
		710		715		720
	Asn Ile Leu Lys	Pro Met Tyr Glu Lys	Ser Ser Ile Asp Phe	Ile		
		725		730		735
2270	Ala Asn Asn Tyr	Arg Asn Asp Lys Leu	Phe Phe Gln Ile Asn	Leu		
		740		745		750
	Gln Lys Asp Val	Ile Asp Met Phe Cys	Ala Leu Gly Ser Gln	Asp		
		755		760		765
	Cys Arg Lys Lys	Tyr Lys Lys Leu Phe	Asp Asp Glu Val Met	Asn		
		770		775		780
	Lys Cys Arg Asp	Gly Gln Ala Ala Thr	Glu Cys Val Arg Ile	Ala		
		785		790		795
2275	Ala Pro Leu Arg	Ser Ser Val Tyr Cys	Tyr Gly Val Lys Glu	Gly		
		800		805		810
	Gly Asp Tyr Ala	Ser Asp Lys Val Met	Glu Leu Tyr Thr Ala	Glu		
		815		820		825

RO 117709 B1

Thr	Leu	Ala	Leu	Glu	Lys	Asp	Phe	Leu	Arg	Leu	Ala	Leu	Gly	Cys	
				830					835					840	
His	Lys	Asp	Val	Thr	Ala	Leu	Lys	Gly	Leu	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu	2280
				845					850					855	
Asp	Arg	Asn	Ser	Ser	Phe	Val	Arg	Met	Gln	Asp	Ile	Pro	Ser	Ala	
				860					865					870	
Phe	Asn	Asp	Val	Ala	Ala	Asn	Pro	Ile	Gly	Glu	Glu	Phe	Ile	Phe	
				875					880					885	
Asn	Phe	Leu	Ile	Glu	Arg	Trp	Pro	Asp	Ile	Ile	Glu	Ser	Ile	Gly	
				890					895					900	2285
Thr	Lys	His	Thr	Tyr	Val	Glu	Lys	Val	Ile	Pro	Ala	Cys	Thr	Ser	
				905					910					915	
Gly	Ile	Arg	Ser	Gln	Gln	Gln	Ile	Asp	Gln	Leu	Lys	Asn	Leu	Gln	
				920					925					930	
Lys	Asn	Gly	Met	Asn	Ala	Arg	Gln	Phe	Gly	Ala	Phe	Asp	Lys	Ala	
				935					940					945	
Ile	Glu	Arg	Ala	Gln	Asn	Arg	Val	Asp	Trp	Ile	Lys	Lys	His	Phe	2290
				950					955					960	
Gln	Lys	Leu	Ala	Ala	Phe	Phe	Lys	Lys	Ala	Thr	Leu				
				965					970						

Revendicări

1. Polipeptide sintetice având activitate de enzimă aminopeptidazică sau o porțiune antigenică a acesteia, **caracterizate prin aceea că** acestea corespund, total sau parțial, secvențelor nucleotidice conform fig. 2, 3, 4 sau 5 (Secv. ID Nr. 1 la 15 și respectiv 19 la 21), sau o variantă echivalentă funcțional a acestora, alta decât o polipeptidă sintetică corespunzătoare dubletului proteic H11OD sau o polipeptidă sintetică aleasă dintre:
- a) Met Gly Tyr Pro Val Val Lys Val Glu Glu Phe
- b) Met Gly Phe Pro Val Leu Thr Val Glu Ser
- c) Met Gly/Phe Asn Phe Lys Ile Glu/Val Thr/Glu Ala Gly
- d) Met Lys Pro/Glu Thr/Val Lys Asp/Ala Thr/Lys Leu - Ile Thr
- e) Met Leu Ala Leu Asp Tyr His Ser-Phe Val
- f) Met Leu Ala Glu/Tyr Asp Gln/Ala Glu Asp Val
- g) Met Gly Phe Pro Leu Val Thr Val Glu Ala Phe Tyr
- h) Met Lys Thr Pro Glu Phe Ala Val/Leu Gln Ala Phe/Thr Ala Thr Ser/Gly Phe Pro
- i) Lys His/Tyr Asn/Val Ser Pro Ala Ala Glu Asn/Leu Leu Asn/Gly
- j) Lys-Thr Ser Val Ala Glu Ala Phe Asn
- k) Lys Ala Ala Glu Val Ala Glu Ala Phe Asp - Ile Lys Gly
- l) Lys Ala Val Glu Val/Pro Ala Glu Ala Phe Asp Asp Ile Thr? Tyr - - Gly Pro Ser
- m) Lys - Glu Glu Thr Glu Ile Phe Asn Met
- n) Lys - - - Pro Phe Asn/Asp Ile Glu Ala Leu
- o) Asp Gln Ala Phe Ser Thr Asp Ala Lys
- p) Met Gly Tyr Pro Val Val Lys Val Glu Glu Phe Ala Thr Ala Leu
- q) Met Gly Phe Pro Val Leu Thr Val Glu Ser - Tyr? - Thr
- r) Met Glu/Phe Asn Phe Leu Ile Glu/Val Thr/Glu Ala Gly -Ile Thr
- s) Met Gly Phe Leu Val Thr Val Glu Ala Phe Tyr - Thr Ser
- t) Met Lys Thr Pro Glu Phe Ala Val/Leu Gln Ala Phe/Thr Ala Thr Ser/Gly Phe Pro
- u) Met Lys Pro/Glu Thr/Val Leu Asp/Ala Thr/Lys Leu - Ile Thr Gly
- v) Met Leu Ala Leu Asp Tyr His Ser - Phe Val Gly?
- w) Met Leu Ala Glu/Tyr Asp Gln/Ala Glu Asp Val
- x) Lys His/Tyr Asn/Val Ser Pro Ala Ala Glu Asn/Leu Leu Asn/Gly
- y) Lys - Thr Ser Val Ala Glu Ala Phe Asn
- z) Lys Ala Ala Glu Val Ala Glu Ala Phe Asp - Ile - - Lys Gly
- aa) Lys Ala Val Glu Val/Pro Ala Glu Ala Phe Asp Asp Ile The? Tyr - - Gly Pro Ser

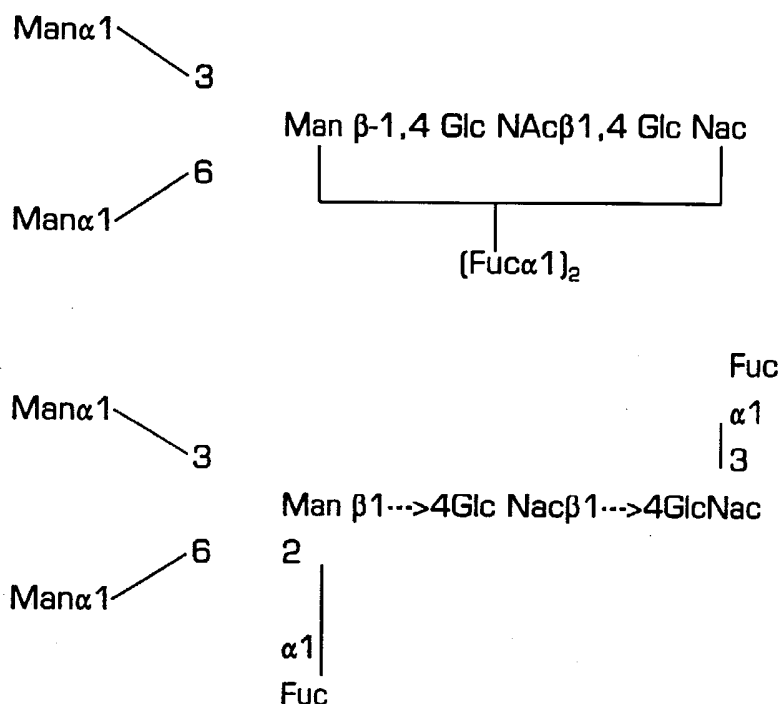
cc) Lys - - - Pro Phe Asn/Asp Ile Glu Ala Leu

dd) Asp Gln Ala Phe Ser Thr Asp Ala Lys

2. Polipeptide sintetice conform revendicării 1, **caracterizate prin aceea că acestea** cuprind o secvență de aminoacizi care constituie o enzimă aminopeptidazică sau o porțiune antigenică a acesteia, corespunzătoare în tot sau în parte secvențelor nucleotidice din fig. 2, 3, 4 sau 5 (Secv. ID Nr. 1 la 15 și 19 la 21), sau unei variante echivalente funcțional a acestora, substanțial lipsită de alte componente *Haemonchus contortus*.

3. Polipeptide sintetice conform revendicării 1, **caracterizate prin aceea că** sunt sub forma unei polipeptide de fuziune, care cuprinde o polipeptidă adițională, fuzionată la secvența de aminoacid ce constituie o enzimă aminopeptidazică sau o porțiune antigenică a acesteia, corespunzând în tot sau în parte secvențelor nucleotidice conform fig. 2, 3, 4 sau 5 (Secv ID Nr. 1 la 15 și 19 la 21), sau unei variante echivalente funcțional a acestora, substanțial liberă de alte componente *Haemonchus contortus*.

4. Polipeptidă sintetică conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că se leagă** prin glicozilare, o oligozaharidă pentru obținerea unui epitop ce este recunoscut în mecanismul de imunoreactivitate, oligozaharidă care are următoarea structură:



5. Molecule de acid nucleic, **caracterizate prin aceea că** acestea cuprind una sau mai multe secvențe nucleotidice care codifică enzime aminopeptidazice helmintice sau porțiuni antigenice ale acestora, corespunzătoare secvențelor nucleotidice din fig. 2, 3, 4 sau 5 (Secv. ID. Nr. 1 la 15 și 19 la 21 respectiv) sau unei porțiuni a acestora, sau secvențe codificând enzime aminopeptidazice helmintice care au o identitate de secvență de 50% sau mai mult, cu acestea, sau care hibridizează cu oricare dintre secvențele menționate în condiții de 2x(O,15M NaCl, 0,015M citrat de sodiu, pH 7,2) la temperatura camerei.

6. Molecule de acid nucleic, conform revendicării 5, **caracterizate prin aceea că** acestea cuprind una sau mai multe secvențe nucleotidice care codifică o polipeptidă capabilă să provoace anticorpi de protecție împotriva paraziților helmintici, secvențe care încorporează una sau mai multe regiuni care codifică determinanți antigenici dintre secvențele care codifică aminopeptidaze conform fig. 2, 3, 4 sau 5 (Secv. ID Nr. 1 la 15 și 19 la 21).

RO 117709 B1

7. Molecule de acid nucleic, conform revendicării 5, **caracterizate prin aceea că** acestea cuprind una sau mai multe secvențe nucleotidice care corespund la sau sunt complementare cu una sau mai multe secvențe selectate din secvențele clonelor M1, B1A, B1A-3', B2, M1SUS, AustB1, 014-015 (2,5PCR) 014-872 (3,5PCR clona2), A-649 (capătul 5' terminal al B1), A-650 (capătul 5' terminal al 2,5 PCR), A-649 (capătul 5' terminal al 3,5 PCR) 014-178 (capătul 3' terminal al AustB1 clona 2), 014-178 (capătul 3' terminal al AustB1 clonele 3 și 6), 014-872 (3,5 PCR clona 10) și 014-872 (3,5 PCR clona 19), H11-1, H11-2 și H11-3, Secv. ID Nr.: 1 la 15 și respectiv 19 la 21 conform figurilor 2, 3, 4 și 5 sau secvențe omoloage cu sau care hibridizează cu oricare dintre secvențele menționate. 2380
8. Procedeu de preparare a polipeptidelor sintetice, definite în revendicările 1...4, **caracterizat prin aceea că** acesta cuprinde: 2385
- clonarea vectorilor care conțin secvențele nucleotidice definite în revendicările 5...7 împreună cu un promotor și/sau amplificator și eventual un marker potrivit cum ar fi o genă care codifică pentru dihidrofolat-reductază sau glutamin-sintetază;
 - introducerea vectorilor în celule gazdă procariote sau eucariote, preferabil în sisteme de expresie eucariote nematodice sau mamaliene, folosind fosfat de calciu, dextran DEAE, polipren, prin fuziune protoplastică, cu lipozomi, prin microinjectare directă, țintirea genei sau electroporare, preferabil prin electroporare; 2390
 - cultivarea sistemului procariot sau eucariot astfel obținut în condiții care permit expresia polipeptidelor; 2395
 - recuperarea polipeptidelor astfel produse.
9. Compoziție de vaccin pentru stimularea răspunsurilor imune împotriva paraziților helmintici, **caracterizată prin aceea că** aceasta cuprinde cel puțin o polipeptidă sintetică care cuprinde o secvență a aminoacizilor care constituie o enzimă aminopeptidazică sau o porțiune antigenică a acesteia, definite în revendicarea 1, sau un virus sau o celulă gazdă având inserată o moleculă de acid nucleic definită în revendicările 5...7, împreună cu un purtător acceptabil farmaceutic. 2400

Președintele comisiei de examinare: **biochim. Crețu Adina**
Examinator: **biochim. Eremia Laura**

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
C 12 N 15/62;
C 07 K 9/00;
A 61 K 39/00;
C 07 H 13/04;

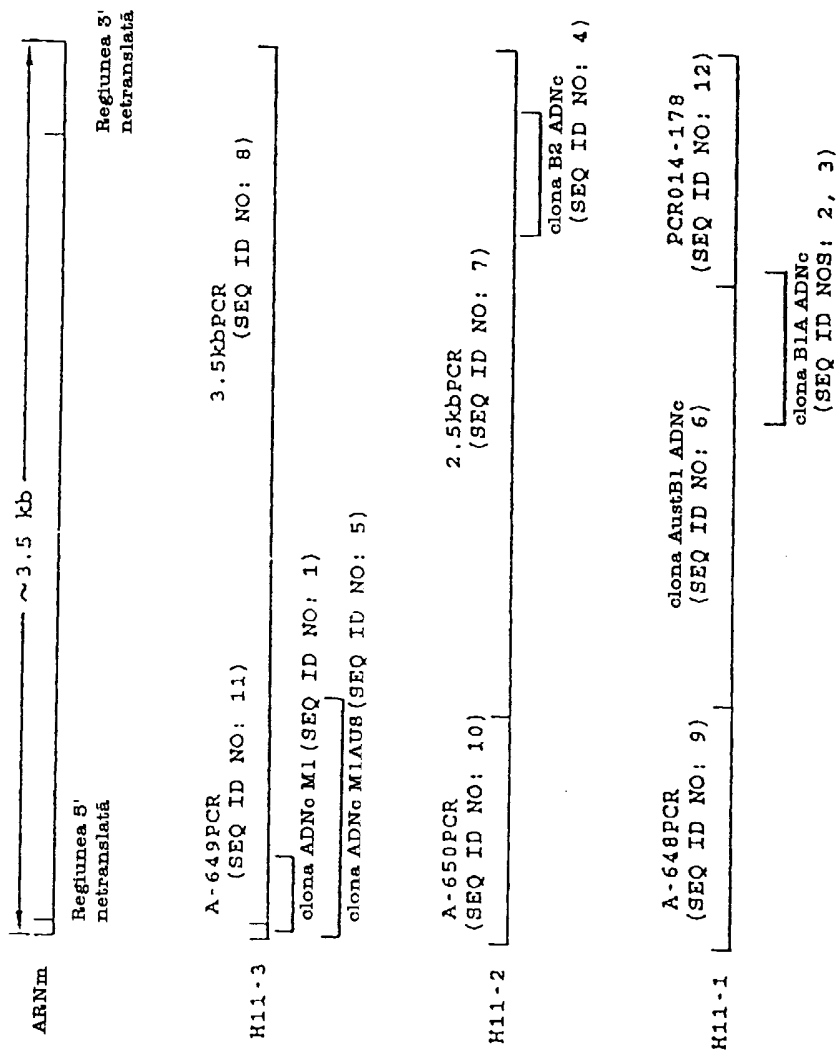


Fig. 1

RO 117709 B1

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
C 12 N 15/62;
C 07 K 9/00;
A 61 K 39/00;
C 07 H 13/04;

```

1
H11-3 GGTTTAATTA CCCAAGTTTG AGGGTCTCCA TCTAG..... 50
H11-2 GGTTTAATTA CCCAAGTTTG AG.....A
H11-1 GGTTTAATTA CCCAAGTTTG AGATGACAGC AGAGGAGAGT CAGGAGCAGG

51
H11-3 TGACGTCGCA GGGGAGAACG CGGACATTGC TGAATCTAAC TCCAATCCGT 100
H11-2 TGACGGCGGA GTGGCACAAG CCTCGAATCT TGGGCTTCTC ACCTATCAGC
H11-1 AGACGCAGCA ACCACGAAAA AATACAGTGC TACGGCTCAC CCAATCAAG

101
H11-3 CTTATTGTCG CATTATTTCT AGTAGCTGCT GCAGTCGGCC TCTCTATTGG 150
H11-2 CTACTTTGTA CATTATTTGT ATTAGCTGCT GCCGTTGGAC TCTCCATTGG
H11-1 TCTCTCTTTG CTTTGTTAGT GGTAGCTGCT GCCGTCGGCC TCTCAATCGG

151
H11-3 TCTCACCTAT TACTTTACTC GCAAAGCGTT CGATACCTCA GAAAAGCCAG 200
H11-2 TCTTACCTAT TACTTCACTC GTAAAGCATT CGATACCACA CAAAAAGAAC
H11-1 TCTCACCTAT TACTTTACAA GGAAAGCTTT TGATACTACT GGCGGAAATG

201
H11-3 GGAAGGATGA TACTGGTGGC AAGGACAAAG ACAATTCTCC CTCTGCGGGC 250
H11-2 AGAAGGATGA CAGTGGTGGT AAAGAAAAGG ATAATTCTCC TTCTGCAGAA
H11-1 GAAAAGGGGA TCAACCTATT GTCGAT...G ATAATTCCCC ATCAGCTGAA

251
H11-3 GAACTACTCC TTCCAATAA TATAAAACCA TTGTCTTACG ACTTGACGAT 300
H11-2 GAACTACTTC TTCCAACGAA CATAAAACCA GTCTCGTACG ACTTGAACAT
H11-1 GAATTACGTC TCCCAACAA CATAAAACCT TTGACATACG ACTTAGTAAT

301
H11-3 CAAAACATAT CTACCTGGTT ATGTGGACTT CCCACCGGAG AAAAACCTCA 350
H11-2 CAAAACATAT CTACCGGGTT ACGTGAACCT TCCACCAGAA AAGAATCTCA
H11-1 CAAAACGTAT CTGCCAACT ATGTAAACTA TCCACCTGAG AAAGATTTCG

351
H11-3 CATTCGATGG GCGTGTGGAA ATATCAATGG TTGTAATTGA GCCAACAAAG 400
H11-2 CATTTGATGC CCATGTGGAG ATTGCTATGG TTGTGGTTGA GCCTACAAAT
H11-1 CTATTGATGG GACTGTGGTG ATTGCTATGG AAGTTGTGGA GCCAACAAAG

401
H11-3 AGTATCGTAC TCAATTCAAA GAAGATCTCT GTAATACCCC AAGAATGTGA 450
H11-2 AGTATTGTGC TGAACTCGAA GAAAATCACT TTGGCACAAG GAGGATGCCA
H11-1 TCTATTGTGC TCAACTCGAA AAATATTCTT GTAATTGCAG ACCAGTGCCA

451
H11-3 ACTGGTATCG GCGGATAAAA AACTCGAAAT TGAAAGTGTA AAGGAGCACC 500
H11-2 ACTGTTCTCA GGTAATCAGA AACTTGACAT CGAAAGTGTA AAGATGCAGG
H11-1 ACTGTTTTCT AACAAACAAA AACTCGACAT CGAAAAGGTT GTGGATCAGC

501
H11-3 CAAGACTGGA AAAGGTTGAG TTTCTTATCA AAAGCCAACCT GGAAAAAGAT 550
H11-2 AAAGACTTGA CAAGCTTGAG ATTACCCTCA AAAATCAGCT GCAAAAAGAT
H11-1 CAAGGCTGGA GAAAGTCGAA TTCGTTTTGA AGAAAAAGCT GGAGAAGAAT

551
H11-3 CAACAAATCT TGCTCAAGGT CGGCTACATC GGTCTCATCA GCAACAGCTT 600
H11-2 CTGAAAATCC TGCTCAAGAT CACTTACACC GGCCTTATTA GCGACACTCT

```

Fig. 2

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
 C 12 N 15/62;
 C 07 K 9/00;
 A 61 K 39/00;
 C 07 H 13/04;

H11-1	CAGAAAAATCA	CGCTCAAGAT	TGTATACATT	GGCCTTATCA	ACGACATGCT	
	601					650
H11-3	TGGTGGAAATC	TACCAGACCA	CTTATACCA	CCCCGATGGC	ACCCCTAAGA	
H11-2	CGGTGGGCTC	TACCACTCCA	TCTACACTGA	TAAGGACGGA	AAAACTAAGA	
H11-1	TGGAGGACTT	TATCGAACAA	CCTACACGGA	TAAAGATGGT	ACAACCAAGA	
	651					700
H11-3	TCGCTGCAGT	TTCACAAAAT	GAGCCCATAG	ATGCTCGTCG	AATGGTACCA	
H11-2	TCGTTGCTGT	TTCACAAAAT	GAACCATCAG	ACGCTCGTCG	TATAGCGCCA	
H11-1	TTGCTGCATG	CACTCATATG	GAACCGACGG	ACGCCCGTCT	TATGGTCCCC	
	701					750
H11-3	TGCATGGATG	AACCGAAATA	CAAAGCAAAC	TGGACCGTTA	CTGTCAATTCA	
H11-2	TGCTTTGACG	AACCGAAGTA	CAAGGCAACA	TGGACTGTCA	CCGTCGTTCA	
H11-1	TGTTTCGACG	AGCCGACGTT	TAAGGCAAAC	TGGACTGTGA	CTGTGATTCA	
	751					800
H11-3	TCCAAAAGGC	ACCAAAGCCG	TCTCGAATGG	AATCGAAGTG	AACGGAGATG	
H11-2	TCCCAAAGGT	ACAAAGGCTG	CATCGAACGG	CATTGAAGCA	AATGGAAAAAG	
H11-1	TCCGAAGGGC	ACCAAGTCCG	TGTCTGAATG	AATAGAA...	AAGGGAGAAG	
	801					850
H11-3	GAGAGATCAG	TGGTGATTGG	ATCACATCGA	AGTTCTTGAC	TACTCCACGG	
H11-2	GGGAGCTCAA	GGGTGATTGG	ATAACGTCTA	AATTTAAAC	TACCCACCG	
H11-1	GAGAAGTCTC	TGGCGATTGG	GTCAACAACA	GATTGATCC	AACCCCGCGA	
	851					900
H11-3	ATGTCATCCT	ACTTGTTGGC	AGTTATGGTT	TCAGAATTTG	AATACATCGA	
H11-2	ATGTCGTCCT	ATTTATTGGC	TATTATTGTT	TGTGAATTTG	AATACATTGA	
H11-1	ATGCCTTCGT	ATTTGATTGC	TCTTGTGATT	TCCGAATTTA	AGTACATTGA	
	901					950
H11-3	AGGTGAAACA	AAGACGGGTG	TTCGGTTCCG	TATATGGTCA	CGCCCAGAGG	
H11-2	AGGATTTACA	AAAACGGGTG	TTCGGTTCCG	TATATGGTCT	CGACCAGAGG	
H11-1	AAATTATACG	AAAAGCGGTG	TTCGATTCCG	AATTCCGGCT	CGTCCGGAAG	
	951					1000
H11-3	CAAAGAAGAT	GACACAATAT	GCTCTGCAAT	CTGGTATCAA	GTGCATAGAA	
H11-2	CGAAACGAAT	GACGGCATA	GCTTTGGATG	CTGGCATCAG	ATGCCTGGAG	
H11-1	CTATGAAGAT	GACAGAATAT	GCCATGATAG	CTGGAATCAA	ATGTTTGGAT	
	1001					1050
H11-3	TTCTACGAAG	ATTTCTTTGA	TATCAGATTC	CCTCTGAAGA	AACAAGATAT	
H11-2	TTCTATGAGA	AGTTCTTTGA	CATAAAATTC	CCTCTGGAAA	AACAAGATAT	
H11-1	TACTATGAGG	ACTTCTTCGG	GATCAAATTC	CCACTTCCAA	AACAAGATAT	
	1051					1100
H11-3	GA'TTGCCCTT	CCTGATTTCT	CTGCCGGTGC	CATGGAGAAT	TGGGGCCTCA	
H11-2	GATTGCTCTT	CCTGATTTCA	CCGCTGGTGC	CATGGAAAAC	TGGGGCCTTA	
H11-1	GGTTGCTCTT	CCTGACTTCT	CATCTGGTGC	TATGGAGAAC	TGGGGTCTCA	
	1101					1150
H11-3	TCACTTACAG	GGAAAACCTCT	TTGTTGTACG	ATGACAGATT	CTATGCACCG	
H11-2	TCACTTATAG	AGAGGATTCT	CTCCTATACG	ATGAAAAAAT	TTATGCACCG	
H11-1	TCACATACAG	GGAGCCTTCC	GTGCTCTACG	ATGAAAACCT	CTACGGACCA	
	1151					1200

Fig. 2 (continuare)

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
 C 12 N 15/62;
 C 07 K 9/00;
 A 61 K 39/00;
 C 07 H 13/04;

H11-3	ATGAATAAAC	AGCGAATTGC	TCCGATTCGT	GCTCATGAGC	TTGCTCATCA	
H11-2	ATGAATAAAC	AGCGGGTTGC	TCTCGTACTT	GCTCACCAGC	TTGCTCATCA	
H11-1	ATGAATAAGG	AGCGGGTTGC	AGAAGTGATC	GCGCACGAAC	TTGCACATCA	
	1201					1250
H11-3	GTGGTTCGGC	GACTTGGTTA	CGATGAAGTG	GTGGGATAAT	TTGTGGTTGA	
H11-2	GTGGTTCGGC	AATCTGGTCA	CACTGAAGTG	GTGGGATGAT	ACGTGGTTGA	
H11-1	GTGGTTCGGT	AATTTGGTCA	CGATGAAGTG	GTGGGATAAC	CTATGGCTGA	
	1251					1300
H11-3	ATGAACGTTT	TGCAAGATTC	ACAGAATTTA	TTGGAGCTGG	TCAGATAACT	
H11-2	ACGAAGGTTT	TGCAACATTT	GTTGAGTATC	TTGGAATGGA	CGAAATTAGC	
H11-1	ACGAAGGATT	CGCGTCATTC	GTGGAATACA	TCCGAGCCGA	CTTCATCAGC	
	1301					1350
H11-3	CAAGATGACG	CCAGAATGAG	GAAGTACTTC	CTGATTGATG	TACTTGAACG	
H11-2	CACAACAATT	TCAGAACGCA	AGATTTCTTC	TTGCTCGATG	GAATGGATCG	
H11-1	GATGGTCTAT	GGGAAATGAA	AGATTTCTTC	CTGCTGGCAC	CGTACACAAG	
	1351					1400
H11-3	CGCTTTGAAA	GCTGATTCGG	TAGCGTCAAG	CCATCCACTT	TCCTTCAGAA	
H11-2	CGGAATGAGA	GCTGACTCGG	CAGCATCGAG	CCATCCGCTT	TCGTTTAGGA	
H11-1	TGGTATTACG	GCTGATGCAG	TAGCTTCAAG	CCATCCGCTT	TCCTTCAGAA	
	1401					1450
H11-3	TCGACAAAGC	TGCAGAAGTT	GAAGAAGCCT	TTGATGATAT	CACATACGCC	
H11-2	TTGACAAAGC	GGCAGAAGTT	CCCAGAAGCCT	TTGACGATAT	TTCATACGCC	
H11-1	TAGATAAGGC	TGCAGATGTA	TCAGAAGCGT	TGGATGATAT	CACATACCGT	
	1451					1500
H11-3	AAAGGAGCTT	CTGTTCTTAC	TATGCTGAGA	GCCTTGATTG	GAGAAGAAAA	
H11-2	AAGGGAGCGT	CAGTTCTCAC	TATGCTACGG	GCTTTGATTG	GAGAGGACAA	
H11-1	AAAGGAGCAT	CCGTTCTTCA	AATGCTATTG	AATTTAGTTG	GGGACGAAAA	
	1501					1550
H11-3	ACATAAGCAT	GCAGTATCGC	AGTACCTCAA	GAAGTTCTCG	TATAGCAATG	
H11-2	TTACAGGAAT	GCTGTTGTGC	AATACCTCAA	GAAGTTCTCC	TACAGCAATG	
H11-1	TTTCAAGCAG	TCTGTTTCGC	GTTACCTCAA	GAAGTTTTC	TATGATAATG	
	1551					1600
H11-3	CAGAAGCGAC	TGATCTATGG	GCAGTTTTTG	ATGAAGTTGT	CACTGACGTC	
H11-2	CACAAGCAGC	CGATCTGTGG	AACGTCTTCA	ATGAAGTTGT	CAAAGGTGTT	
H11-1	CGGCTGCTGA	AGATTTATGG	GCAGCATTCG	ACGAAACCGT	CCAAGGTATA	
	1601					1650
H11-3	GAAGGTCCAG	ACGGCAAACC	TATGAAAACC	ACAGAGTTTG	CAAGTCAGTG	
H11-2	AAGGTCCTG	ACGGCAACGT	CATGAAAATC	GACCAATTTA	CCGATCAGTG	
H11-1	ACCGGACCTA	ATGGTCCACC	ATTGAAAATG	TCCGAGTTTG	CGCCACAATG	
	1651					1700
H11-3	GACGACTCAG	ATGGGCTTCC	CAGTTATTTT	CGTAGCAGAG	TTTAACTCGA	
H11-2	CACGTATCAG	ATGGGCTTATC	CTGTGGTTAA	AGTAGAAGAA	TTTAAATGCGA	
H11-1	GACAATCAG	ATGGGCTTCC	CTGTCTTAC	TGTGAGTCC	GTTAACGCAA	
	1701					1750
H11-3	CTACTTTGAA	ATTAACGCAA	AGTCGATATG	AGGCGAATAA	AGACGCTGTG	
H11-2	CCGCCCTAAA	GGTTACGCAG	AGCCGCTACA	AGACAAATAA	AGACGCCCTG	
H11-1	CGACTTTGAA	AGTCACCCAA	AAACGATACA	GGCAGAACAA	GGATGCAAAG	

Fig. 2 (continuare)

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;

C 12 N 15/62;

C 07 K 9/00;

A 61 K 39/00;

C 07 H 13/04;

```

1751
H11-3 GAGAAAGAGA AGTACCGTCA CCCGAAATAC GGATTTAAAT GGGATATTCC 1800
H11-2 GAACCAGAGA AATATCGTAA TCCAAAATAC GGGTTCAAGT GGGATGTTCC
H11-1 GAACCAGAGA AGTACCGTCA TCCAACTTAT GGGTTCAAAT GGGATGTTCC

1801
H11-3 ACTGTGGTAT CAGGAAGGCG ATAAGAAGGA GATAAAGCGA ACATGGTTGA 1850
H11-2 CCTATGGTAT CAGGAAGGCA ATAGCAAAGA GGTGAAGCGA ACATGGCTAA
H11-1 TCTGTGGTAT CAGGAAGATG AA...CAGCA AGTGAAAAGA ACTTGGTTAA

1851
H11-3 GAAGAGATGA ACCGCTTTAC TTGCATGTTA GTGATGCTGG CGCTCCCTTT 1900
H11-2 AAAGAGATGA ACCGCTGTAC TTGAACGTCA ACAATCGGGA TACATCCCTT
H11-1 AAAGAGAGGA ACCGCTCTAT TTCCATGTAA GCAATTCTGA TTCGTCAGTT

1901
H11-3 GTGGTGAACG CAGACCGCTA TGGATTTTAT CGACAAAATC ATGACGCTAA 1950
H11-2 GTGGTGAACG CTGATCGACA TGGATTTTAT CGACAAAATC ATGATGCCAA
H11-1 GTGGTGAATG CCGAACGTCG TGCTTTTTGC CGATCAAATC ATGACGCTAA

1951
H11-3 TGGTTGGAAA AAGATAATCA AGCAGCTCAA GGATAATCAT GAGGTTTACA 2000
H11-2 CGGTTGGAAA AAGATAATCA AGCAGCTCAA GAAAGATCAC AAGGTCTTCG
H11-1 CGGTTGGAGG AACATTATGA GAAGACTCAA GCAGAATCAT AAGGTCTATG

2001
H11-3 GTCCCCGGAC AAGGAATGTC ATCATTAGCG ATGCGTTTGC TCGCGCTGCA 2050
H11-2 GTCCAAGGAC AAGGAACGCT ATCATAAGCG ATGCATTTCG TGCAGCTACG
H11-1 GTCCACGAAC AAGGAACGCT CTCATAAGTG ATGCGTTTGC AGCAGCTGCA

2051
H11-3 ACTGACGCAA TTGAGIATGA GACTGTATTT GAACTTCTGA ATTATGCCGA 2100
H11-2 ATTGACGCAA TCGACTATGA AACTGTATTC GAACTACTTG AATATGCCAA
H11-1 GTTGAGGAAA TGAATTACGA GACCGTATTT GAAATGCTCA AATACACCGT

2101
H11-3 AAAAGAAACG GAATATCTAC CATTAGAAAT CGCAATGTCC GGGATCTCTT 2150
H11-2 AAATGAAGAG GAATCTTTCG CTTGGAAGGA AGCTCTGTCC GGCATGTTCC
H11-1 GAAAGAAGAG GATTACTTAC CATGGAAGGA GGCAATATCA GGATTCAATA

2151
H11-3 CGATTTTGAA ATACTTCCCT ACCGAGCCAG AGGCAAAGCC AGCTCAAACA 2200
H11-2 CAGTTTTAAA GTTCTTCGGT AATGAGCCGG AGACAAAACC AGCTAGAGCT
H11-1 CAATTTTGGA CTTTTTCGGC ACCGAACCCG AATCTCAATG GGCTTCGGAA

2201
H11-3 TACATGATGA ACATATTGAA ACCGATGTAT GAAAAAAGCA GTATCGACTT 2250
H11-2 TACATGATGA GCATATTAGA ACCGATGTAT AATAAGAGCA GCATTGATTA
H11-1 TACATGCCAA AACTCATGAA GCCAATTTAT GACAAGAGTA GCATCAAGTT

2251
H11-3 CATTGCCAAT AACTACAGAA ATGACAAGCT GTTTTTCCAA ATCAACCTCC 2300
H11-2 CATCGTCAAG AATTATTTGG ATCATACGTT ATTACAAAAA ATTAATACTC
H11-1 TATAGCGGAG AACTACAAAA AAGATTCCGT TTTCTTCAAA AATAATCTCC

2301
H11-3 AAAAAGATGT CATTGATATG TTCTGCGCCC TCGGATCGCA AGACTGCAGG 2350
H11-2 AAAAGCATAT CATTGATGCA TATTGTTCCC TTGGATCAAA GGACTGTATA

```

Fig. 2 (continuare)

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
 C 12 N 15/62;
 C 07 K 9/00;
 A 61 K 39/00;
 C 07 H 13/04;

H11-1 AAATAGCTGT TATTGACACA TACTGTGGTC TTGGAGGCAA AGAATGTCTT

2351 2400
 H11-3 AAGCAATATA AAAAACTTTT CGATGACGAA GTCATGAACA AATGCAGGGA
 H11-2 AAGCAATATA AGGATATCTT CTACGATGAG GTTATGCCCA AGTGTAAAGGC
 H11-1 GAAGAAATGA AAAAGCTTTT TGACAAGGAG GTCATG...A AATGTCAACC

2401 2450
 H11-3 TGGTCAAGCA GCAACCGAAT GCGTAAGAAT CGCCGCTCCT CTCCGATCAA
 H11-2 CGGGGAAGCA GCAACCAAAT GCGTTAAGGT TTCCGCTCCT CTTGAGGCA
 H11-1 TGGTCAGCAA GCGACCGACT GCGTAAAGGT AACTGCTCCT CTCCGAAAAA

2451 2500
 H11-3 GTGTTTATTG TTATGGTGTG AAGGAAGGCG GTGATTATGC TTCCGACAAG
 H11-2 ATGTTTACTG TTATGGTGTG CAGGAAGGTG GTGAAGAAGC TTTTGAAAAG
 H11-1 CTGTTTACTG CTATGGGGTC CAGGAAGGCG GTGATGAGGC ATTGACAAG

2501 2550
 H11-3 GTGATGGAGC TTTATACGGC CGAAACACTC GCCCTAGAAA AAGACTTCCT
 H11-2 GTGATGGGGC TGTATCTAGC AGAAGATGTT CAACTGGAGA AGGGTATCCT
 H11-1 GTCATGGAAC TATATAATGC GGAACAAGTG CAGTTGGAGA AAGACAGTCT

2551 2600
 H11-3 ACGCCTAGCA TTGGGATGTC ATAAAGATGT TACTGCTTTG AAAGGACTTC
 H11-2 GTTCAAAGCC TTGGCATGCC ACAAAGATGT TACAGCTCTA AAAGAAGTTC
 H11-1 ACGTGAAGCA TTGGGATGCC ATAAAGACGT TACAGCTCTA AAGGGACTTC

2601 2650
 H11-3 TCTTGCGGGC TCTGGACAGG AATTCGTCGT TCGTACGTAT GCAGGATATC
 H11-2 TTTTGCGAGC CCTGGACCGT AAATCGTCGT TTGTGCGTCT TCAGGATGTC
 H11-1 TTATGCTGGC TTGGATCGG AATTCGTCAT TTGTGCGTCT TCAAGATGCT

2651 2700
 H11-3 CCAAGTGCTT TCAACGATGT AGCAGCAAAT CCTATTGGCG AAGAATTCAT
 H11-2 CCTACCGCTT TCCGTGCTGT ATCTGAAAAC CCTGTGGGCG AAGAATTCAT
 H11-1 CATGATGTGT TTAACATTGT ATCCAGAAAT CCTGTTGGAA ACGAACTGCT

2701 2750
 H11-3 TTTCAATTTC CTTATTGAGA GATGGCCAGA TATCATTGAA AGTATAGGAA
 H11-2 GTTCAATTTC CTAATGGAGA GATGGGAGGA AATCACTGCG AGCTTGGA
 H11-1 GTTCAATTTC CTCACAGAGC GATGGGAAGA GATACTTGAA AGTTTGTC

2751 2800
 H11-3 CGAAGCACAC ATATGTTGAG AAAGTGATAC CAGCCTGCAC TTCAGGAATC
 H11-2 CAGAACACAG AGCAGTTGAT AAAGTGGTCG GCGCTTGTG CACAGGAATT
 H11-1 TACGACACAG ATCAGTTGAT CGAGTGATCA AAGCCTGTAC TCGAGGACTA

2801 2850
 H11-3 CGCTCACAAC AGCAGATTGA CCAGCTGAAG AATCTGCAGA AAAATGGCAT
 H11-2 CGCTCCCAAC AACAAATAGA TCAGCTGAAG AATCTACAGA AGAACAATGC
 H11-1 CGATCCAGGG AACAAGTACA ACAGTTGAAG AATCTATACA AAAATGACAA

2851 2900
 H11-3 GAACGCTCGT CAATTCGGTG CATTTCGATA AGCAATCGAA CGAGCACAAA
 H11-2 GCAGGCTAAG AAGTTCCGCT CATTACCCCA GGAAATCGAA AAAGGAGAAC
 H11-1 GCGTGCTCGC GAATACGGTG CATTTCGGTG GGCAATAGAA AGATCGGAAC

2901 2950
 H11-3 ATAGGGTGGG TTGGATTAAA AAACATTTC CAAAAATTAGC GGCTTCTTC
 H11-2 ATAAAAATTGC CTGGATCAAG AAACATTTC ACAGATTATC GGAATTCTTC
 H11-1 ACAGAGTCAA ATGGATTGAG AAACATTTC GAAAACTAGC AGCTTCTTC

2951 2958
 H11-3 AAGAAAGCCA CCTTGTA
 H11-2 AAGAGAGCAA GATCATAG
 H11-1 AAAAAATCTA ATTCTATA

Fig. 2 (continuare)

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
 C 12 N 15/62;
 C 07 K 9/00;
 A 61 K 39/00;
 C 07 H 13/04;

M1	1				50
AustM1	ATGACGTCGC	AGGGGAGAAC	C GCGGACATTG	CTGAATCTAA	CTCCAATCCG
H11-3	ATGACGTCGC	AGGGGAGAAC	GCGGACATTG	CTGAATCTAA	CTCCAATCCG
M1	51				100
AustM1	TCTTATTGTC	GCATTATTTT	TAGTAGCTGC	TGCAGTCGGC	CTCTCTATTG
H11-3	TCTTATTGTC	GCATTATTTT	TAGTAGCTGC	TGCAGTCGGC	CTCTCTATTG
M1	101				150
AustM1	GTCTCACCTA	TTACTTTTACT	CGCAAAGCGT	TCGATACCTC	AGAAAAGCCA
H11-3	GTCTCACCTA	TTACTTTTACT	CGCAAAGCGT	TCGATACCTC	AGAAAAGCCA
M1	151				200
AustM1	GGAAGGATG	ATACTGGTGG	CAAGGACAAA	GACAATTCTC	CCTCTGCGGC
H11-3	GGAAGGATG	ATACTGGTGG	CAAGGACAAA	GACAATTCTC	CCTCTGCGGC
M1	201				250
AustM1	GGAAGTACTT	CTTCCAAGTA	ATATAAAACC	ATTGTCTTAC	GACTTGACGA
H11-3	GGAAGTACTC	CTTCCAAGTA	ATATAAAACC	ATTGTCTTAC	GACTTGACGA
M1	251				300
AustM1	TCAAAACATA	TCTACCTGGT	TATGTGGACT	TCCCACCGGA	GAAAAACCTC
H11-3	TCAAAACATA	TCTACCTGGT	TATGTGGACT	TCCCACCGGA	GAAAAACCTC
M1	301				350
AustM1	ACATTTCGACG	GGCG			
H11-3	ACATTTCGATG	GGCGTGTGGA	AATATCAATG	GTTGTAATTG	AGCCAACAAA
M1	351				400
AustM1	GAGTATCGTA	CTCAATTCAA	AGAAGATCTC	TGTAATACCC	CAAGAATGTG
H11-3	GAGTATCGTA	CTCAATTCAA	AGAAGATCTC	TGTAATACCC	CAAGAATGTG
M1	401				450
AustM1	AACTGGTATC	GGGCGATAAA	AAATTCGAAA	TTGAAAGTGT	AAAGGAGCAC
H11-3	AACTGGTATC	GGGCGATAAA	AAATTCGAAA	TTGAAAGTGT	AAAGGAGCAC
M1	451				500
AustM1	CCAAGACTGC	AAAAGGTTGA	GTTTCTTATC	AAAAGCCAAC	TGGAAAAAGA
H11-3	CCAAGACTGC	AAAAGGTTGA	GTTTCTTATC	AAAAGCCAAC	TGGAAAAAGA
M1	501				550
AustM1	TTACACAAATC	TTGCTCAAGT	CGGCTTACAT	CGGTCTCATC	AGCAACAGCC
H11-3	TCAACAAATC	TTGCTCAAGG	TGGGCTACAT	CGGTCTCATC	AGCAACAGCT
M1	551				600
AustM1	TTGCTGGAAT	CTACCAGACC	ACTTATACCA	CCCCGGATGG	CACCCCTAAG
H11-3	TTGCTGGAAT	CTACCAGACC	ACTTATACCA	CCCCGGATGG	CACCCCTAAG
M1	601				650
AustM1	ATCGCTGCAG	TTTCACAAAA	TGAGCCCAT	GATGCTCGTC	GAATGGTACC
H11-3	ATCGCTGCAG	TTTCACAAAA	TGAGCCCAT	GATGCTCGTC	GAATGGTACC

Fig. 3

RO 117709 B1

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
C 12 N 15/62;
C 07 K 9/00;
A 61 K 39/00;
C 07 H 13/04;

	651		700
AustM1	ATGCATGGAT GAACCGAAAT ACAAAGCAAA CTGGACCGTT ACTGTCATT		
H11-3	ATGCATGGAT GAACCGAAAT ACAAAGCAAA CTGGACCGTT ACTGTCATT		
	701		750
AustM1	ATCCAAAAGG CACCAAAGCC GTCTCGAATG GAATCGAAGT GAACGGAGAT		
H11-3	ATCCAAAAGG CACCAAAGCC GTCTCGAATG GAATCGAAGT GAACGGAGAT		
	751		800
AustM1	GGAGAGATCA GTGGTGATTG GATCACATCG AAGTTCTTGA CTA		
H11-3	GGAGAGATCA GTGGTGATTG GATCACATCG AAGTTCTTGA CTA		
	801		850
AustM1	GATGTCATCC TACTTGTTGG CAGTTATGGT TTCAGAATTT GAATACATCG		
H11-3	GATGTCATCC TACTTGTTGG CAGTTATGGT TTCAGAATTT GAATACATCG		
	851		900
AustM1	AAGGTGAAAC AAAGACGGGT GTTCGGTTCC GTATATGGTC ACGCCAGAG		
H11-3	AAGGTGAAAC AAAGACGGGT GTTCGGTTCC GTATATGGTC ACGCCAGAG		
	901		950
AustM1	GCAAAGAAGA TGACACAATA TGCTCTGCAA TCTGGTATCA AGTGCATA		
H11-3	GCAAAGAAGA TGACACAATA TGCTCTGCAA TCTGGTATCA AGTGCATAGA		
	951		1000
H11-3	ATTCTACGAA GATTCTTTG ATATCAGATT CCCTCTGAAG AAACAAGATA		
	1001		1050
H11-3	TGATTGCCCT TCCTGATTTC TCTGCCGGTG CCATGGAGAA TTGGGGCCTC		
	1051		1100
H11-3	ATCACTTACA GGGAAACTC TTTGTTGTAC GATGACAGAT TCTATGCACC		
	1101		1150
H11-3	GATGAATAAA CAGCGAATTG CTCGCATTGT TGCTCATGAG CTTGCTCATC		
	1151		1200
H11-3	AGTGGTTCCG CCACTTGGTT ACGATGAAGT GGTGGGATAA TTTGTGGTTG		
	1201		1250
H11-3	AATGAAGGTT TTGCAAGATT CACAGAATTT ATTGGAGCTG GTCAGATAAC		
	1251		1300
H11-3	TCAAGATGAC GCCAGAATGA GGAACACTT CCTGATTGAT GTACTTGAAC		
	1301		1350
H11-3	GCGCTTTGAA AGCTGATTCC GTAGCGTCAA GCCATCCACT TTCCTTCAGA		
	1351		1400
H11-3	ATCGACAAAG CTGCAGAAGT TGAAGAAGCC TTTGATGATA TCACATACGC		
	1401		1450
H11-3	CAAAGGAGCT TCTGTTCTTA CTATGCTGAG AGCCTTGATT GCAGAAGAAA		
	1451		1500
H11-3	AACATAAGCA TGCAGTATCG CAGTACCTCA AGAAGTTCTC GTATAGCAAT		
	1501		1550

Fig. 3 (continuare)

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
 C 12 N 15/62;
 C 07 K 9/00;
 A 61 K 39/00;
 C 07 H 13/04;

H11-3 GCAGAAGCGA CTGATCTATG GGCAGTTTTT GATGAAGTTG TCACTGACGT
 1551 1600
 H11-3 CGAAGGTCCA GACGGCAAAC CTATGAAAAC CACAGAGTTT GCAAGTCACT
 1601 1650
 H11-3 GGACGACTCA GATGGGCTTC CCAGTTATTT CCGTAGCAGA GTTTAACTCG
 1651 1700
 H11-3 ACTACTTTGA AATTAACGCA AAGTCGATAT GAGGCGAATA AAGACGCTGT
 1701 1750
 H11-3 GGAGAAAGAG AAGTACCGTC ACCCGAAATA CGGATTTAAA TGGGATATTC
 1751 1800
 H11-3 CACTGTGGTA TCAGGAAGGC GATAAGAAGG AGATAAAGCG AACATGGTTG
 1801 1850
 H11-3 AGAAGAGATG AACCCCTTTA CTTGCATGTT AGTGATGCTG GCGCTCCCTT
 1851 1900
 H11-3 TGTGGTGAAC GCAGACCGCT ATGGATTTTA TCGACAAAAT CATGACGCTA
 1901 1950
 H11-3 ATGGTTGGAA AAAGATAATC AAGCAGCTCA AGGATAATCA TGAGGTTTAC
 1951 2000
 H11-3 AGTCCCCGGA CAAGGATGT CATCATTAGC GATGCGTTTG CTGCGGCTGC
 2001 2050
 H11-3 AACTGACGCA ATTGATATG AACTGTATT TGAACCTCTG AATTATGCCG
 2051 2100
 H11-3 AAAAAGAAAC CGAATATCTA CCATTAGAAA TCGCAATGTC CGGGATCTCT
 2101 2150
 H11-3 TCGATTTTGA AATACTTCCC TACCGAGCCA GAGGCAAAGC CAGCTCAAAC
 2151 2200
 H11-3 ATACATGATG AACATATTGA AACCGATGTA TGAAAAAAGC AGTATCGACT
 2201 2250
 H11-3 TCATTGCCAA TAACTACAGA AATGACAAGC TGTTTTTCCA AATCAACCTC
 2251 2300
 H11-3 CAAAAAGATG TCATTGATAT GTTCTGCGCC CTCGGATCGC AAGACTGCAG
 2301 2350
 H11-3 GAAGAAATAT AAAAACTTT TCGATGACGA AGTCATGAAC AAATGCAGGG
 2351 2400
 H11-3 ATGGTCAAGC AGCAACCGAA TCGTAAGAA TCGCCGCTCC TCTCCGATCA
 2401 2450
 H11-3 ACTGTTTATT CTTATGCTGT CAAGGAAGGC GGTGATTATG CTTCCGACAA
 2451 2500
 H11-3 GGTGATCGAG CTTATACCG CCGAAACACT CGCCCTAGAA AAAGACTTCC

Fig. 3 (continuare)

RO 117709 B1

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
C 12 N 15/62;
C 07 K 9/00;
A 61 K 39/00;
C 07 H 13/04;

```
H11-3 2501 TACGCCCTAGC ATTGGGATGT CATAAAGATG TTA CTGCTTT GAAAGGACTT 2550
H11-3 2551 CTCCTGCCGGG CTCCTGACAG GAATTCTGTCG TTCGTACGTA TGCAGGATAT 2600
H11-3 2601 CCCAAGTGCT TTCAACGATG TAGCAGCAAA TCCTATTGGC GAAGAATTCA 2650
H11-3 2651 TTTTCAATTT CCTTATTGAG AGATGGCCAG ATATCATTGA AAGTATAGGA 2700
H11-3 2701 ACCGAAGCACA CATATGTTGA GAAAGTGATA CCAGCCTGCA CTTCAGGAAT 2750
H11-3 2751 CCGCTCACAA CAGCAGATTG ACCAGCTGAA GAATCTGCAG AAAAATGGCA 2800
H11-3 2801 TGAACGCTCG TCAATTCCGT GCATTGATA AAGCAATCGA ACGAGCACAA 2850
H11-3 2851 AATAGGGTGG ATTGGATTAA AAAACATTTC CAAAAATTAG CGGCTTTCTT 2900
H11-3 2901 CAAGAAAGCC ACCTTGTA 2919
```

Fig. 3 (continuare)

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
 C 12 N 15/62;
 C 07 K 9/00;
 A 61 K 39/00;
 C 07 H 13/04;

H11-2 GGTTTAATTA CCCAAGCTTG AGATGACGGC GGAGTGGCAG AAGCGTCGAA 50
 H11-2 TCTTGGGCTT CTCACCTATC AGCCTACTTT GTACATTATT TGTATTAGCT 100
 H11-2 GCTGCCGTTG GACTCTCCAT TGGTCTTACC TATTACTTCA CTCGTAAAGC 150
 H11-2 ATTCGATACC ACACAAAAAG AACAGAAGGA TGACAGTGGT GGTAAAGAAA 200
 H11-2 AGGATAATTC TCCTTCTGCA GAAGAACTAC TTCTTCCAAC GAACATAAAA 250
 H11-2 CCAGTCTCGT ACGACTTGAA CATCAAAACA TATCTACCGG GTTACGTGAA 300
 H11-2 CTTTCCACCA GAAAAGAATC TCACATTTGA TGCCCATGTG GAGATTGCTA 350
 H11-2 TGGTTGTGGT TGAGCCTACA AATAGTATTG TGCTGAACTC GAAGAAAATC 400
 H11-2 ACTTTGGCAC AAGGAGGATG CGAACTGTTT TCAGGTAATC AGAAACTTGA 450
 H11-2 CATCGAAAGT GTAAAGATGC AGGAAAGACT TGACAAGCTT GAGATTACCC 500
 H11-2 TCAAAAATCA GCTGCAAAAA GATCTGAAAA TCCTGCTCAA GATCACTTAC 550
 H11-2 ACCGGCCTTA TTAGCGACAC TCTCGGTGGG CTCTACCAGT CCATCTACAC 600
 H11-2 TGATAAGGAC GGAAAAACTA AGATCGTTGC TGTTTCACAA AATGAACCAT 650
 H11-2 CAGACGCTCG TCGTATACCG CCATGCTTTG ACGAACCGAA GTACAAGGCA 700
 H11-2 ACATGGACTG TCACCGTGGT TCATCCCAAA GGTACAAAGG CTGCATCGAA 750
 H11-2 CGGCATTGAA GCAAATGGAA AAGGGGAGCT CAAGGGTGAT TGGATAACGT 800
 H11-2 CTAAATTTAA AACTACCCCA CCGATGTCGT CCTATTTATT GGCTATTATT 850
 H11-2 GTTTGTGAAT TTGAATACAT TGAAGGATTT ACAAAAACGG GTGTTCGGTT 900
 H11-2 CCGTATATGG TCTCGACCAG AGGCGAAACG AATGACGGCA TACGCTTTGG 950
 H11-2 ATGCTGGCAT CAGATGCCTG GAGTTCTATG AGAAGTTCTT TGACATAAAA 1000
 H11-2 TTCCCTCTGG AAAAACAAGA TATGATTGCT CTCCTGATT TCACCGCTGG 1050
 H11-2 TGCCATGGAA AACTGGGGCC TTATCACTTA TAGAGAGGAT TCTCTCCTAT 1100
 H11-2 ACGATGAAAA AATTTATGCA CCGATGAATA AACAGCGGGT TGCTCTCGTA 1150
 H11-2 GTTGCTCACG AGCTTGCTCA TCAGTGGTTC GGCAATCTGG TCACACTGAA 1200
 H11-2 GTGGTGGGAT GATACGTGCT TGAACGAAGG TTTTGCAACA TTTGTTGAGT 1250
 H11-2 ATCTTGGAAT GGACGAAATT AGCCACAACA ATTTCAGAAC GCAAGATTTC 1300
 H11-2 TTCTTGCTCG ATGGAATGGA TCGCGGAATG AGAGCTGACT CGGCAGCATC 1350
 H11-2 GAGCCATCCG CTTTCGTTTA GGATTGACAA ACCGGCAGAA GTTGCCGAAG 1400
 H11-2 CCTTTGACGA TATTTCAATC GCCAAGGGAG CGTCAGTTCT CACTATGCTA 1450

Fig. 4

RO 117709 B1

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
C 12 N 15/62;
C 07 K 9/00;
A 61 K 39/00;
C 07 H 13/04;

```

H11-2  CCGGCTTTGA  TTGGAGAGGA  CAATTACAGG  AATGCTGTTG  TGCAATACCT  1500
H11-2  CAAGAAGTTC  TCCTACAGCA  ATGCACAAGC  AGCCGATCTG  TGGAACGTCT  1550
H11-2  TCAATGAAGT  TGTCAAAGGT  GTTAAGGGTC  CTGACGCCAA  CGTCATGAAA  1600
H11-2  ATCGACCAAT  TTACCGATCA  GTGGACGTAT  CAGATGGGTT  ATCCTGTGGT  1650
H11-2  TAAAGTAGAA  GAATTTAATG  CGACCGCCCT  AAAGGTTACG  CAGAGCCGGT  1700
H11-2  ACAAGACAAA  TAAAGACGCC  TTGGAACCAG  AGAAATATCG  TAATCCAAAA  1750
H11-2  TACGGGTTC  AGTGGGATGT  TCCCTATGG  TATCAGGAAG  GCAATAGCAA  1800
H11-2  AGAGGTGAAG  CGAACATGGC  TAAAAAGAGA  TGAACCGCTG  TACTTGAACG  1850
H11-2  TCAACAATCG  GGATACATCC  CTTGTGGTGA  ACGCTGATCG  ACATGGATTT  1900
H11-2  TATCGACAAA  ACTATGATGC  CAACGGTTGG  AAAAAGATAA  TCAAGCAGCT  1950
H11-2  CAAGAAAGAT  CACAAGGTCT  TCGGTCCAAG  GACAAGGAAC  GCTATCATAA  2000
H11-2  GCGATGCATT  TGCTGCAGCT  ACGATTGACG  CAATCGACTA  TGAAACTGTA  2050
H11-2  TTCGAACTAC  TTGAATATGC  CAAAAATGAA  GAGGAATTCT  TGCCTTGGAA  2100
H11-2  GGAAGCTCTG  TCCGGCATGT  TCGCAGTTTT  AAAGTTCTTC  GGTAATGAGC  2150
H11-2  CGGAGACAAA  ACCAGCTAGA  GCTTACATGA  TGAGCATATT  AGAACCGATG  2200
H11-2  TATAATAAGA  GCAGCATTGA  TTACATCGTC  AAGAATTATT  TGCATGATAC  2250
H11-2  GTTATTACA  AAAATTAATA  CTCAAAAGGA  TATCATTGAT  GCATATTGTT  2300
H11-2  CCCTTGGATC  AAAGGACTGT  ATAAAGCAAT  ATAAGGATAT  CTCTACGAT  2350
H11-2  GAGGTTATGC  CCAAGTGTA  GCGCGGGAA  GCAGCAACCA  AATGCGTTAA  2400
H11-2  GGTTCGCT  CCTCTTCGAG  CCAATGTTTA  CTGTTATGGT  GTACAGGAAG  2450
H11-2  GTGGTGAAGA  AGCTTTTGAA  AAGGIGATGG  GGCTGTATCT  ACCAGAAGAT  2500
H11-2  GTTCAACTGG  AGAAGGTAT  CCTGTTCAAA  GCCTTGGCAT  GCCACAAAGA  2550
H11-2  TGTTACAGCT  CTAAAAGAAC  TTCTTTTGG  AGCCCTGGAC  CGTAAATCGT  2600
H11-2  CGTTTGTGG  TCTTCAGGAT  GTCCCTACCG  CTTTCCGTGC  TGTATCTGAA  2650
B2  GGA  4
H11-2  AACCTGTGG  CGGAAGAATT  CATGTTCAAT  TTCCTAATGG  AGAGATGGGA  2700
B2  GGAAATCACT  CCGAGCTTGG  AAACAGAACA  CAGAGCAGTT  GATAAAGTGG  54
H11-2  GGAAATCACT  CCGAGCTTGG  AAACAGAACA  CAGAGCAGTT  GATAAAGTGG  2750
B2  TCGGCGCTTG  TTGCACAGGA  ATTGGCTCCC  AACAACAAAT  AGATCAGCTG  104
H11-2  TCGGCGCTTG  TTGCACAGGA  ATTGGCTCCC  AACAACAAAT  AGATCAGCTG  2800
B2  AAGAAGAATC  TACAGAAGAA  CAATGCGCAG  GCTAAGAAGT  TC.....  154

```

Fig. 4 (continuare)

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
 C 12 N 15/62;
 C 07 K 9/00;
 A 61 K 39/00;
 C 07 H 13/04;

```

H11-2  AAGAA...TC TACAGAAGAA CAATGCGCAG GCTAAGAAGT TCGGCTCATT 2850
B2      .....CATAA AATTGCCTGG ATCAAGAAAC 204
H11-2  CACCCAGGAA ATCGAAAAAG GAGAACATAA AATTGCCTGG ATCAAGAAAC 2900
B2      ATTTTCACAG ATTATCGGAA TTCTTCAAGA GAGCAAGATC ATAGCTTTTC
H11-2  ATTTTCACAG ATTATCGGAA TTCTTCAAGA GAGCAAGATC ATAGCTTTTC 2950
B2      ACACTGAGCT CCAATTTTAA CGTCTTCAA CTAGGAGACA GTTTTGCTGA
H11-2  ACACTGAGCT CCAATTTTAA CGTCTTCAA CTAGGAGACA GTTTTGCTGA 3000
B2      AAAGTCAGTT TCACATTTTC CGTTTGAATG CCATCCATTG GAATACAACC
H11-2  AAAGTCAGTT TCACATTTTC CGTTTGAATG CCATCCATTG GAATACAACC 3050
B2      AA...CCCA TTTTAAGTAC CTTTCATTCA CAGTGATTAC TAAATTTTGA
H11-2  AATAATACCA TTTTAAGTAC CTTTCATTCA CAGTGATTAC TGAATTTTGA 3100
B2      ATATATTATG AAGCTTGTAT CTTGAACGTT ATGATCGGTG ACTTTCAATT
H11-2  ATATATCATG AAGCTTGTAT CTTGAACGTT ATGATCGGTG ACTTTCAATT 3150
B2      TATAGAGCTC ACTCTCCATT TTGTAGCTGT GATGACTTGC ATTTAAGACC
H11-2  TATAGAGCTC ACTCTCCATT TTGTAGCTGT GATGACTTGC ATTTAAGACC 3200
B2      CACCATTTAC CAGCCTATAA TCTTTCCCA ATACATTCCA AACTCCGATC
H11-2  CACCATTTAC CAGCCTAGAA TCTTTCCCA ATACATTCCA AACTCCGATC 3250
B2      ACCTCCACCG CTGACAATGC CCAGATTGTG TTCTTTGTCT GCTATCCATC
H11-2  ACCTCCACCG CTGACAATGC CCAGATTGTG TTCTTTGTCT GCTATCCATC 3300
B2      TAACTGTTTC GAT
H11-2  TAACTGTTTC GATCGCCGGT TGTTTGTC AA TTGCTTATCT GATAAATATT 3350
H11-2  GACGTTGGTG T 3361

```

Fig. 4 (continuare)

RO 117709 B1

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
C 12 N 15/62;
C 07 K 9/00;
A 61 K 39/00;
C 07 H 13/04;

```

1 50
H11-1 GGTTTAATTA CCCAAGTTTG AGATGACAGC AGAGGAGAGT CAGGAGCAGC

51 100
H11-1 AGACGCAGCA ACCACGAAAA AATACAGTGC TACGGCTCAC CCCAATCAAG

101 150
H11-1 TCTCTCTTTG CTTTGTTAGT GGTAGCTGCT GCCGTCGGCC TCTCAATCGG

151 200
H11-1 TCTCACCTAT TACTTTACAA GGAAAGCTTT TGATACTACT GGCGGAAATG

201 250
H11-1 GAAAAGGGGA TCAACCTATT GTCGATGATA ATTCCCCATC AGCTGAAGAA

251 300
H11-1 TTACGTCTCC CAACAACCAT AAAACCTTTG ACATACGACT TAGTAATCAA

301 350
H11-1 AACGTATCTG CCAAATATG TAAACTATCC ACCTGAGAAA GATTTCGCTA

351 400
H11-1 TTGATCGGAC TGTGGTGATT GCTATGGAAG TTGTGGAGCC AACAAAGTCT

401 450
H11-1 ATTGTGCTCA ACTCGAAAAA TATTCCTGTA ATTGCAGACC AGTGCGAACT

451 500
H11-1 GTTTTCTAAC AACCAGAAAC TCGACATCGA AAAGGTTGTG GATCAGCCAA

501 550
H11-1 GGCTGCAGAA AGTCGAATTC GTTTTGAAGA AAAAGCTGGA GAAGAATCAG

551 600
H11-1 AAAATCACGC TCAAGATTGT ATACATTGGC CTTATCAACG ACATGCTTGG

601 650
H11-1 AGGACTTTAT CGAACAACTT ACACGGATAA AGATGGTACA ACCAAGATTG

651 700
H11-1 CTGCATGCAC TCATATGGAA CCGACGGACG CCCGTCTTAT GGTCCCCTGT

701 750
H11-1 TTCGACGAGC CGACGTTTAA GGCAAACTGG ACTGTGACTG TGATTTCATCC

751 800
H11-1 GAAGGGCACC AGTGCCGTGT CGAATGGAAT AGAAAAGGGA GAAGGAGAAG

801 850
H11-1 TCTCTGGCGA TTGGGTCACA ACCAGATTCG ATCCAACCCC GCGAATGCCT

851 900
H11-1 TCGTATTTGA TTGCTCTTGT GATTTCCGAA TTAAAGTACA TTGAAAATTA

901 950
AustB1 AATTCC GGCTCGTCCG GAAGCTATGA
H11-1 TACGAAAAGC GGTGTTTCGAT TCCGAATTCC GGCTCGTCCG GAAGCTATGA

```

Fig. 5

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
 C 12 N 15/62;
 C 07 K 9/00;
 A 61 K 39/00;
 C 07 H 13/04;

```

      951                               1000
AustB1 AGATGACAGA ATATGCCATG ATAGCTGGAA TCAAATGTTT GGATTACTAT
H11-1  AGATGACAGA ATATGCCATG ATAGCTGGAA TCAAATGTTT GGATTACTAT

      1001                               1050
AustB1 GAGGACTTCT TCGGGATCAA ATTCCCACTT CCAAAACAAG ATATGGTTGC
H11-1  GAGGACTTCT TCGGGATCAA ATTCCCACTT CCAAAACAAG ATATGGTTGC

      1051                               1100
AustB1 TCTTCCTGAC TTCTCATCTG GTGCTATGGA GAACTGGGGT CTCATCACAT
H11-1  TCTTCCTGAC TTCTCATCTG GTGCTATGGA GAACTGGGGT CTCATCACAT

      1101                               1150
AustB1 ACAGGGAGGG TTCCGTGCTC TACGATGAAA ACCTCTACGG ACCAATGAAT
H11-1  ACAGGGAGGG TTCCGTGCTC TACGATGAAA ACCTCTACGG ACCAATGAAT

      1151                               1200
AustB1 AAGGAGCGGG TTGCAGAAGT GATCGCGCAC GAACTTGCAC ATCAGTGTTT
H11-1  AAGGAGCGGG TTGCAGAAGT GATCGCGCAC GAACTTGCAC ATCAGTGTTT

      1201                               1250
AustB1 CCGTAATTTG GTCACGATGA AGTGGTGCGA TAACCTATGG CTGAACGAAG
H11-1  CCGTAATTTG GTCACGATGA AGTGGTGCGA TAACCTATGG CTGAACGAAG

      1251                               1300
AustB1 GATTCCGCTC ATTCGTGGAA TACATCGGAG CCGACTTCAT CAGCGATGGT
H11-1  GATTCCGCTC ATTCGTGGAA TACATCGGAG CCGACTTCAT CAGCGATGGT

      1301                               1350
AustB1 CTATGGGAAA TGAAAGATTT CTTCTGCTC GCACCGTACA CAAGTGGTAT
H11-1  CTATGGGAAA TGAAAGATTT CTTCTGCTC GCACCGTACA CAAGTGGTAT

      1351                               1400
AustB1 TACGGCTGAT GCAGTAGCTT CAAGCCATCC GCTTTCCTTC AGAATAGATA
H11-1  TACGGCTGAT GCAGTAGCTT CAAGCCATCC GCTTTCCTTC AGAATAGATA

      1401                               1450
AustB1 AGGCTGCAGA TGTATCAGAA GCGTTCGATG ATATCACATA CCGTAAAGGA
H11-1  AGGCTGCAGA TGTATCAGAA GCGTTCGATG ATATCACATA CCGTAAAGGA

      1451                               1500
AustB1 GCATCCGTTT TTCAAATGCT ATTGAATTTA GTTGGGGACG AAAATTTCAA
H11-1  GCATCCGTTT TTCAAATGCT ATTGAATTTA GTTGGGGACG AAAATTTCAA

      1501                               1550
AustB1 GCAGTCTGTT TCGCGTTACC TCAAGAAGTT TTCATATGAT AATGCGGCTG
H11-1  GCAGTCTGTT TCGCGTTACC TCAAGAAGTT TTCATATGAT AATGCGGCTG

      1551                               1600
AustB1 CTGAAGATTT ATGGGCAGCA TTCGACGAAA CCGTCCAAGG TATAACCGGA
H11-1  CTGAAGATTT ATGGGCAGCA TTCGACGAAA CCGTCCAAGG TATAACCGGA

      1601                               1650
AustB1 CCTAATGGTG GACCATTGAA AATGTCCGAG TTTGCGCCAC AATGGACAAC
H11-1  CCTAATGGTG GACCATTGAA AATGTCCGAG TTTGCGCCAC AATGGACAAC

      1651                               1700
AustB1 TCAGATGGCG TTCCCTGCTC TTAATGTCGA GTCGGTTAAC GCAACGACTT

```

Fig. 5 (continuare)

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
C 12 N 15/62;
C 07 K 9/00;
A 61 K 39/00;
C 07 H 13/04;

```

H11-1 TCAGATGGGG TTCCCTGTTC TTA CTGTCTGA GTCCGTTAAC CCAACGACTT

1701 1750
AustB1 TGAAGTCAC CCAAAAACGA TACAGGCAGA ACAAGGATGC AAAGGAACCA
H11-1 TGAAGTCAC CCAAAAACGA TACAGGCAGA ACAAGGATGC AAAGGAACCA

1751 1800
AustB1 GAGAAGTACC GTCATCCAAC TTATGGGTTC AAATGGGATG TTCCTCTGTG
H11-1 GAGAAGTACC GTCATCCAAC TTATGGGTTC AAATGGGATG TTCCTCTGTG

1801 1850
AustB1 GTATCAGGAA GATGAACAGC AAGTGAAAAG AACTTGGTTA AAAAGAGAGG
H11-1 GTATCAGGAA GATGAACAGC AAGTGAAAAG AACTTGGTTA AAAAGAGAGG

1851 1900
AustB1 AACCGCTCTA TTTCATGTA AGCAATTCTG ATTCGTCAGT TGTGGTGAAT
H11-1 AACCGCTCTA TTTCATGTA AGCAATTCTG ATTCGTCAGT TGTGGTGAAT

1901 1950
AustB1 GCCGAACGTC GTGCTTTTIG CCGATCAAAC TATGACGCTA ACGGTTGGAG
H11-1 GCCGAACGTC GTGCTTTTIG CCGATCAAAC TATGACGCTA ACGGTTGGAG

1951 2000
AustB1 GAACATTATG AGAAGACTCA AGCAGAATCA TAAGGTCTAT GGTCCACGAA
H11-1 GAACATTATG AGAAGACTCA AGCAGAATCA TAAGGTCTAT GGTCCACGAA

2001 2050
AustB1 CAAGAAACGC TCTCATAAGT GATGCGTTTG CAGCAGCTGC AGTTGAGGAA
H11-1 CAAGAAACGC TCTCATAAGT GATGCGTTTG CAGCAGCTGC AGTTGAGGAA

2051 2100
AustB1 ATGAATTACG AGACCGTATT TGAATGCTC AAATACACCG TGAAGAAGA
H11-1 ATGAATTACG AGACCGTATT TGAATGCTC AAATACACCG TGAAGAAGA

2101 2150
AustB1 GGATTACTTA CCATGGAAGG AGGCAATATC AGGATTCAAT ACAATTTTGG
B1a GCAATATC AGGATTCAAT ACAATTTTGG
H11-1 GGATTACTTA CCATGGAAGG AGGCAATATC AGGATTCAAT ACAATTTTGG

2151 2200
AustB1 ACTTTTTCGG CAGCGAACCC GAATCTCAAT GGGCTTCGGA ATACATGCGA
B1a ACTTTTTCGG CAGCGAACCC GAATCTCAAT GGGCTTCGGA ATACATGCGA
H11-1 ACTTTTTCGG CAGCGAACCC GAATCTCAAT GGGCTTCGGA ATACATGCGA

2201 2250
AustB1 AAACGTATGA AGCCAATTTA TGACAAGAGT AGCATCAAGT TTATAGCGGA
B1a AAACGTATGA AGCCAATTTA TGACAAGAGT AGCATCAAGT TTATAGCGGA
H11-1 AAACGTATGA AGCCAATTTA TGACAAGAGT AGCATCAAGT TTATAGCGGA

2251 2300
AustB1 GAACTACAAA AAAGATTGCG TTTTCTTCAA AAATAATCTC CAAATAGCTG
B1a GAACTACAAA AAAGATTGCG TTTTCTTCAA AAATAATCTC CAAATAGCTG
H11-1 GAACTACAAA AAAGATTGCG TTTTCTTCAA AAATAATCTC CAAATAGCTG

2301 2350
AustB1 TTATTGACAC ATACTGTGCT CTTGGAGGCA AAGAATGTCT TGAAGAAATG
B1a TTATTGACAC ATACTGTGCT CTTGGAGGCA AAGAATGTCT TGAAGAAATG
H11-1 TTATTGACAC ATACTGTGCT CTTGGAGGCA AAGAATGTCT TGAAGAAATG

```

Fig. 5 (continuare)

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
 C 12 N 15/62;
 C 07 K 9/00;
 A 61 K 39/00;
 C 07 H 13/04;

```

2351                                     2400
AustB1 AAAAAGCTTT TTGACAAGGA GGCATGAAA TGTCAACCTG GTCAGCAAGC
B1a AAAAAGCTTT TTGACAAGGA GGCATGAAA TGTCAACCTG GTCAGCAAGC
H11-1 AAAAAGCTTT TTGACAAGGA GGCATGAAA TGTCAACCTG GTCAGCAAGC

2401                                     2450
AustB1 GACCGACTGC GTAAAGGTAA CTGCTCCTCT CCGAAAAACT GTTTACTGCT
B1a GACCGACTGC GTAAAGGTAA CTGCTCCTCT CCGAAAAACT GTTTACTGCT
H11-1 GACCGACTGC GTAAAGGTAA CTGCTCCTCT CCGAAAAACT GTTTACTGCT

2451                                     2500
AustB1 ATGGGGTCCA GGAAGGCGGT GATGAGGCAT TCGACAAGGT GATGGAAC TA
B1a ATGGGGTCCA GGAAGGCGGT GATGAGGCAT TCGACAAGGT GATGGAAC TA
H11-1 ATGGGGTCCA GGAAGGCGGT GATGAGGCAT TCGACAAGGT GATGGAAC TA

2501                                     2550
AustB1 TATAATGCGG AACAAAGTGA GTTGGAGAAA GACAGTCTAC GTGAAGCATT
B1a TATAATGCGG AACAAAGTGA GTTGGAGAAA GACAGTCTAC GTGAAGCATT
H11-1 TATAATGCGG AACAAAGTGA GTTGGAGAAA GACAGTCTAC GTGAAGCATT

2551                                     2600
AustB1 GGGATGCCAT AAAGACGTTA CAGCTCTAAA GGGACTTCTT ATGCTGGCTT
B1a GGGATGCCAT AAAGACGTTA CAGCTCTAAA GGGACTTCTT ATGCTGGCTT
H11-1 GGGATGCCAT AAAGACGTTA CAGCTCTAAA GGGACTTCTT ATGCTGGCTT

2601                                     2650
AustB1 TGGATCGGAA TTC
B1a TGGATC
H11-1 TGGATCGGAA TTCGTCATTT GTGCGTCTTC AAGATGCTCA TGATGTGTTT

2651                                     2700
H11-1 AACATTGTAT CCAGAAATCC TGTGGAAAC GAACTGCTGT TCAATTTCTT

2701                                     2750
H11-1 CACAGAGCGA TGGGAAGAGA TACTTGAAAG TTTGTCAATA CGACACAGAT

2751                                     2800
H11-1 CAGTTGATCG AGTGATCAAA GCCTGTACTC GAGGACTACG ATCCAGGGAA

2801                                     2850
H11-1 CAAGTACAAC AGTTGAAGAA TCTATACAAA AATGACAAGC GTGCTCGCGA

2851                                     2900
H11-1 ATACGGTGCA TTTGGTGGG CAATAGAAAG ATCGGAACAC AGAGTCAAAT

2901                                     2950
H11-1 GGATTGAGAA ACATTTCCGA AAAGTAGCAG CTTTCTTCAA AAAATCTAAT

2951                                     3000
H11-1 TCATAATTCT GAAATGGCTA TAACTAGCAC ACTGGATAGT TGTCTCGAAT

3001                                     3050
H11-1 CATCCAAAAA GATTAATGAT GTTTTTTTAC TAGATAATAT CGAGATATTC

3051                                     3084
H11-1 TCTAAATTTG TCATCGATTG AAGTGTCTGT ATTG

```

Fig. 5 (continuare)

**(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
C 12 N 15/62;
C 07 K 9/00;
A 61 K 39/00;
C 07 H 13/04;**

[illegible]

Fig. 6a

Fig. 6bII

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
C 12 N 15/62;
C 07 K 9/00;
A 61 K 39/00;
C 07 H 13/04;

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
MTAESQEQTOOPRQINVLRLTPKSLFALLVVAAGLSIGLTYFTKJAFDTTQONOKOQPIVDDHSPSAEELRLPTTIKPLTYDLVIKTYLPIHY
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
HYPPKEDFAIDQTVIAHEVETPKSIVLNSQIIPVIADQCELSFMRKIDIEKVVDQPRLEKVEFVLKXKLEQKQITLKIIVYIOLINDHLOGLYRTY
210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
TDKQTTKIALACTHIEPTDARLKNVFCFDEPTFKJAWTVYIHPKOTSAVNSNOIEKQEQEVQODHVTTRTQTPRHPSPYLIJLVISEFKYIENTTSGOVR
310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
RIPARPEAMQOTTEYAMTQIKCLOYYEDFGIKFLPKQDMVALPDPQJQJAHNMLITYREOSVLYDEHLVORHOKERIVALEVIAJHJELAHQMTOMLVTK
410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
WMDHULHNEOTAGFVEYIOADFIQOOLMTKMTFFILAPYTHOITADAVAHNIPRLGFRINDKAAADVGEAFDDITYRKQAGVLOHILHLVQDHPKQNVRYL
510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
XXFSYDIHAALEDLHAAFDQTVQOITOPHODPLKHGETAFQWTTQKGFVLTVESVIAATTLKVTOKRYRQIKQAKEXEKVRIIPTYOFKWDVPLVYQEDQO
|||||
MOPPLTVES
610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
VTRATMLKREELYFHVSNSSQSVVNAERAFCSRSHQDAJHQRHIIHRAZLKQHKVYQPTBHALISDAFAJAAVEEQYETVTEKLTATYKESDYLPMKE
710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
A190FNTILOFTQSEPEQWASBYHAKLHKEPIYDKS9IKFIJALEHNTQDSLPFQWNLQJAVZDTYCOLOGKECLEEHQKLFQKENVKQCPQOQATDCVKT
810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
APLBAKTVYCYOVQEQDDEAFDRVHMLYHAEQVQLEKDSLEALQCHQDVTAJLQGLALQDS9SFVRLQDQJHVDVFNIV9RNPVQNEILLFNLTERTHEEI
|||||
HLAJOYHIXFY
910 920 930 940 950 960 970
LESLSI9H9SVDRVIEACTROL99REQVQOQJLXULYEDQJALREYQAFQOALIER99ZHVNVHIECHFECLAAJFKQ999+

P.p.B

P.p.C

Fig. 7a

TEHRAVDKVVGVACCTOIR900QDQLKLNLOHNAQAKTOSTTQZIKOZKNCIAIXKQIFHRLJSEFFKLRD*

Fig. 7b

323

Fig. 7c

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
C 12 N 15/62;
C 07 K 9/00;
A 61 K 39/00;
C 07 H 13/04;

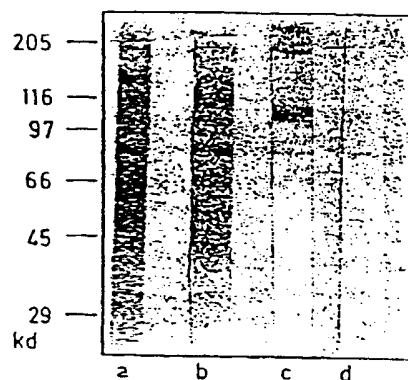


Fig. 8

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
C 12 N 15/62;
C 07 K 9/00;
A 61 K 39/00;
C 07 H 13/04;

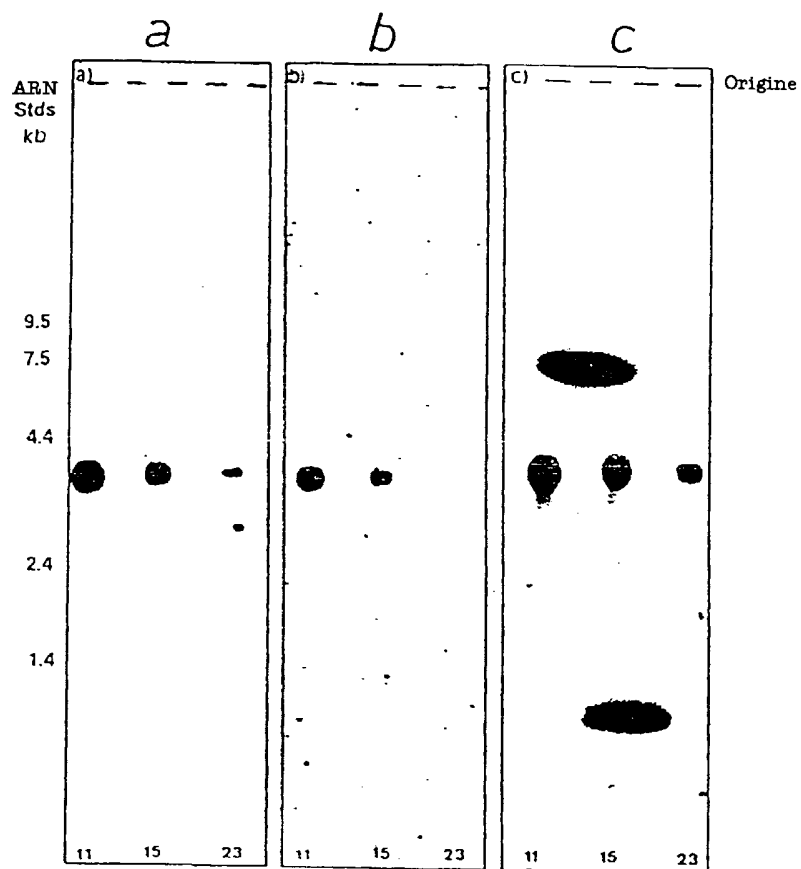


Fig. 9

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
 C 12 N 15/62;
 C 07 K 9/00;
 A 61 K 39/00;
 C 07 H 13/04;

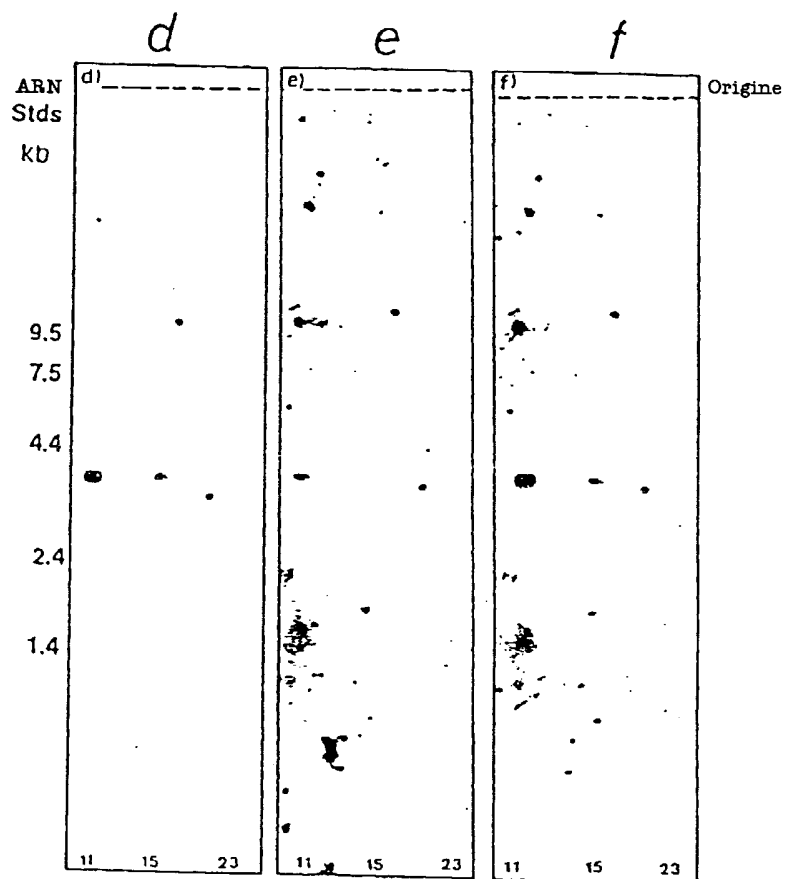


Fig. 9

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
C 12 N 15/62;
C 07 K 9/00;
A 61 K 39/00;
C 07 H 13/04;

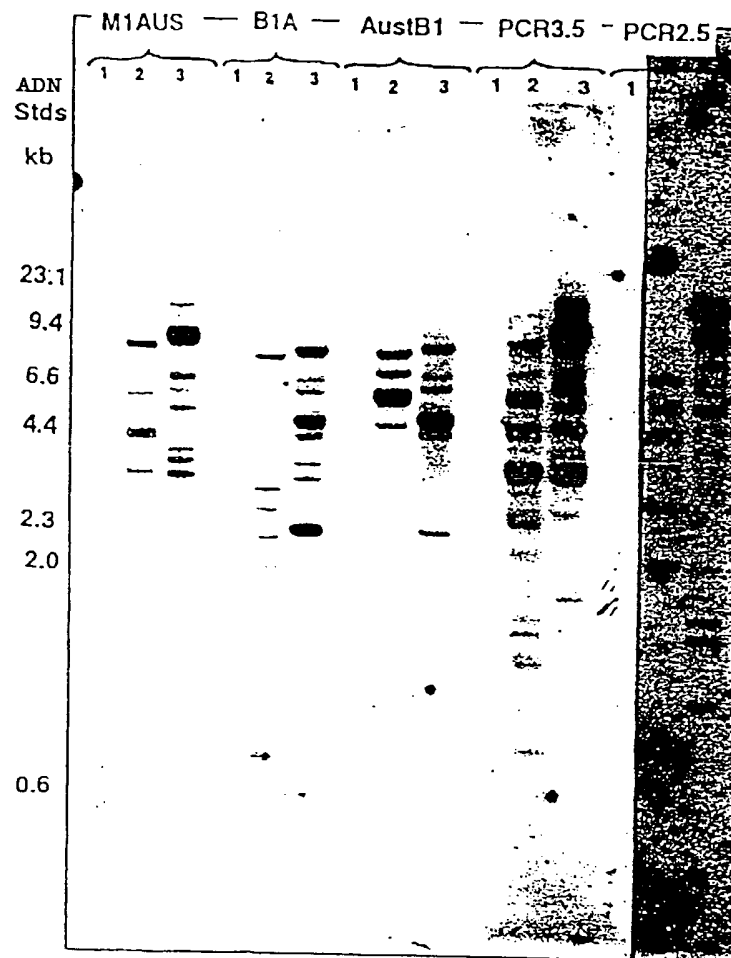


Fig. 10a

RO 117709 B1

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
C 12 N 15/62;
C 07 K 9/00;
A 61 K 39/00;
C 07 H 13/04;

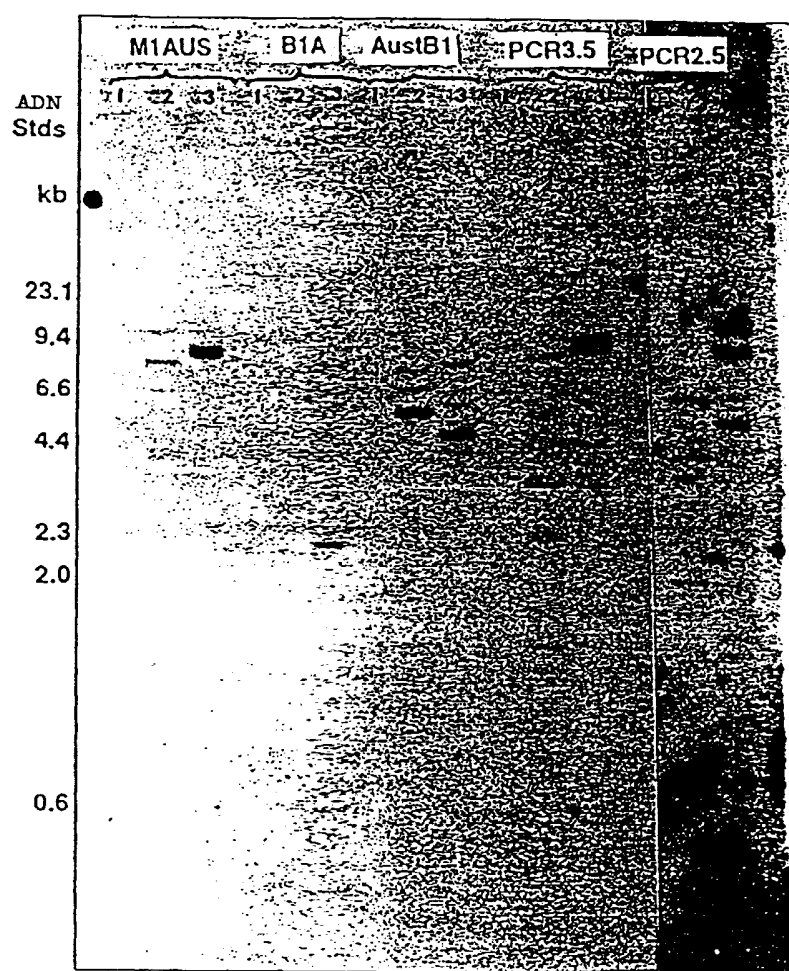


Fig. 10b

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
C 12 N 15/62;
C 07 K 9/00;
A 61 K 39/00;
C 07 H 13/04;

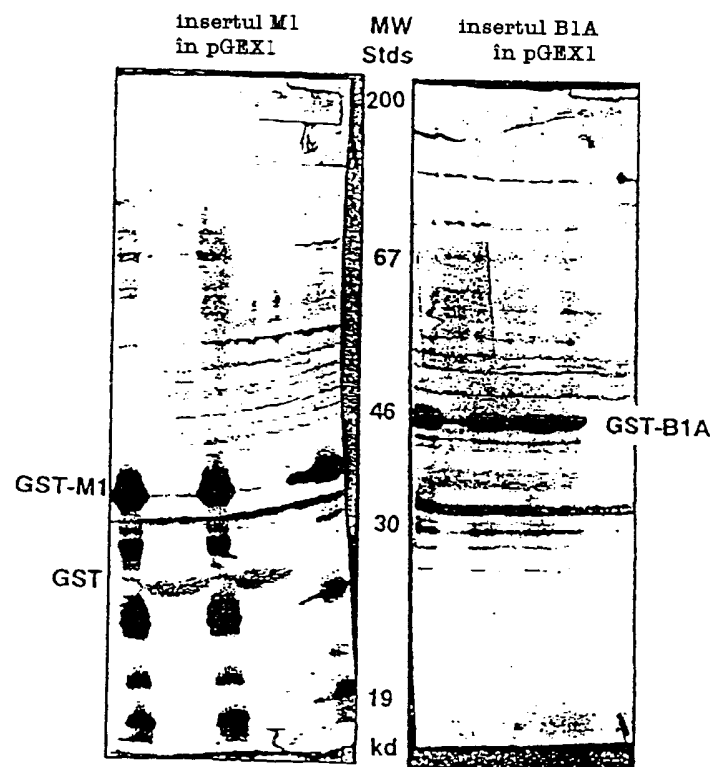


Fig. 11

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
C 12 N 15/62;
C 07 K 9/00;
A 61 K 39/00;
C 07 H 13/04;

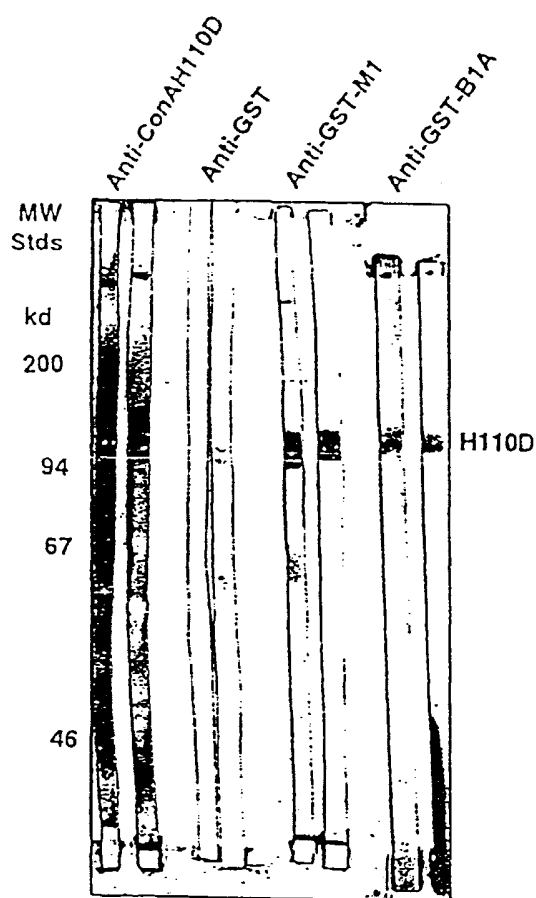


Fig. 12

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
C 12 N 15/62;
C 07 K 9/00;
A 61 K 39/00;
C 07 H 13/04;

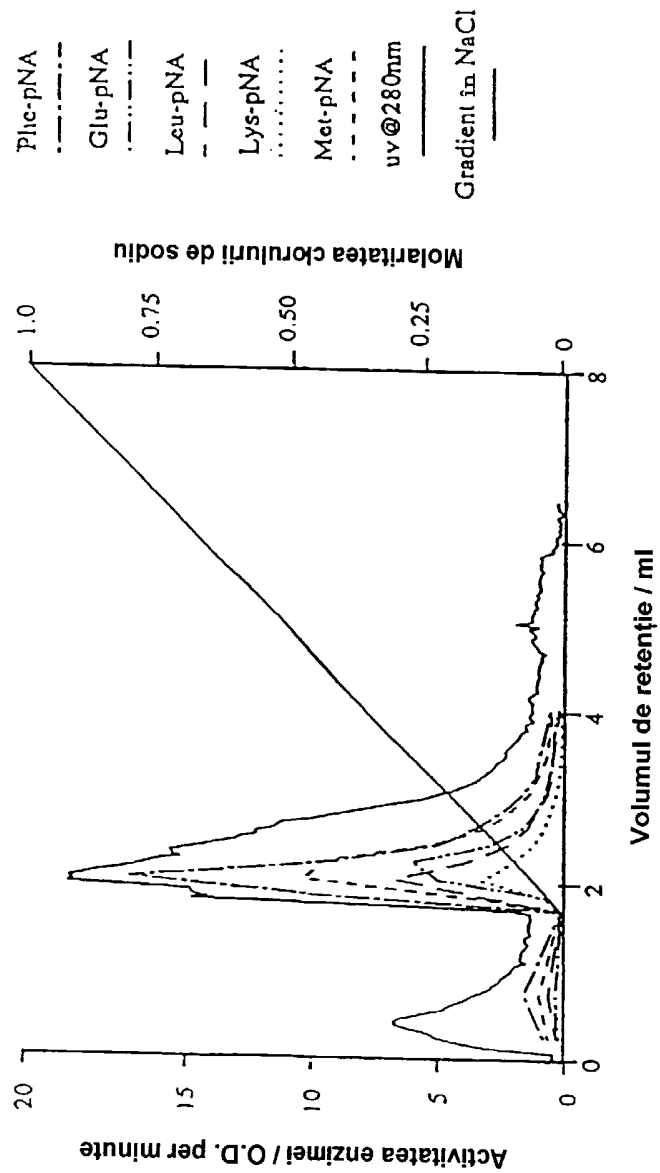
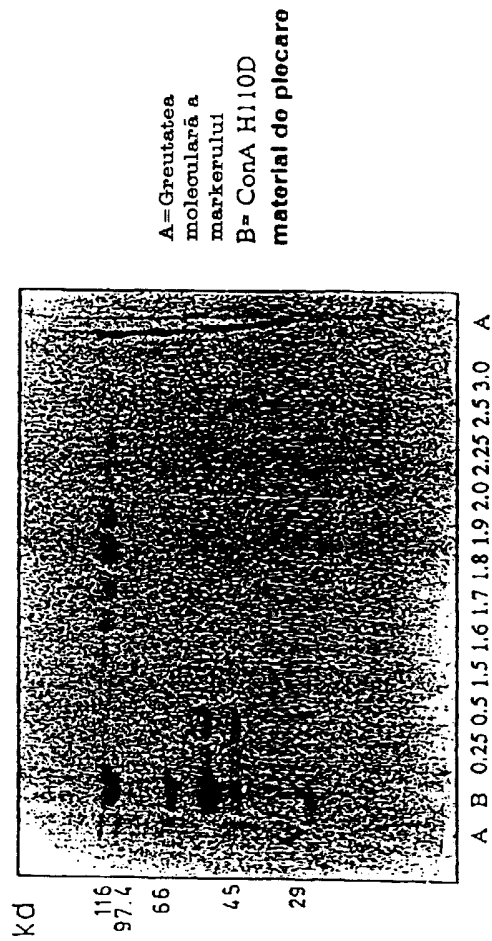


Fig. 13a

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
C 12 N 15/62;
C 07 K 9/00;
A 61 K 39/00;
C 07 H 13/04;



Volumul de retenție (ml) la care a fost luată fracția

Fig. 13b

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
C 12 N 15/62;
C 07 K 9/00;
A 61 K 39/00;
C 07 H 13/04;

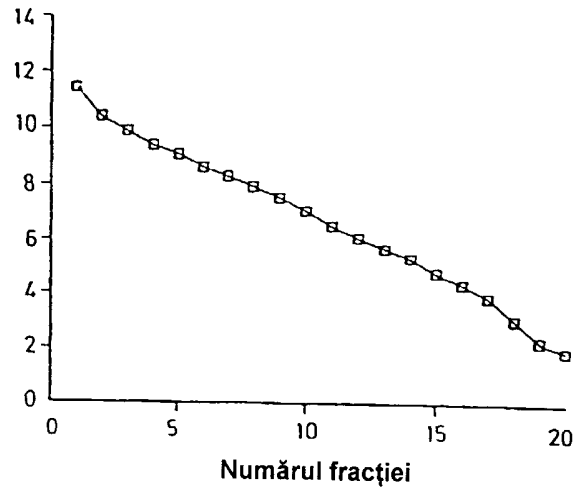


Fig. 14a

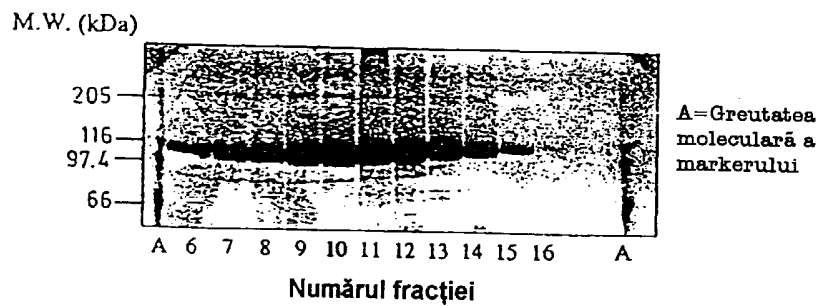


Fig. 14b

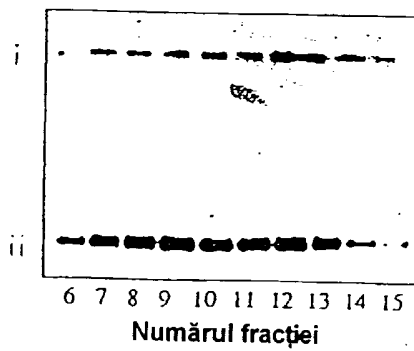


Fig. 14c

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
C 12 N 15/62;
C 07 K 9/00;
A 61 K 39/00;
C 07 H 13/04;

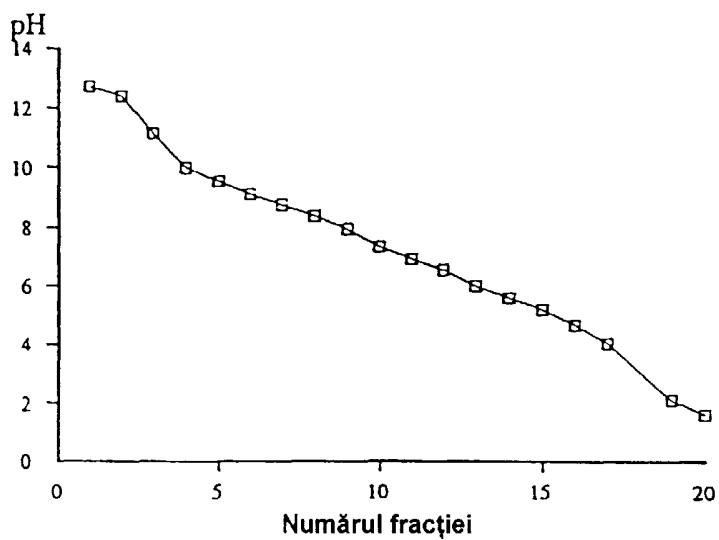
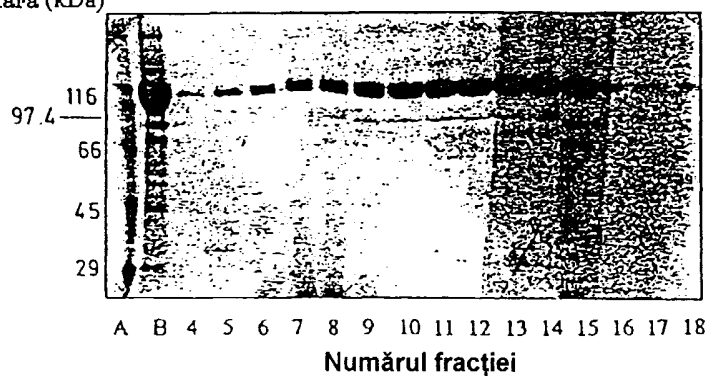


Fig. 15a

Greutatea
moleculară (kDa)



A=Greutatea
moleculară a
markerului8
B= ConA H110D
material de start

Fig. 15b

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
 C 12 N 15/62;
 C 07 K 9/00;
 A 61 K 39/00;
 C 07 H 13/04;

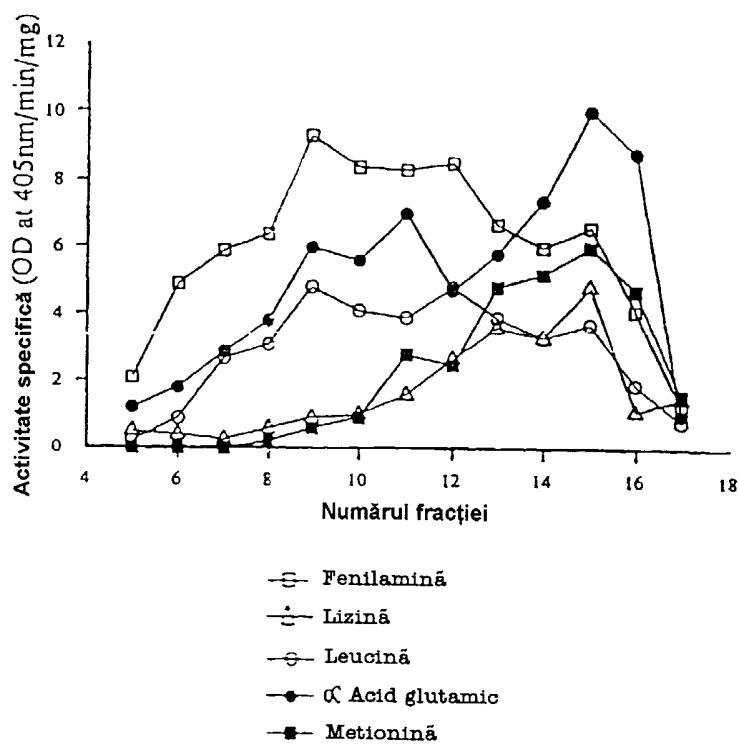


Fig. 15c

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
C 12 N 15/62;
C 07 K 9/00;
A 61 K 39/00;
C 07 H 13/04;

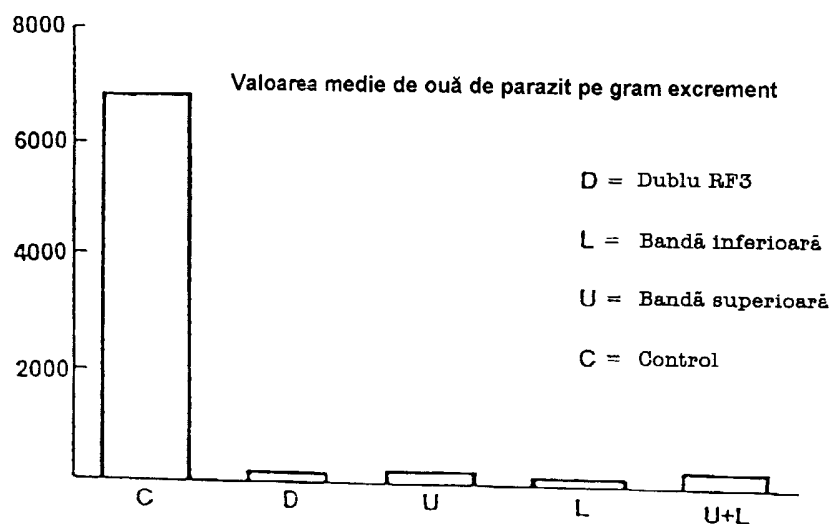


Fig. 16a

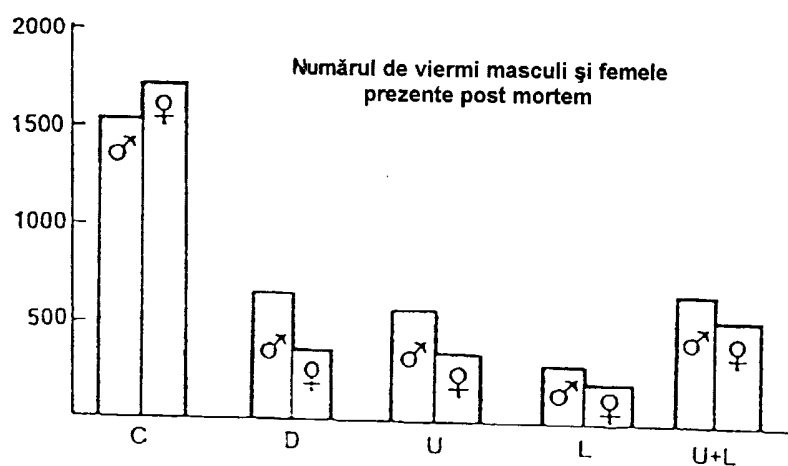


Fig. 16b

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
C 12 N 15/62;
C 07 K 9/00;
A 61 K 39/00;
C 07 H 13/04;

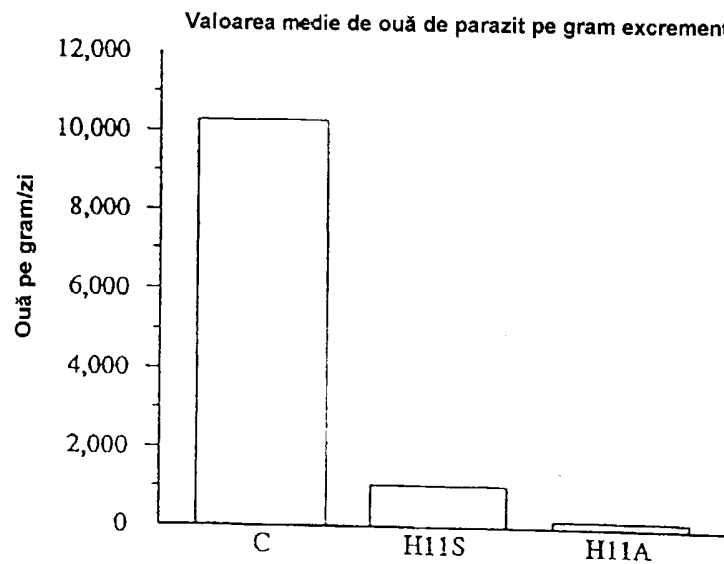


Fig. 17a

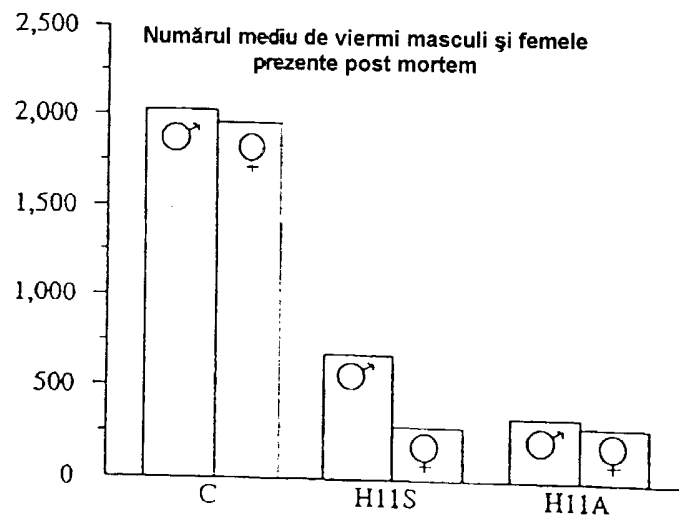


Fig. 17b

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
C 12 N 15/62;
C 07 K 9/00;
A 61 K 39/00;
C 07 H 13/04;

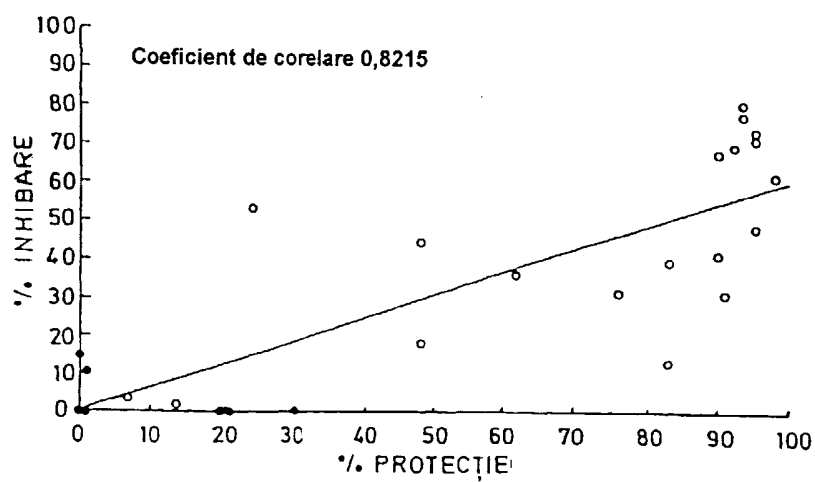


Fig. 18a)i

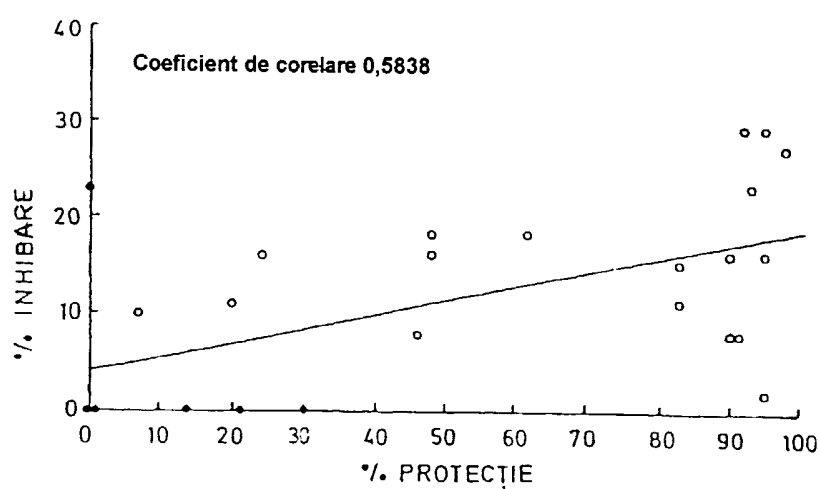


Fig. 18a)ii

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
C 12 N 15/62;
C 07 K 9/00;
A 61 K 39/00;
C 07 H 13/04;

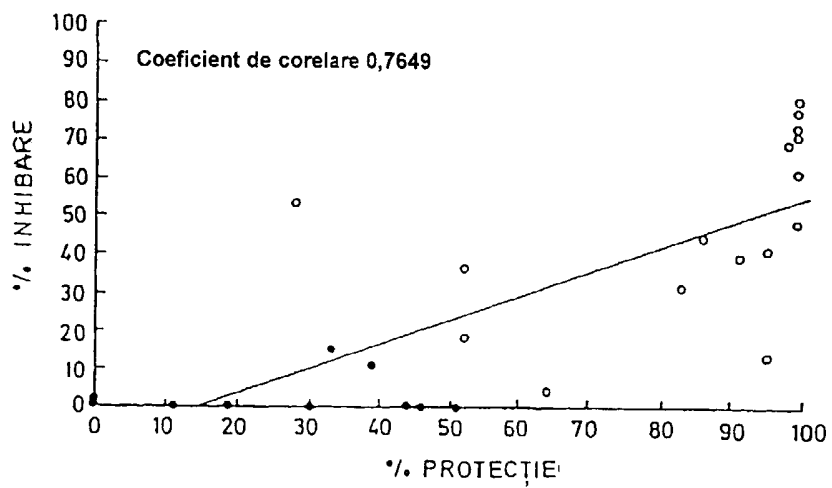


Fig. 18b)i

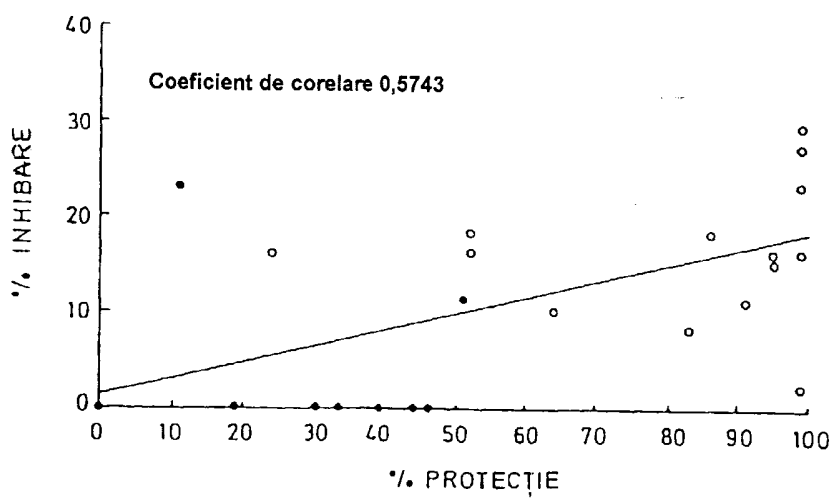


Fig. 18b)ii

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
C 12 N 15/62;
C 07 K 9/00;
A 61 K 39/00;
C 07 H 13/04;

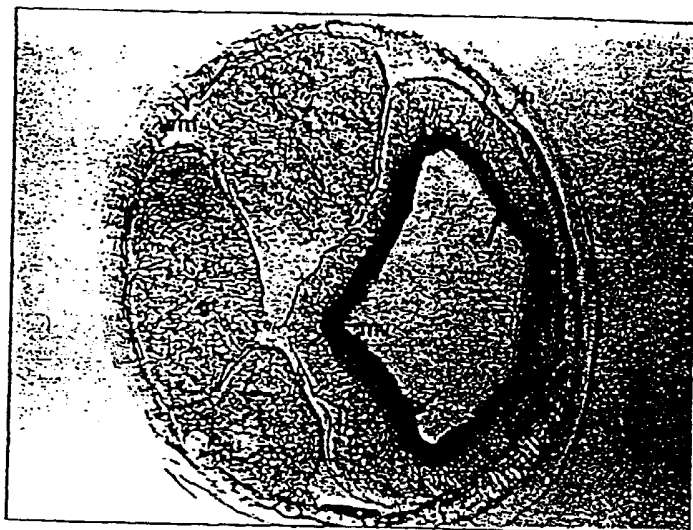


Fig. 19a

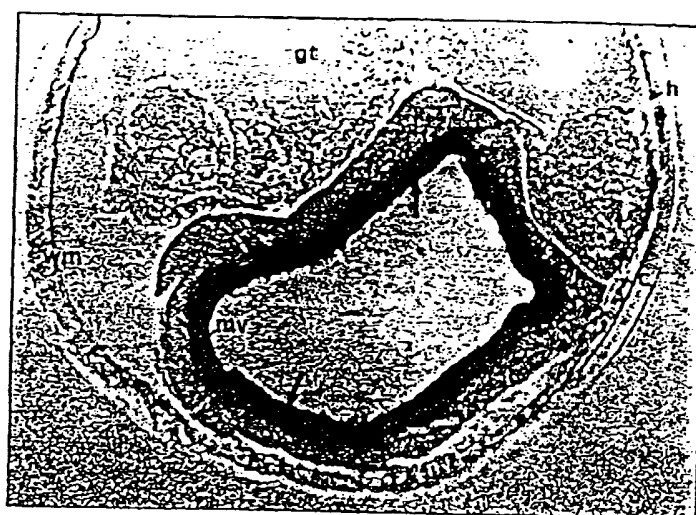
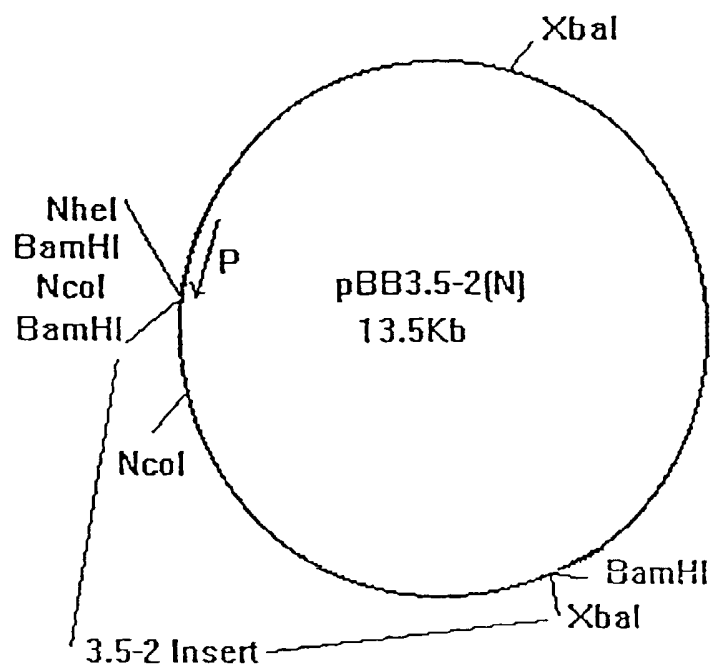


Fig. 19b

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
C 12 N 15/62;
C 07 K 9/00;
A 61 K 39/00;
C 07 H 13/04;



P = promotorul pentru polihidrină

Fig. 20

(51) Int.Cl.⁷ C 12 N 15/30;
C 12 N 15/62;
C 07 K 9/00;
A 61 K 39/00;
C 07 H 13/04;

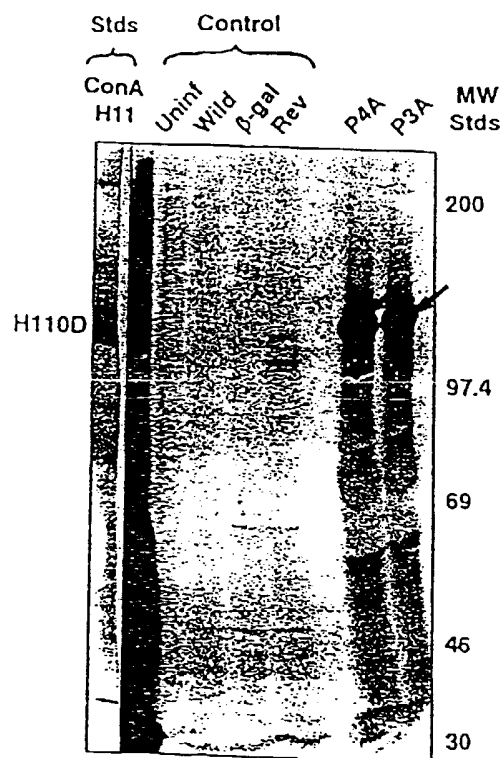


Fig. 21

